

de la vie, des cellules aux êtres pluricellulaires.

Les progrès de la génétique et de la biologie moléculaire permettent aujourd'hui d'aborder la question fondamentale posée par l'embryologie : comment les gènes dirigent-ils la transformation de l'œuf en un embryon, puis en un adulte ? Au cours des dix dernières années, il est apparu que, dans de nombreux cas, les systèmes génétiques qui jouent un rôle clé dans le développement de l'embryon ont été conservés au cours de l'évolution dans l'ensemble du règne animal, des invertébrés aux vertébrés.

Cela s'est toutefois accompagné d'une complexification considérable des réseaux moléculaires mis en œuvre. Ainsi les gènes dits «homéotiques», responsables de l'identité des différents segments du corps chez la *Drosophile*, sont au nombre de 8 chez les insectes et les homologues de ces gènes sont au nombre de 39 chez les vertébrés supérieurs.

Ces gènes remplissent un rôle fondamental, qui est de régler l'activité d'autres gènes, grâce à la conservation

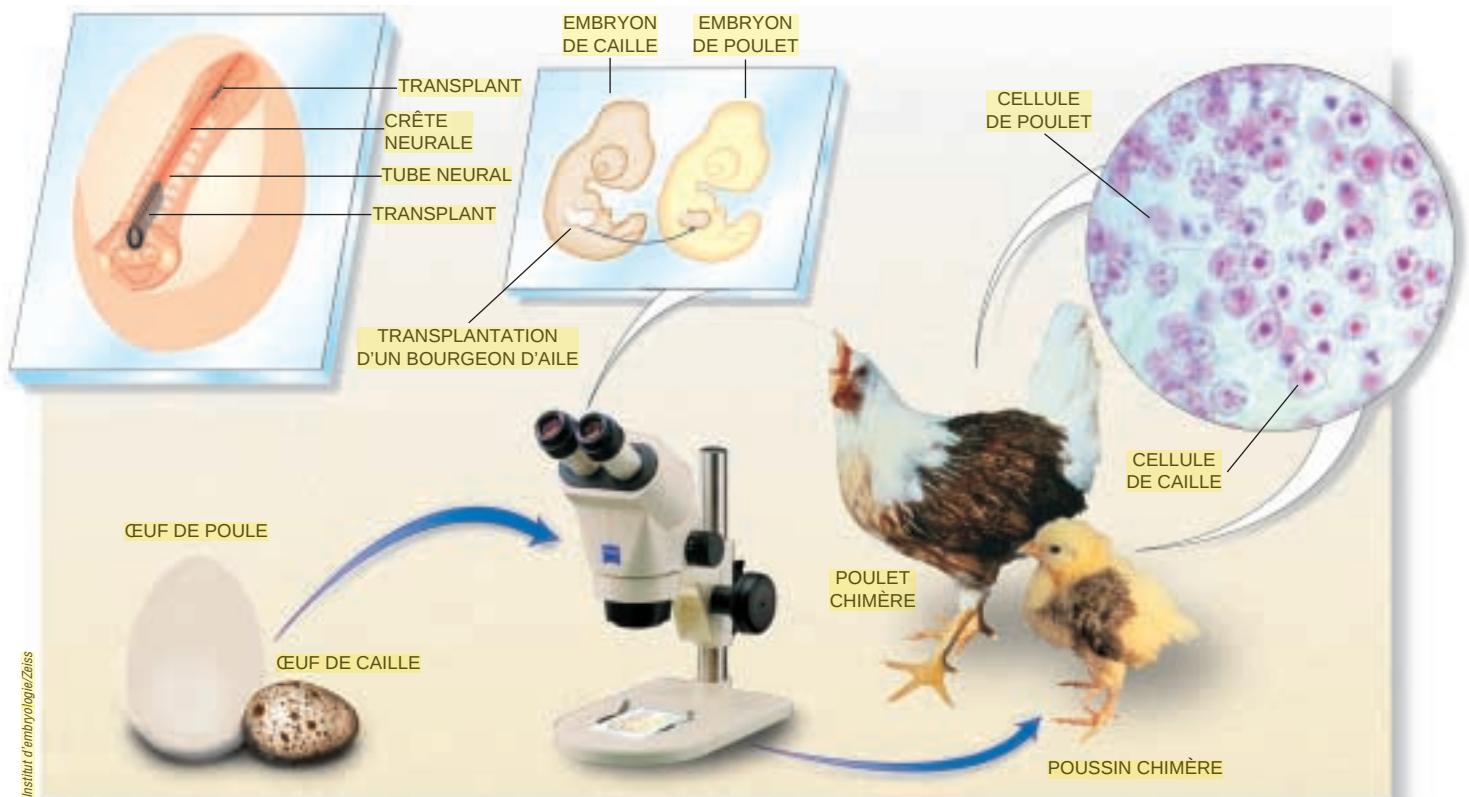
remarquable d'un domaine de la molécule, nommé homéobox ; certains motifs génétiques qui jouent un rôle clé dans les interactions moléculaires ont peu varié au cours de l'évolution. Ils ont été associés et utilisés différemment selon les groupes d'êtres vivants sans qu'un principe directeur apparent puisse en rendre compte, mais plutôt par ce que François Jacob a qualifié de «bricolage de l'évolution». Ainsi se sont créés de nouveaux gènes permettant à de nouvelles formes et à de nouvelles fonctions d'apparaître.

Migrations cellulaires et morphogénèse

Les spectaculaires progrès que connaît la biologie du développement tiennent aussi aux avancées des moyens d'investigation à l'échelle cellulaire et subcellulaire. Ceux-ci ont permis notamment de mettre en évidence que la morphogénèse relève de deux mécanismes fondamentaux, la croissance différentielle des territoires embryonnaires et les mouvements des cellules. Ensembles de cellules ou cellules isolées migrent

dans l'embryon. Ainsi, au cours des premiers stades du développement des vertébrés, un repli de l'ectoderme donne naissance à la gouttière neurale. Par apposition de ses bords latéraux naît le primordium de la moelle épinière et du cerveau. De plus, les bourrelets qui limitent la dépression primitive (bourrelets médullaires) fusionnent sur la ligne médiodorsale pour fournir une structure transitoire, la crête neurale (voir la figure 2). Celle-ci est à l'origine d'un grand nombre de types cellulaires et constitue l'exemple le plus frappant de territoire embryonnaire produisant des cellules migratrices qui essaient dans tout l'embryon.

Chez l'embryon des vertébrés, les migrations cellulaires jouent un rôle essentiel dans la construction des tissus. Virtuellement tous les tissus et organes sont formés de cellules d'origines embryologiques diverses. De longues migrations sont nécessaires pour certaines d'entre elles avant qu'elles n'atteignent leur destination, c'est-à-dire les tissus où elles se fixent et à l'histogénèse desquels elles participent. Ces migrations ont généralement lieu alors que les



1. POUR CONSTRUIRE DES CHIMÈRES D'OISEAUX, on enlève une petite zone de la coquille d'un œuf de poule ; on prélève, sous le microscope, une zone bien définie de l'embryon précoce (les zones noires sur l'ébauche neurale, en haut et à gauche) ou de l'embryon plus âgé (l'aile sur les embryons ci-dessus) ; on remplace les zones prélevées sur l'embryon de poulet par les zones identiques d'un embryon de caille, au même stade de développement. Les cellules de caille présentent, quand elles

sont colorées, des granules rouge foncé dont les cellules de poulet sont dépourvues (en haut à droite). Cette différence permet aux biologistes de suivre la migration des cellules greffées. On déduit de telles expériences l'origine embryonnaire des tissus adultes : par exemple, l'origine des cellules qui donnent les ailes (sur le poussin chimère, l'aile issue de cellules de caille est marron) ou celle des cellules qui forment le tronc (la zone marron sur le poulet chimère).

cellules embryonnaires sont encore indifférenciées. Il est donc impossible, dans la plupart des cas, de reconnaître, sur les tissus fixés, les cellules qui se déplacent, car elles ne se distinguent en rien des autres. Ces cellules doivent être marquées d'une manière ou d'une autre si l'on veut en suivre la destinée.

Les migrations cellulaires posent des questions fondamentales en biologie cellulaire : pourquoi des cellules, initialement stables, comme celles de la crête neurale, par exemple, qui proviennent de l'épithélium ectodermique, soudain s'en détachent pour migrer ? Quelles sont les caractéristiques moléculaires des voies de migration qu'elles empruntent d'une manière exclusive ? Pourquoi s'arrêtent-elles dans des sites déterminés de l'embryon ? Ces questions relatives au comportement cellulaire, essentielles pour la compréhension du développement embryonnaire, en dépassent cependant le cadre, car elles

concernent aussi le problème général des mécanismes de la motilité cellulaire et celui de la stabilité de l'état tissulaire qui caractérise les constituants des différents organes du corps adulte. On sait que, dans les tumeurs, cet ordre tissulaire est aboli. Lorsqu'elles deviennent métastatiques, les cellules cancéreuses ne restent plus groupées, mais elles acquièrent la capacité de migrer et d'essaimer dans divers sites.

La connaissance des règles qui contrôlent la motilité des cellules est essentielle aussi bien dans le domaine de la biologie que de la pathologie cellulaire.

Marquage et suivi des cellules

Depuis longtemps, les embryologistes cherchent à marquer les cellules dans l'embryon pour suivre leurs migrations. Pour être efficace, un marquage ne doit

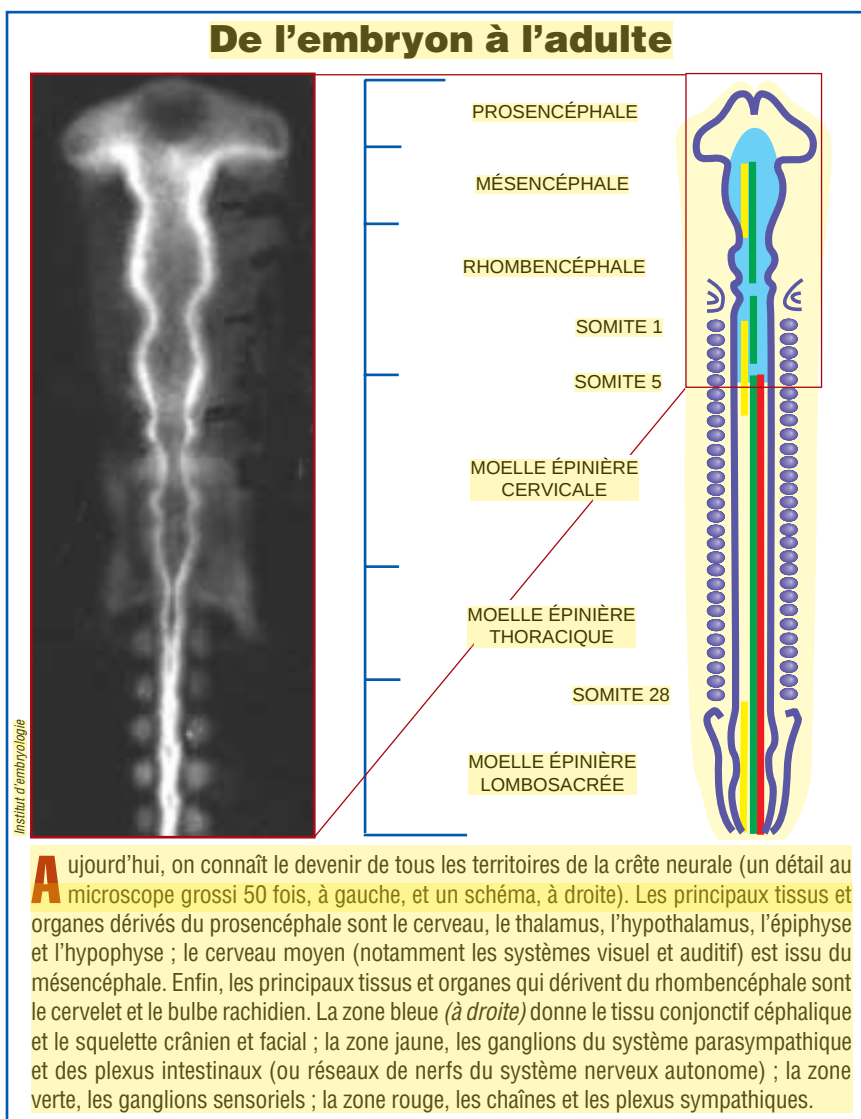
pas être toxique ; il doit rester strictement localisé dans les cellules initialement marquées et être stable, afin que le destin des cellules puisse être connu jusqu'à ce qu'elles aient atteint un stade complètement différencié.

Les premières tentatives de marquage ont consisté à appliquer aux cellules embryonnaires des colorants dits vitaux, tel le rouge neutre. Cela est faisable sur des embryons qui se développent hors de l'organisme maternel, comme celui des amphibiens ou des oiseaux. L'embryon de poulet est accessible à l'expérimentation dans l'œuf pendant toute la durée de l'embryogenèse. Il est proche, dans son organisation et son développement, de celui des mammifères et constitue donc un matériel expérimental précieux, car la majorité des résultats obtenus chez l'oiseau peuvent être étendus aux mammifères.

Toutefois, le rouge neutre, bien que qualifié de vital, n'est pas dépourvu de toxicité. De plus, il diffuse aisément vers les cellules voisines de celles sur lesquelles il a été appliqué et, par conséquent, ne fournit pas un marquage précis. Enfin, il ne permet qu'un marquage très transitoire. Dans les années 1960, deux chercheurs, Pierre Chibon, en France, et James Weston, aux États-Unis, ont respectivement marqué les cellules d'embryons d'amphibien et de poulet en leur faisant incorporer un précurseur de l'ADN (la thymidine), où un atome d'hydrogène est remplacé par son isotope radioactif, le tritium. Ainsi, lorsque les cellules en division, qui dupliquent leur ADN, incorporent ce précurseur, leur noyau devient radioactif. Les cellules marquées sont repérées sur des coupes histologiques. Comme dans le cas des colorants vitaux, l'inconvénient majeur est le caractère instable du marquage. En effet, le marquage par la thymidine radioactive est dilué de moitié à chaque duplication de l'ADN et, compte tenu de la vitesse élevée de la prolifération des cellules embryonnaires, il n'est plus visible au-delà de deux à trois jours.

Il existe actuellement des colorants vitaux qui sont beaucoup plus performants. Il en est ainsi des carbo-cyanides qui, étant lipophiles, ont une affinité pour les membranes cellulaires où ils s'incorporent, conférant aux cellules une fluorescence rouge. Ce marquage, cependant, n'est aussi que temporaire.

D'autres méthodes consistent à tirer parti de différences génétiques stables



entre deux souches différentes appartenant à la même espèce ou à deux espèces différentes. La combinaison entre cellules d'individus porteurs d'un marqueur aisément identifiable peut, si le marqueur est permanent, permettre de suivre les cellules pendant toute la durée du développement embryonnaire. L'association des cellules provenant de deux individus différents au sein d'un seul embryon consiste à construire une chimère. Pour qu'une chimère se développe normalement, les processus morphogénétiques et les interactions entre cellules, si importants pour le développement harmonieux de l'embryon, doivent être fondamentalement identiques dans les espèces dont sont issues les cellules recombinées. Cela est possible lorsque les espèces sont proches sur le plan taxonomique.

Chimère et exploration de l'embryon

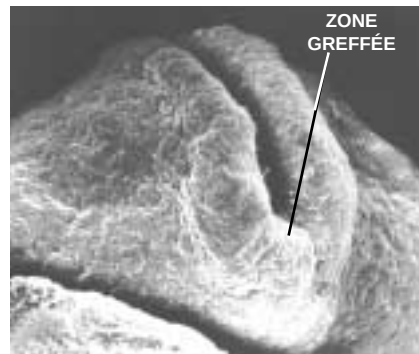
L'association dans un même organisme de cellules provenant de deux individus distincts – en d'autres termes, la juxtaposition de cellules de deux génotypes différents –, loin de produire des monstres, permet non seulement de suivre les déplacements de cellules greffées reconnaissables de celles de l'hôte, mais aussi de mettre en évidence les interactions entre ces cellules.

Vers la fin des années 1960, le généticien Ernst Bösiger utilisait, comme matériel expérimental, la caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*), une espèce particulièrement féconde, puisque la femelle pond un œuf par jour. Ayant plus d'œufs qu'il ne pouvait en utiliser pour son élevage, il en distribua à divers laboratoires d'embryologie. J'en bénéficiai moi-même et, par curiosité, fis quelques expériences pour éprouver l'intérêt potentiel de l'embryon de caille comme matériel expérimental. J'ai alors fait une observation qui a été décisive pour la suite de mes travaux, puisqu'elle m'a amenée à mettre au point la méthode de marquage cellulaire fondée sur la construction de chimères entre la caille et le poulet.

J'ai remarqué la présence, dans le noyau des cellules de caille, d'une volumineuse condensation d'ADN associée au nucléole (une structure présente dans tous les types cellulaires). L'ADN condensé dans les noyaux constitue l'hétérochromatine. Il s'agit d'une par-



2. LA PLAQUE NEURALE (une couche de cellules indifférenciées) se replie au début de l'embryogenèse et les plis neurales se rapprochent, jusqu'à se coller, formant le tube neural d'où émergera la quasi-totalité du système nerveux (*embryon de poulet, à gauche*). L'étude des chimères caille-poulet a permis d'établir une carte du devenir des cellules de cette région : en remplaçant des cellules de poulet par des cellules de caille (*à droite, la zone greffée apparaît plus claire*), on suit le mouvement des cellules de caille, repérables par leur volumineux noyau (le grossissement est égal à 300).

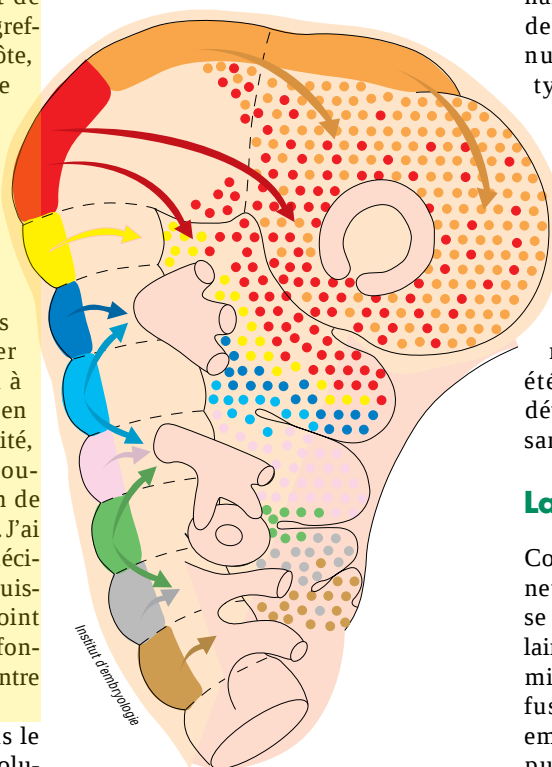


Institut d'embryologie

tie du génome qui, à un moment déterminé et dans une cellule donnée, est non transcrite, par opposition à l'euchromatine, qui est constituée d'ADN non condensé et accessible à la transcription. Hétérochromatine et euchromatine sont des états dynamiques du génome et sont, dans une certaine mesure au moins, interconvertibles. Cette association de l'hétérochromatine (ADN condensé) et du nucléole n'existe généralement pas dans les

cellules animales... sauf chez la caille et quelques autres espèces d'oiseaux. Lorsque les cellules de caille et de poulet sont colorées de façon à mettre l'ADN en évidence, la différence de structure de leur noyau est manifeste (*voir la figure 1*).

Quand on construit des embryons chimériques en greffant, comme nous allons l'expliquer, des territoires embryonnaires de caille sur un embryon de poulet (ou *vice versa*), on reconnaît aisément les cellules de chacune des deux espèces. La même structure nucléaire se rencontre dans tous les types cellulaires embryonnaires et adultes de caille et constitue un marqueur génétique d'une stabilité jamais égalée dans les marquages expérimentaux utilisés auparavant. Ainsi, les chimères offrent la possibilité de suivre, jusqu'au stade adulte, le devenir de cellules choisies dans un embryon. Dans mon laboratoire, cette méthode a été utilisée surtout pour l'étude du développement des systèmes nerveux, sanguin, vasculaire et immunitaire.



3. LES CHEMINS MIGRATOIRES des cellules de la crête neurale (ici dans la tête) ont été identifiés par l'auteur et ses collègues : on a indiqué par la même couleur les cellules de la crête neurale avant et après leur migration.

La crête neurale

Comme nous l'avons indiqué, la crête neurale se forme lorsque le tube neural se ferme et que les bourrelets médullaires qui bordent l'ébauche neurale primitive (aussi appelée plaque neurale) fusionnent. Le rôle de cette structure embryonnaire transitoire, très discrète puisqu'elle n'est constituée à l'origine que de quelques milliers de cellules chez l'embryon d'oiseau ou de souris, est resté longtemps mal connu. La construction de chimères entre caille et poulet permet d'étudier l'ontogenèse de la crête