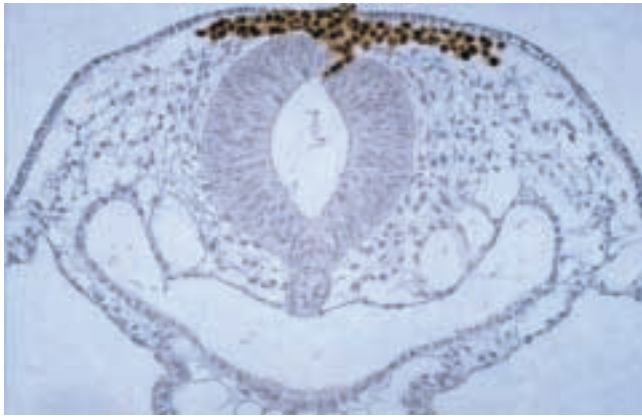
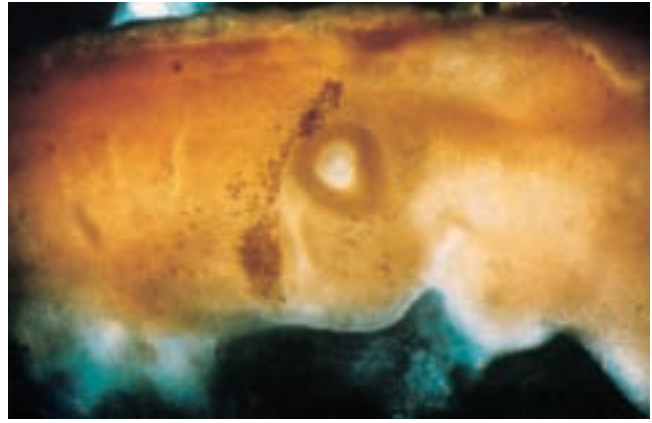




5. DES ANTICORPS spécifiques des cellules de caille (*en marron*) servent aujourd'hui à visualiser la migration des cellules de caille greffées sur les embryons de poulet. Le suivi des cellules de caille est ainsi rapide



Institut d'embryologie

et aisé. On visualise généralement les cellules de caille sur des coupes (*à gauche*), mais parfois sur l'embryon entier qui, lorsqu'il est tout jeune (quelques heures), est transparent (*à droite*).

ration avec Christiane Le Lièvre, au début des années 1970. Elles ont été reprises et développées, à partir de 1987, avec Gérard Couly. Il est apparu que la contribution de la crête neurale aux structures céphaliques est plus importante que ne l'avaient laissé supposer les travaux réalisés sur les œufs de grenouille et de triton.

En fait, il est maintenant établi que tous les os de la face, ainsi que la majeure partie de la boîte crânienne, dérivent de la crête neurale. Au cours de l'évolution, le développement de la tête des vertébrés s'est effectué essentiellement à partir de l'ectoderme dont sont issus le cerveau, les os de la face, la voûte crânienne, qui recouvre le cerveau et le protège. Il en est de même de la plupart des capsules osseuses qui abritent les organes sensoriels céphaliques, par exemple le squelette des fosses nasales, les orbites et certains des os du canal auditif.

La transition entre l'ébauche neurale primitive, ou plaque neurale, et le cerveau qui en dérive fait intervenir des mécanismes morphogénétiques complexes et met en œuvre de nombreux gènes. Les centres nerveux et les faisceaux de fibres qui assurent les connexions neuronales sont engendrés par les cellules les plus internes de l'épithélium neural qui, pendant le processus de neurogenèse, fonctionne comme une assise génératrice. Elle est constituée de cellules «souches», qui produisent par division asymétrique une autre cellule souche et une cellule différente qui donnera des neurones ou des cellules gliales.

L'activité prolifératrice des différentes régions du tube neural est variable et responsable de la croissance particulièrement active de certaines

zones, comme celles qui donnent naissance aux hémisphères cérébraux, très développés chez l'homme, ou aux lobes optiques volumineux chez les oiseaux, dont la vision est perfectionnée.

Les neurones ainsi produits effectuent, au sein même de l'épithélium neural, des migrations qui les conduisent à former les centres nerveux. Ils émettent des axones (ou fibres nerveuses) qui établissent un réseau de connexions interneuronales d'une extrême complexité. La possibilité de marquer sélectivement des zones définies de l'épithélium neural à un stade précoce du développement embryonnaire permet d'en suivre l'évolution au cours de la morphogenèse du cerveau. Ainsi le trajet des cellules marquées peut être observé lorsqu'elles migrent hors du greffon de caille dans l'épithélium de l'hôte pour venir se positionner dans les centres nerveux où elles achèvent leur différenciation. Les chimères ont permis d'une part d'identifier, sur la plaque neurale, les territoires destinés à fournir les divers constituants du cerveau antérieur et, d'autre part, de localiser dans le cerveau les centres responsables de certains comportements innés.

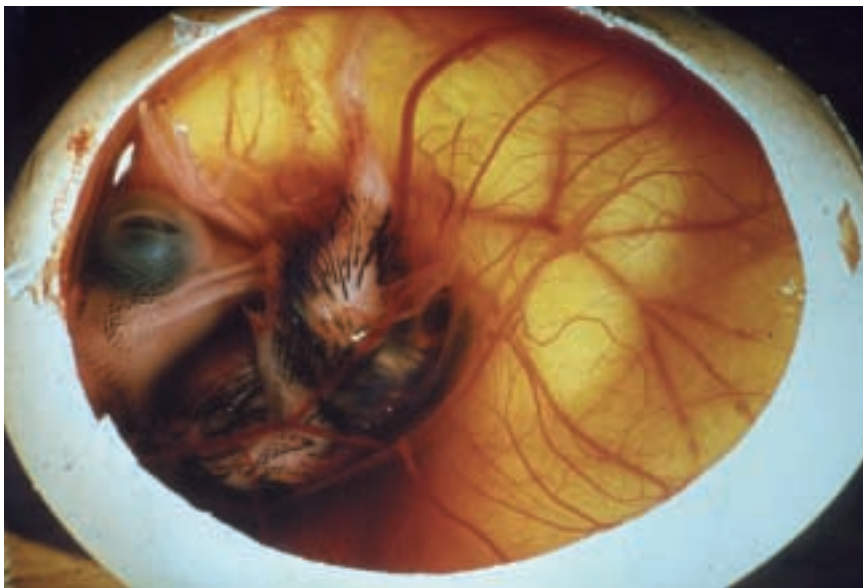
L'intégration des tissus nerveux d'embryon de caille dans le poulet étant suivie du développement normal des structures nerveuses, nous nous sommes demandé si les chimères neurales ainsi construites sont capables d'éclore. Les premières expériences ont montré que des greffes dans le territoire de la moelle épinière permettent le développement normal des chimères jusqu'à l'éclosion et au-delà. Environ dix pour cent des embryons opérés éclosent et produisent des poussins normaux. Le seul signe de leur statut

de chimère est la présence d'une bande transversale de plumes pigmentées particulièrement visible lorsque le poulet hôte appartient à une race blanche. Cette pigmentation provient de la migration des précurseurs des mélanocytes, c'est-à-dire des cellules productrices de pigment, ou mélanine, contenus dans la crête neurale de caille greffée. Ceux-ci migrent dans les bourgeons plumaires du poulet hôte comme ils l'auraient fait dans ceux de l'embryon de caille dont ils proviennent.

Le chant des chimères

Le fait que ces animaux composites présentent un comportement moteur normal indiquait que des synapses fonctionnelles pouvaient s'établir entre les neurones de caille et les neurones ou les cellules musculaires de poulet, et validait le modèle expérimental des chimères, tant du point de vue morphogénétique que fonctionnel. Avec Marie-Aimée Teillet et Evan Balaban (ce dernier est aujourd'hui à l'Institut des neurosciences de San Diego), nous avons tenté de construire des chimères selon le principe de remplacement isotopique et isochronique des territoires de l'encéphale. Les greffes sont en général réalisées en prenant le poulet comme receveur et la caille comme donneur, et le territoire greffé s'intègre parfaitement dans le cerveau de l'hôte. Les connexions nerveuses s'établissent d'une façon apparemment normale, et les chimères peuvent éclore.

Nous avons recherché si certains comportements innés sont transférables d'une espèce à l'autre par la transplantation de régions définies de l'ébauche de cerveau. E. Balaban a choisi d'étudier le chant. Étant donné les phé-



6. UN EMBRYON DE CAILLE a été substitué à un embryon de poulet, dans l'œuf : il se développe dans un œuf de poule, en association avec un sac vitellin de poulet. Grâce à cette expérience, réalisée dans le laboratoire de l'auteur, on a montré que tous les organes hématopoïétiques de l'embryon sont entièrement colonisés par des cellules sanguines de caille : ces dernières proviennent de l'embryon lui-même et non du sac vitellin, qui est pourtant le site de production des toutes premières cellules souches sanguines.

nomènes de rejet immunitaire observés chez les chimères, nous ne pouvions attendre qu'elles atteignent l'âge adulte pour comparer leur chant avec celui des individus normaux de chaque espèce.

Or, le traitement précoce du jeune poussin par la testostérone déclenche un chant de type «juvénile» qui est différent d'une espèce à l'autre et ne dépend d'aucun apprentissage. Celui qu'émet le poussin de caille est saccadé, comprenant en général deux cris brefs séparés par un silence, lequel est suivi par une vocalisation plus prolongée ; celui du poussin de poulet est unique et modulé. Les embryons de poulet dont le mésencéphale est remplacé par celui de la caille donnent naissance à des poussins chimères, chez qui le cri juvénile est celui de la caille. Le mésencéphale est la seule région du futur encéphale qui permet d'obtenir ce résultat.

Dans notre laboratoire, E. Balaban avait remarqué que l'émission vocale de la caille s'accompagne de mouvements caractéristiques de la tête, inexistant chez le poulet. La transplantation du mésencéphale de caille chez le poulet transmet le chant saccadé de la caille à la chimère, sans pour autant transférer les mouvements de la tête. Récemment, E. Balaban a montré que ces mouvements sont transférables indépendamment des vocalisations typiques de la caille, par la greffe de la partie cervicale de la moelle épinière de caille

chez le poulet. Ainsi, bien que ces deux composantes d'un même comportement soient activées simultanément lors du chant, elles sont commandées par des régions distinctes et relativement éloignées de l'axe neural. Ces contrôles neuronaux sont génétiquement programmés et peuvent être déclenchés indépendamment l'un de l'autre.

Chez les chimères construites par E. Balaban, le chant typique de la caille et les mouvements de la tête qui l'accompagnent normalement sont transférables chez le poulet par la greffe d'ensembles neuronaux distincts. Ainsi, les comportements spécifiques (ici le chant) que ces neurones déterminent chez la caille peuvent s'exprimer dans une espèce différente ; ils dépendent d'une information codée, dès le stade de l'ébauche neurale primitive, dans un territoire restreint du neuroépithélium.

Chimères et immunologie

Nous avons vu que les poulets qui éclosent après que l'embryon a subi la greffe d'un fragment de tube neural de caille ne présentent pas d'anomalies neurologiques à la naissance. Cela reste vrai pendant plusieurs semaines, mais, ensuite, le système immunitaire du poulet réagit contre le greffon. Dans le cas où le greffon neural de caille a été placé au niveau des membres antérieurs, l'attaque du système immunitaire se mani-

feste par une paralysie des ailes. La région de la moelle épinière greffée, les ganglions périphériques et les nerfs issus de la caille sont le siège d'une réaction inflammatoire due à une invasion massive par des lymphocytes et par des macrophages du poulet hôte. On n'observe quasiment aucune réaction de rejet quand les chimères sont construites entre deux embryons de poulet, même s'ils sont issus de lignées ayant des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (les molécules spécifiques du soi) différents ; les chimères poulet-poulet portant des régions de la moelle épinière ou du cerveau provenant d'une autre lignée de poulet restent bien portantes toute leur vie durant.

La fonction de distinguer le soi du non-soi revient aux cellules effectrices de la réponse immunitaire, les lymphocytes. Ceux-ci se classent en deux catégories : les lymphocytes *T*, qui se différencient dans le thymus, et les lymphocytes *B*, qui prennent naissance dans la moelle osseuse, chez les mammifères, et dans un organe spécialisé, associé au cloaque, la bourse de Fabricius, chez les oiseaux. Les lymphocytes *T* sont notamment responsables de l'immunité à médiation cellulaire et du rejet des greffes. Les lymphocytes *B* sont à l'origine de l'immunité humorale et de la production d'anticorps.

Le thymus et la bourse de Fabricius sont des organes lymphoïdes primaires ou centraux, tandis que la rate et les ganglions lymphatiques qui reçoivent les lymphocytes *T* et *B* issus du thymus et de la bourse de Fabricius sont des organes lymphoïdes secondaires ou périphériques.

La source cellulaire des lymphocytes qui apparaissent dans ces deux organes lymphoïdes primaires a été longtemps l'objet de débats. Selon une des hypothèses, les lymphocytes dériveraient de l'endoderme des ébauches du thymus et de la bourse de Fabricius (contrairement aux autres cellules sanguines, qui dérivent du mésoderme). Une autre hypothèse proposait que les lymphocytes dérivent de cellules extrinsèques aux organes lymphopoïétiques primaires. Grâce aux chimères caille-poulet, nous avons montré que tous les lymphocytes dérivent de cellules souches hématopoïétiques qui envahissent les ébauches du thymus et de la bourse de Fabricius à une (ou à des) période(s) bien déterminée(s) du développement embryonnaire. Il en est

de même des cellules sanguines qui se différencient dans la rate et dans la moelle osseuse.

Ainsi, les organes qui donnent les cellules du sang ne les produisent-ils que s'ils ont été préalablement colonisés par des cellules fondatrices d'origine extrinsèque ; celles-ci trouvent dans chacun des organes colonisés un environnement favorable à leur différenciation vers l'une ou l'autre des lignées de cellules du sang. Chez l'adulte, la moelle osseuse est le site de production des globules rouges et de divers types de globules blancs (y compris les lymphocytes B chez les mammifères). Ainsi, les lymphocytes qui se différencient dans le thymus (chez tous les vertébrés) et dans la bourse de Fabricius (chez les oiseaux) dérivent de cellules qui ne sont pas produites par ces organes eux-mêmes, mais de précurseurs dont l'origine embryologique restait à identifier.

Françoise Dieterlen et Claude Martin, dans le laboratoire, ont réalisé une expérience ingénieuse destinée à explorer la capacité des cellules produites par le sac vitellin – site de production des premières cellules sanguines – à coloniser la moelle osseuse, la rate, le thymus et la bourse de Fabricius.

Lorsque la distinction entre l'embryon proprement dit et ses annexes vitellines est établie, F. Dieterlen et C. Martin remplacent le territoire embryonnaire du poulet par l'équivalent provenant de la caille. Un embryon de caille se développe donc dans un œuf de poule et en association avec un sac vitellin de poulet (voir la figure 6). L'expérience a montré que les organes hématopoïétiques de cet embryon sont entièrement colonisés par des cellules souches de caille qui proviennent de l'embryon lui-même, et non de son sac vitellin.

La source des cellules souches sanguines qui assureront le renouvellement du sang pendant toute la vie a été récemment localisée, par l'équipe de F. Dieterlen, dans des îlots mésodermiques dont le

fonctionnement est transitoire et qui sont associés à l'aorte ventrale. Durant cette période, des cellules souches hématopoïétiques totipotentes sont produites par ces îlots et pénètrent dans les organes qui produiront les cellules sanguines. Nous avons montré que le thymus ne reçoit ces précurseurs que pendant de courtes périodes séparées par des intervalles où l'organe n'est plus «réceptif». Au contraire, dans le cas de la bourse de Fabricius, les précurseurs pénètrent en une seule vague qui dure de cinq à six jours, au cours de l'embryogenèse.

Des vagues de lymphocytes

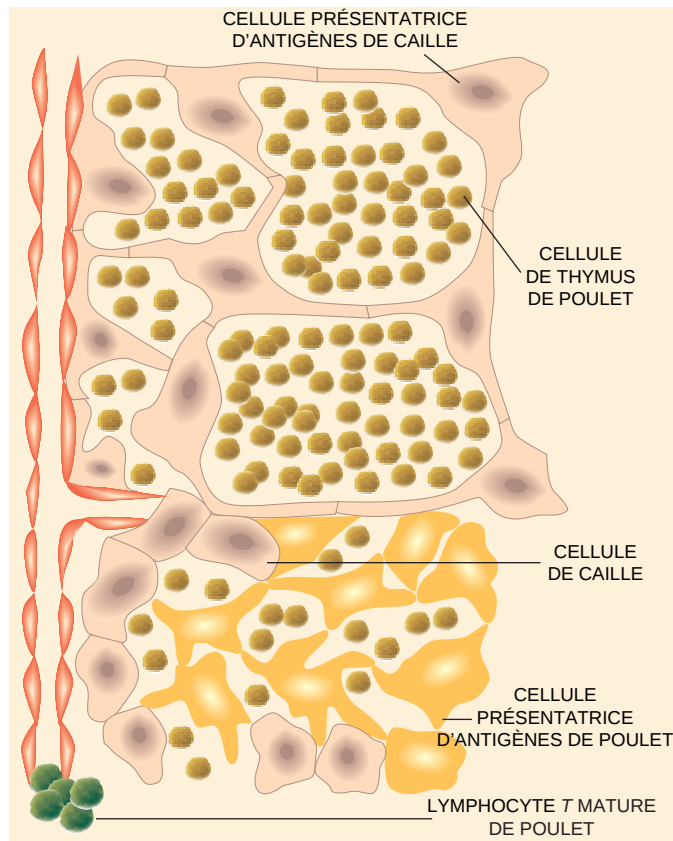
Pourquoi les cellules hématopoïétiques pénètrent-elles dans le thymus par vagues successives ? Selon l'hypothèse la plus plausible, l'épithélium du thymus produit une substance chimiotactique à laquelle les cellules souches du sang circulant sont sensibles. En effet, quand l'épithélium du thymus est réceptif aux cellules hématopoïétiques, on voit ces cellules adhérer aux parois des vaisseaux sanguins qui

entourent le rudiment thymique, puis migrer vers la source présumée de l'attracteur chimique. Ce phénomène d'adhérence des cellules circulantes aux parois vasculaires a été retrouvé chez l'adulte dans les sites d'inflammation. Les cellules de défense de l'organisme adhèrent aux cellules de l'endothélium vasculaire avant de pénétrer dans les tissus.

Des expériences réalisées *in vitro* par Jean-Paul Thiery et son équipe (maintenant à l'Institut Curie) ont confirmé que l'ébauche thymique embryonnaire exerce un effet chimiotactique vis-à-vis de ces cellules, aux stades où elle est normalement colonisée par les précurseurs hématopoïétiques.

La périodicité de la colonisation du thymus n'est pas spécifique des embryons d'oiseaux. Francine Jotereau, à l'Université de Nantes, a montré qu'elle existe aussi chez l'embryon de souris. Enfin, le caractère cyclique de l'activité du thymus a été démontré chez certains reptiles hibernants par Rachika El Ridi, à l'Université du Caire. Chez ces reptiles, le thymus se vide totalement de ses lymphocytes pendant l'hiver, une période au cours de laquelle les animaux sont immunodéficients. Au printemps, ils deviennent à nouveau capables de produire des anticorps et de rejeter les greffes : leur thymus a été recolonisé par des cellules hématopoïétiques qui se différencient en lymphocytes et en cellules dendritiques médullaires. Chaque année, la même alternance de phase d'immunodéficience et d'immunocompétence se reproduit.

Les chimères caille-poulet ont permis d'analyser la destinée des lymphocytes engendrés par chaque vague de cellules hématopoïétiques arrivant dans le thymus. Les cellules de la première vague colonisent l'ébauche épithéliale thymique. Les interactions entre cellules hématopoïétiques et épithélium thymique modèlent l'architecture de la glande adulte, qui est pourvue d'un «cortex» riche en lymphocytes, lesquels se multiplient activement et acquièrent les caractéris-



7. DANS UN THYMUS CHIMÉRIQUE, des cellules épithéliales de caille cohabitent avec des cellules hématopoïétiques de poulet. Des cellules sanguines de poulet pénètrent par vagues dans le thymus, où elles se différencient en thymocytes (en orange). Les lymphocytes T matures (en vert) quittent le thymus. Ils sont tolérants aux antigènes de caille.



8. L'AILE GREFFÉE de caille (en marron) est tolérée chez le poussin. Chez le poulet, elle est généralement rejetée au bout de quelques semaines (en bas à droite). Elle est tolérée chez le poulet adulte (au centre) à condition que l'ébauche embryonnaire du thymus de caille ait été greffée sur l'embryon de poulet en même temps que les cellules qui donneront l'aile. Dans ces conditions, les lymphocytes de poulet qui pourraient réagir contre les antigènes de caille sont soit éliminés au cours de l'embryogenèse, soit muselés par des lymphocytes *T* régulateurs.

tiques moléculaires et cellulaires des lymphocytes *T*.

Au centre de la glande, la «médulla» contient des lymphocytes *T* matures prêts à être exportés dans le sang et vers les organes lymphoïdes périphériques. Chaque lymphocyte *T* mature est pourvu d'un récepteur capable de distinguer les déterminants du soi, c'est-à-dire les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité. Ces molécules, associées à des peptides produits par les cellules, présentent à la surface cellulaire des complexes moléculaires spécifiques de chaque individu.

Normalement, les lymphocytes *T* qui quittent le thymus ne réagissent pas contre le soi, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas activés en cellules tueuses ou en lymphocytes *T* auxiliaires par les antigènes du soi. En fait, les lymphocytes *T* qui portent des récepteurs susceptibles de reconnaître des antigènes du soi avec une haute affinité sont éliminés au cours de leur maturation dans le thymus. Les cellules dendritiques de la médulla thymique jouent ainsi le rôle d'un «filtre» vis-à-vis des lymphocytes *T* capables de reconnaître le soi.

Les chimères caille-poulet ont fourni un modèle expérimental pour explorer le rôle de l'épithélium thymique dans les mécanismes de tolérance vis-à-vis du soi. Quand on substitue l'épithélium des ébauches thymiques de caille à l'épithélium correspondant de poulet, le thymus obtenu est chimérique : les éléments épithéliaux proviennent d'une espèce (la caille), tandis que les lymphocytes

et les cellules dendritiques proviennent de l'hôte (le poulet). Les lymphocytes de poulet qui se différencient dans ce contexte rejettent-ils une greffe provenant du même embryon de caille que l'épithélium thymique? Pour le savoir, nous avons transplanté des bourgeons d'ailes d'un embryon de caille de quatre jours sur un embryon de poulet du même âge. La greffe se développe normalement chez l'embryon qui n'a pas encore la capacité de distinguer le soi du non-soi, mais elle est rapidement rejetée dans le mois qui suit la naissance, lorsque le système immunitaire de l'hôte devient fonctionnel. Ainsi, l'exposition du système immunitaire immature d'un embryon précoce à des tissus étrangers ne garantit pas la reconnaissance du tissu étranger comme faisant partie du soi (du moins dans les associations entre espèces différentes).

Si le poulet ayant reçu la greffe d'un bourgeon d'aile de caille a reçu en même temps celle des bourgeons thymiques épithéliaux du même donneur, l'aile de caille échappe au rejet et est définitivement tolérée. De plus, nous avons montré que la reconnaissance permanente des tissus de caille comme éléments du soi ne nécessite pas le remplacement complet du thymus du poulet par celui de la caille : il suffit qu'un tiers du thymus contienne des cellules épithéliales de caille pour que l'aile greffée soit tolérée durant toute la vie de la chimère.

Le dogme dominant pour expliquer la tolérance vis-à-vis du soi est

dérivé de l'hypothèse de la sélection clonale proposée dans les années 1950 par les immunologistes McFarlane Burnet et Joshua Lederberg : la spécificité de reconnaissance moléculaire qui caractérise chaque lymphocyte *T* provient du réarrangement au hasard des gènes codant son récepteur spécifique. Parmi la multitude de molécules produites par ces combinaisons géniques, certaines sont potentiellement dangereuses, car elles produisent des récepteurs reconnaissant les antigènes du soi. Les lymphocytes portant des récepteurs autoréactifs sont éliminés dans le thymus. On peut donc proposer que les lymphocytes de poulet qui se sont développés au contact de l'épithélium thymique de caille sont rendus tolérants par un mécanisme d'élimination.

Ceci pourtant n'explique pas la totalité des résultats obtenus dans nos expériences. L'hypothèse que nous proposons est que les lymphocytes anticaille venant de ces lobes thymiques sont maintenus dans un état de non-réponse vis-à-vis de la caille par des lymphocytes «régulateurs» produits, au contact de l'épithélium thymique de caille, dans les régions chimériques du thymus. Ainsi, la tolérance vis-à-vis du soi serait régie, en partie seulement, par un phénomène passif d'élimination des clones autoréactifs. À cela s'ajouterait un second mécanisme, actif : tous les clones autoréactifs n'étant pas détruits dans le thymus, un mécanisme de sécurité résultant de la sélection de lymphocytes *T* régulateurs compléterait la sélection clonale.

Nicole LE DOUARIN, professeur au Collège de France, dirige l'Institut d'embryologie cellulaire et moléculaire du CNRS, à Nogent-sur-Marne.

S. CHAMPION, B. A. IMHOF, P. SAVAGNER et J.-P. THIERY, *The Embryonic Thymus Produces Chemotactic Peptides Involved in the Homing of Hemopoietic Precursors*, in *Cell*, vol. 44, pp. 781-790, 1986.

F. JOTEREAU et al., *Cell Kinetics in the Fetal Mouse Thymus: Precursor Cell Input, Proliferation and Emigration*, in *J. Immunol.*, vol. 138, pp. 1026-1030, 1987.

N. M. LE DOUARIN, *Embryonic Neural Chimeras in the Study of Brain Development*, in *Trends Neurosci.*, vol. 16, pp. 64-72, 1993.

N. M. LE DOUARIN, C. KALCHEIM, *Neural Crest, Second edition*, Cambridge University Press, à paraître.
