

À l'origine, nous cherchions à mieux comprendre la formation de la rétine. Nous savions qu'elle provient d'une partie du cerveau embryonnaire nommée diencéphale. Durant les premiers stades du développement embryonnaire, un segment du diencéphale s'étend pour former la vésicule optique, une structure en forme de ballon. Celle-ci s'invagine, formant la « cupule optique », qui deviendra la rétine (voir l'encadré ci-dessous).

Depuis plus d'un siècle, les biologistes débattent sur le mécanisme de formation de la cupule optique. Une question importante concerne le rôle des structures voisines, telles que le cristallin et la cornée. Certains chercheurs pensent que le cristallin façonne la cupule optique en exerçant une pression sur la vésicule, tandis que d'autres affirment que la cupule peut se former sans lui et sans les autres tissus voisins.

Il est difficile d'observer les mécanismes physiologiques sous-tendant le développement sur des animaux vivants. Il y a environ dix ans, nous avons donc décidé de reproduire le développement de l'œil dans une boîte de Pétri. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules souches embryonnaires, que nous avons exposées à diverses substances chimiques connues pour être impliquées dans la formation de l'œil. Les cellules souches embryonnaires constituent le type le plus immature de cellules souches. Elles sont capables de se différencier en tous les

types cellulaires du corps, des neurones jusqu'aux cellules musculaires.

Aucune technique existante ne permettait d'engendrer des organes à partir de cultures de cellules souches. Des essais avaient été réalisés en plaçant les cellules sur une sorte d'échafaudage artificiel, qui imitait la forme de l'organe ciblé (en l'occurrence une vessie ou un œsophage), mais ils n'avaient remporté qu'un succès mitigé. Nous avons donc tenté une approche différente.

En 2000, nous avons élaboré une méthode pour transformer des cellules

LA FORMATION DE LA RÉTINE est un phénomène auto-organisé, fondé sur un programme interne des cellules.

souches embryonnaires de souris en différents types de neurones. Nous avons ensuite placé une monocouche de ces cellules souches dans une boîte de Pétri, avec des cellules dites nourricières : ces dernières transmettaient des signaux chimiques déclenchant la différenciation des cellules souches embryonnaires. Cette couche mince ne reproduisait pas les organes tridimensionnels réels, mais nous désirions déjà savoir si les molécules sélectionnées suffisaient à obtenir les types particuliers de neurones apparaissant précocement lors du développement de l'œil.

Après des débuts difficiles, nous avons développé une nouvelle méthode en 2005,

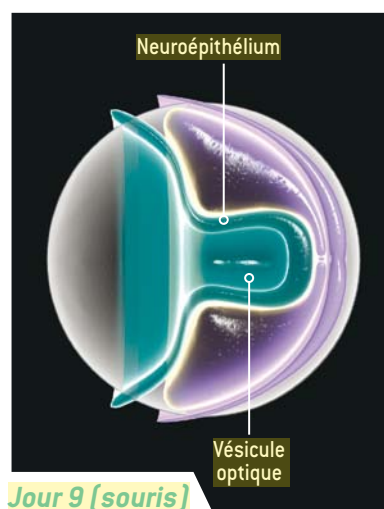
qui nous a permis de dépasser le stade bidimensionnel : nous avons créé une suspension de cellules souches dans un milieu liquide, qualifiée de culture flottante. L'intérêt d'une telle culture tridimensionnelle est double. Tout d'abord, un agrégat de cellules est mieux à même de prendre la forme des tissus s'il est tridimensionnel que s'il est plat. Ensuite, la formation de structures complexes requiert de multiples communications entre cellules, et ces dernières interagissent plus facilement dans une culture tridimensionnelle.

Nous avons placé des cellules en suspension dans de petits réservoirs – comptant chacun en moyenne 3000 cellules – au sein d'une boîte de Pétri. Initialement séparées les unes des autres, les cellules se sont liées avec leurs voisines. Nous avons ensuite déclenché la différenciation de ces petits agrégats de cellules en des progéniteurs neuronaux (des cellules neuronales immatures) présents à l'avant du cerveau. Les cellules ont alors commencé à échanger des signaux.

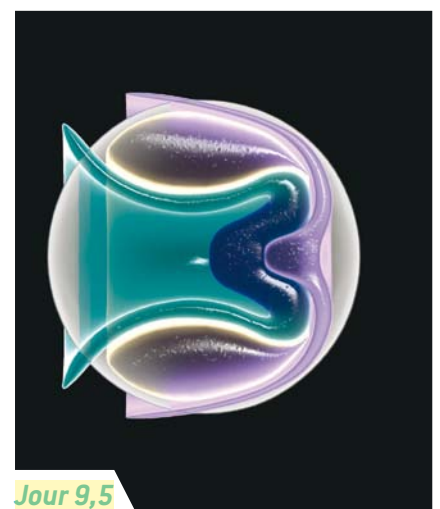
Trois à quatre jours plus tard, elles se sont organisées spontanément en une sphère creuse formée d'une couche cellulaire ; on parle de neuroépithélium. Nous avons nommé SFEBq cette méthode de culture (pour *Serum free floating culture of embryoid body-like aggregate with quick reaggregation*, littéralement culture sans sérum flottante d'agrégats embryonnaires se réagrégeant rapidement).

LA NAISSANCE DE LA RÉTINE CHEZ L'EMBRYON

L'œil se forme à partir d'un petit amas de cellules embryonnaires. Au début, une couche de tissu, le neuroépithélium, se replie vers l'extérieur, donnant naissance à la vésicule optique (jour 9). La paroi de ce bourgeon s'incurve ensuite vers l'intérieur (jour 9,5), et la vésicule du cristallin se développe (jour 10). Une partie de la vésicule optique engendre la cupule optique, à l'origine de la rétine et du nerf optique (jour 10,5). La rétine contient trois couches distinctes de cellules (à l'extrême droite), l'une d'elles étant constituée des photorécepteurs (les bâtonnets et les cônes). La rétine représentée ici, d'une taille de 250 micromètres, est celle d'une souris. La rétine humaine est similaire, mais plus grosse, et sa formation est plus longue.



Jour 9 (souris)



Jour 9,5

Dans l'embryon, les cellules neuroépithéliales forment des structures cérébrales spécifiques, après avoir reçu des signaux chimiques externes. L'un de ces signaux déclenche le développement du diencephale, qui engendrera la rétine et l'hypothalamus (une aire cérébrale contrôlant l'appétit et de nombreuses fonctions physiologiques fondamentales). Après avoir fait s'agréger les cellules en sphères, nous avons provoqué leur différenciation en progéniteurs rétiniens – les précurseurs des cellules rétiniennes matures. Pour ce faire, nous avons ajouté à notre culture un mélange de protéines, incluant celles qui assurent ce rôle chez l'embryon.

Quelques jours plus tard, des structures semblables à la vésicule optique ont spontanément « bourgeonné » sur les sphères, avant de changer de forme : la structure finale ressemblait à la cupule optique de l'œil embryonnaire (voir l'encadré page 62). Comme la cupule optique des animaux vivants, cette structure issue de cellules souches embryonnaires se composait de deux parois (deux épithéliums), l'une extérieure et l'autre intérieure ; c'est cette dernière qui est à l'origine de la rétine.

Ainsi, une structure ordonnée est née de la seule agrégation de cellules souches dans un récipient. Contrairement à ce qui se passe chez l'embryon, il ne se formait pas de cristallin ou de lentille au voisinage de la cupule optique. Nos travaux montrent donc qu'aucune force exercée par des tissus voisins (tel le cristallin) n'est nécessaire à

la formation de la protorétine. Au moins *in vitro*, c'est un phénomène auto-organisé, fondé sur un programme interne des cellules. Ce programme est encodé dans leur ADN, et nous travaillons à préciser ses mécanismes d'action.

■ L'AUTEUR



Yoshiki SASAI est directeur du groupe d'organogenèse et de neurogenèse au Centre de biologie du développement du RIKEN, à Kobe, au Japon.

■ SUR LE WEB

Plus d'information sur Y. Sasai et ses recherches : www.ScientificAmerican.com/nov2012/sasai

L'apparition spontanée d'une structure stratifiée

Le développement normal de la rétine, tel qu'on l'observe chez les embryons, s'est poursuivi dans nos cultures. En deux semaines supplémentaires, la cupule optique a grandi jusqu'à environ deux millimètres de diamètre, et l'épithélium monocouche interne est devenu une structure stratifiée, contenant les six catégories de cellules d'une rétine naturelle après la naissance. L'une des couches extérieures de cette structure était constituée de photorécepteurs et l'autre de cellules dites ganglionnaires, qui, dans le corps, relie la rétine au cerveau. Entre les deux se trouvaient plusieurs couches de cellules de liaison, nommées interneurones.

De nombreuses questions demeurent, notamment sur la façon dont une boule de cellules entre dans un programme de différenciation, qui aboutit à des tissus distincts. Tout au long du développement embryonnaire, des formes complexes apparaissent spontanément à partir d'amas de matière homogène – on parle de brisure

