

Les chimères de caille et de poulet pour étudier l'embryogenèse

NICOLE M. LE DOUARIN

Les greffes de cellules de caille sur des embryons de poulet ont apporté des informations sur les mécanismes du développement du système nerveux, du système sanguin et immunitaire, et sur la localisation cérébrale de certains comportements innés.

La transformation d'une cellule unique, l'œuf fécondé, en un embryon, puis en un adulte, constitue l'un des problèmes les plus complexes et les plus fascinants de la biologie. L'œuf d'un mammifère, l'homme par exemple, donne naissance à un individu constitué de milliards de cellules qui, au cours de l'embryogenèse, se sont diversifiées et groupées en ensembles structurés constituant tissus et organes destinés à accomplir des fonctions à la fois spécifiques et intégrées.

Il est remarquable de constater que la prolifération cellulaire intense qui caractérise le développement embryonnaire est strictement régulée dans le temps et dans l'espace. Dans la plupart des systèmes en développement, la phase de prolifération cellulaire précède la phase de différenciation. Ainsi, la mise en activité des gènes spécifiques des cellules différenciées (par exemple, les gènes codant les protéines contractiles du muscle ou les protéines spécifiques du neurone) s'accompagne de l'arrêt, ou de la diminution, de l'activité des gènes qui interviennent dans la réplication cellulaire.

En dehors de la prolifération des cellules et de leur différenciation, le développement embryonnaire implique aussi la morphogenèse, c'est-à-dire l'élaboration de la forme des organes et du corps, fidèlement transmise d'une génération à l'autre au sein de chaque espèce.

Le programme assurant, à chaque génération, le passage d'une forme d'organisation «simple», la cellule, à

l'être achevé est inscrit dans le patrimoine génétique, où il est codé dans les molécules d'ADN. Celles-ci sont les constituants essentiels des chromosomes contenus dans le noyau de l'œuf et de chacune des cellules qui en sont issues. Certes, les informations codées dans le génome assurent l'exécution du plan de développement qui caractérise chaque espèce vivante, mais l'embryogenèse pose un problème : comment cette information est-elle transmise et comment les différentes phases du programme de développement s'enchaînent-elles ?

Les lois universelles du développement

Les grands événements qui se succèdent au cours de l'embryogenèse ont commencé à être décrits correctement à partir de la moitié du XIX^e siècle. Les sources de l'embryologie moderne remontent à Karl Ernst von Baer (1796-1876), qui a montré que les cellules issues des divisions de l'œuf s'organisent rapidement en trois feuillettes, par un processus morphogénétique appelé gastrulation. L'un externe, l'ectoderme, fournira la peau et le système nerveux, tandis que l'endoderme tapisera le tube digestif et fournira les glandes qui lui sont associées ; enfin, de la couche intermédiaire, ou mésoderme, dériveront les muscles, les tissus conjonctif et adipeux, ainsi que la totalité du squelette. Von Baer démontra la généralité de la formation des feuillettes embryonnaires dans l'ensemble du règne animal.

Ainsi le développement passe par un stade gastrula constitué d'une future cavité digestive, recouverte d'une couche moyenne et superficielle de cellules. De celles-ci seront issus les éléments de communication avec le monde extérieur (système nerveux, organes des sens), et les éléments assurant le soutien (squelette) et les mouvements (muscles) de l'individu.

À partir de la fin du XIX^e siècle, sous l'impulsion de l'école allemande d'embryologie, dont deux des représentants les plus célèbres sont Wilhelm Roux (1850-1924) et Hans Spemann (1869-1941), l'embryologie devient expérimentale : la science de la «mécanique du développement» est créée. Les embryologistes montrent qu'une hiérarchie s'établit rapidement au sein des cellules issues de la division de l'œuf, et que certaines influent sur l'évolution de leurs voisines. Le phénomène d'interaction entre cellules et, plus précisément, d'induction est découvert. Il est confirmé par Spemann qui, avec son élève Hilde Mangold, montre qu'une région définie de l'embryon de triton est indispensable à la formation du système nerveux. Il nomme cette région l'organisateur. Ainsi, l'exécution du programme de développement fait intervenir des interactions entre les cellules de l'embryon, et ce dialogue est indispensable au développement intégré de l'ensemble.

Dès lors, on comprend que l'étude du développement embryonnaire occupe une place centrale en biologie, car elle concerne tous les aspects

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

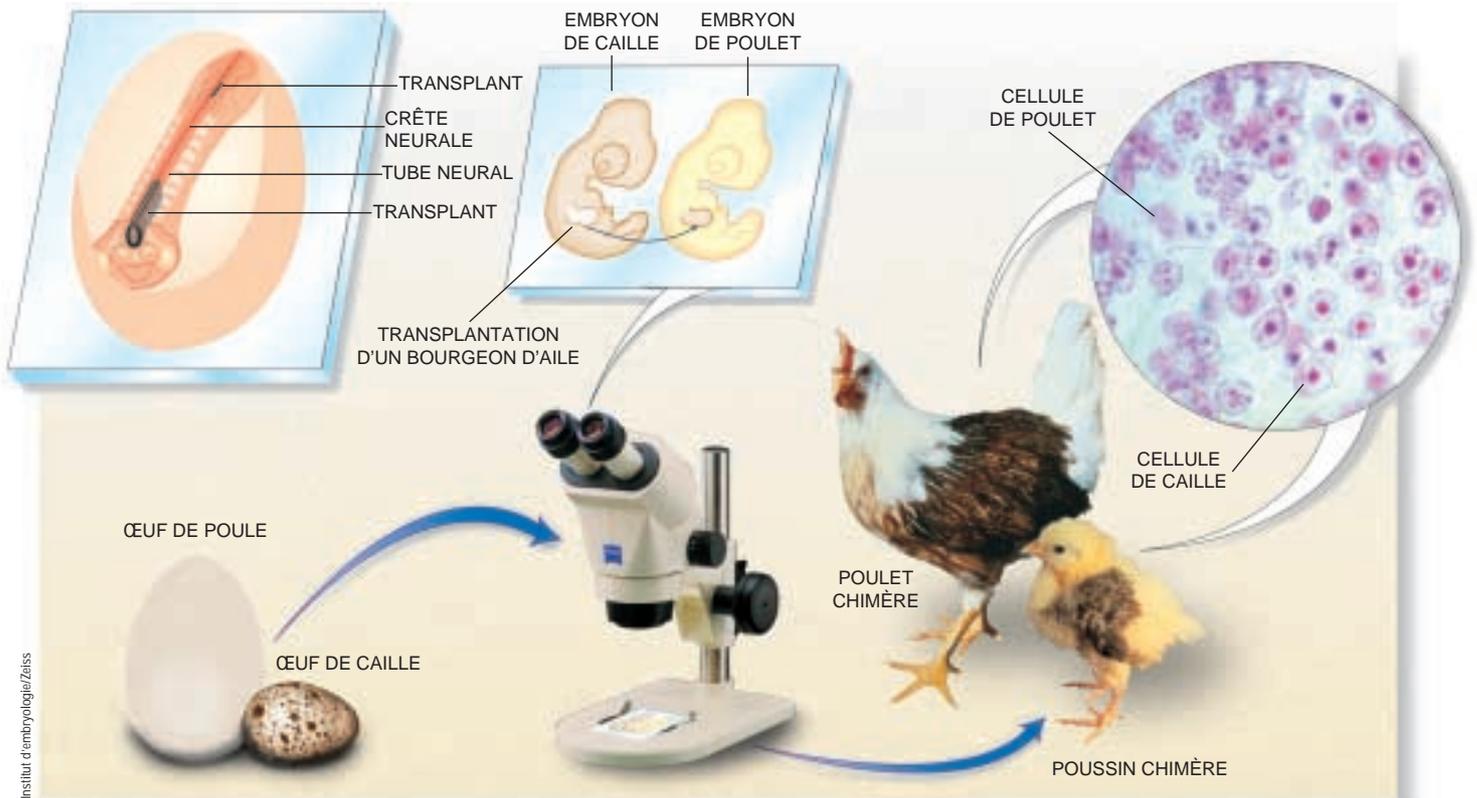
remarquable d'un domaine de la molécule, nommé homéobox ; certains motifs génétiques qui jouent un rôle clé dans les interactions moléculaires ont peu varié au cours de l'évolution. Ils ont été associés et utilisés différemment selon les groupes d'êtres vivants sans qu'un principe directeur apparent 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

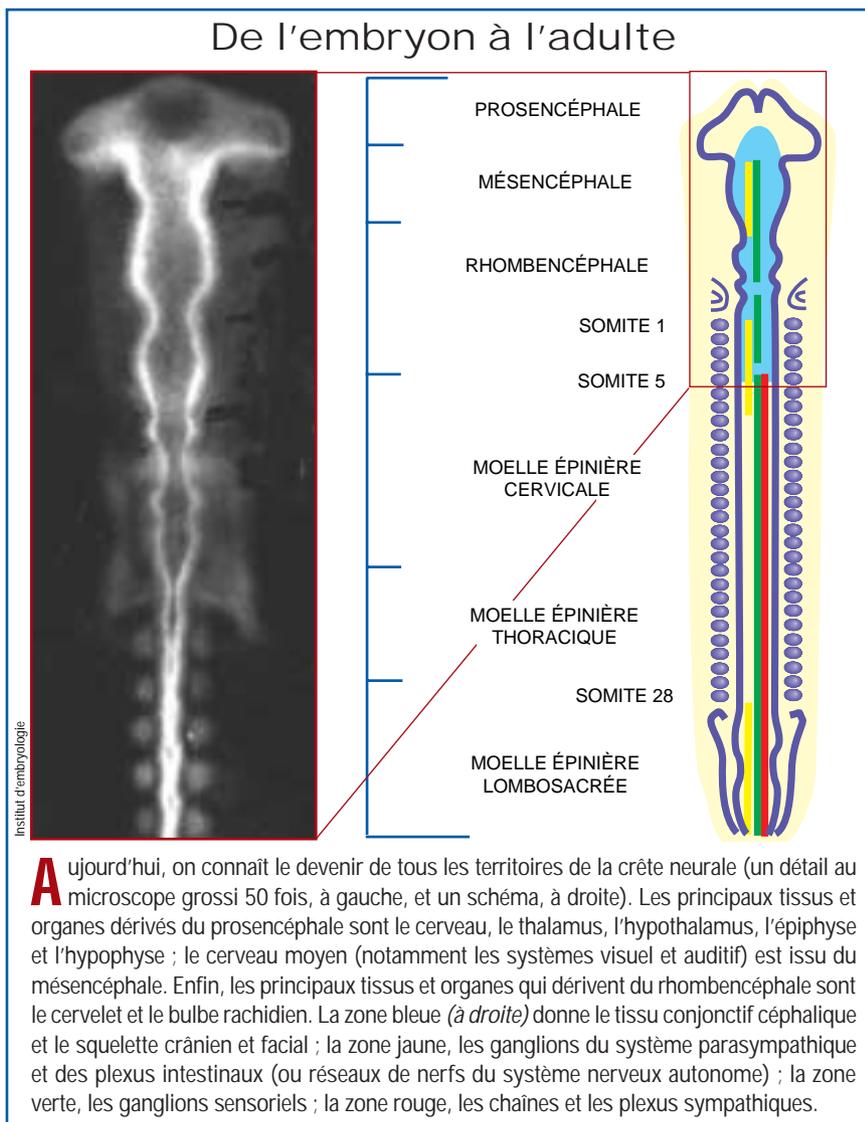
pas être toxique ; il doit rester strictement localisé dans les cellules initialement marquées et être stable, afin que le destin des cellules puisse être connu jusqu'à ce qu'elles aient atteint un stade complètement différencié.

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 carbocyanides 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



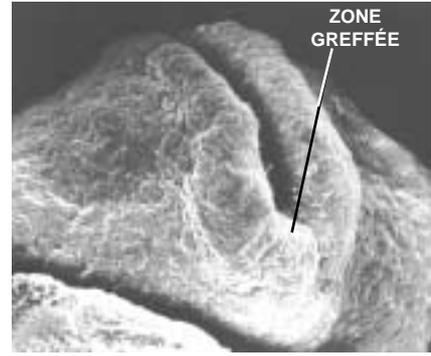
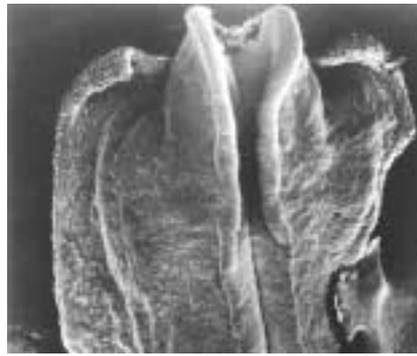
entre deux souches différentes appartenant à la même espèce ou à deux espèces différentes. La combinaison entre cellules d'individus porteurs d'un marqueur aisément identifiable peut, si le marqueur est permanent, permettre de suivre les cellules pendant toute la durée du développement embryonnaire. 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-



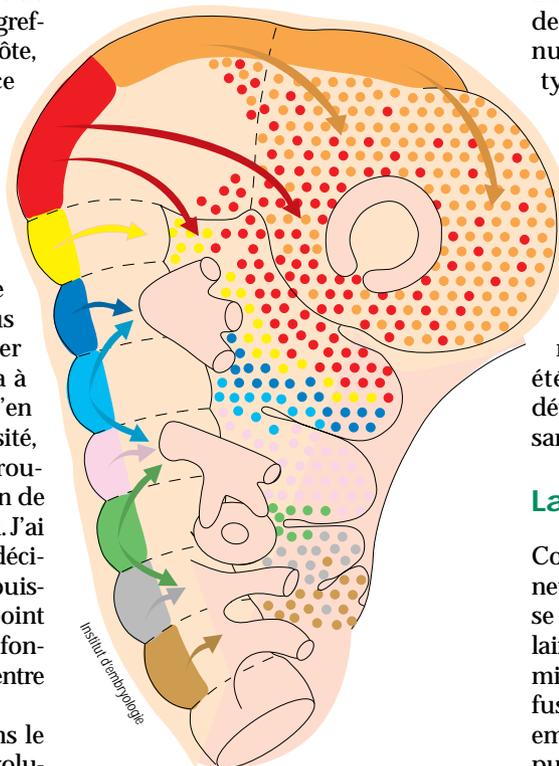
Institut d'embryologie

2. LA PLAQUE NEURALE (une couche de cellules indifférenciées) se replie au début de l'embryogenèse et les plis neuraux 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).

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

neurale chez l'embryon des vertébrés supérieurs. La méthode utilisée consiste à remplacer, chez un embryon de poulet, des fragments bien définis du territoire neural par leurs équivalents provenant d'un embryon de caille au même stade de développement.

Cette substitution, dite isotopique et isochronique, reconstitue un embryon complet, mais où une partie du «soi» est remplacé par l'équivalent provenant d'une espèce différente et qualifié de «non-soi». On construit ainsi des chimères hétérospécifiques, où les tissus de deux espèces différentes sont associés. L'état indifférencié du système immunitaire de l'embryon a pour résultat que les tissus appartenant au greffon sont acceptés, car non identifiés comme «non-soi». De plus, les interactions cellulaires, si importantes dans l'organogenèse, se déroulent normalement chez les chimères. Ceci tient certainement au fait que les deux espèces d'oiseaux mises en présence appartiennent à la famille des Gallinacés et sont proches sur le plan taxonomique.

La crête neurale est une structure particulièrement intéressante, car son développement soulève la plupart des questions posées par l'embryogenèse. Non seulement les cellules qui en sont issues sont douées de propriétés migratoires, mais elles donnent naissance à des dérivés très diversifiés. Par conséquent, comme l'œuf lui-même, à l'origine de toutes les cellules de l'organisme, la crête neurale est une structure pluripotente.

Quand j'ai commencé à m'intéresser au développement de la crête neurale, au début des années 1970, il convenait d'établir tout d'abord quels sont les différents types cellulaires qui en dérivent chez les vertébrés supérieurs et comment s'effectue la diversification des types cellulaires qu'elle produit. Il est fréquent en effet que le «choix de différenciation» de cellules pluripotentes précède l'expression morphologique ou biochimique du phénotype différencié.

Ainsi, quand une cellule est déterminée à se différencier en un type cellulaire donné, elle se différencie selon son destin normal, même si elle est expérimentalement transposée dans un environnement différent, par exemple au cours d'une greffe hétérotopique (dans un territoire de l'embryon autre que le sien).

Au contraire, lorsque la cellule n'a pas un devenir déterminé, son choix de différenciation est influencé par l'environnement dans lequel elle se trouve. Donc, en situation de greffe hétérotopique, elle se différencie en accord avec le nouveau milieu où elle se trouve plutôt que selon son devenir normal.

L'identification des voies de migration

L'exploration systématique du devenir des cellules de la crête neurale par la méthode décrite précédemment nous a permis de découvrir des dérivés de cette structure jusque-là insoupçonnés, de montrer le rôle essentiel qu'elle joue

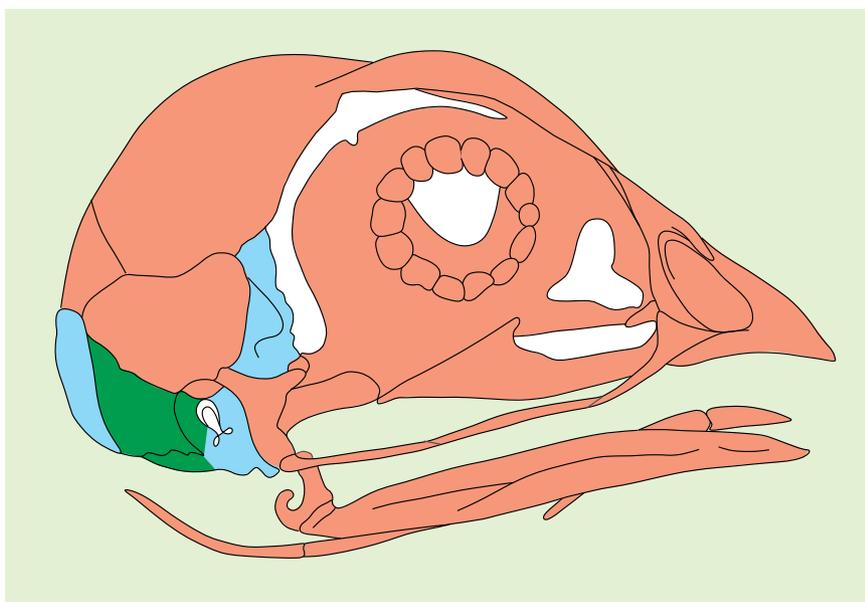
dans la formation de la tête chez les vertébrés et de connaître les niveaux précis de l'axe neural, dont chacun des dérivés de la crête neurale est issu. Les voies de migration de ces cellules à travers les tissus de l'embryon ont aussi été identifiées dans ces expériences. Enfin, les transplantations hétérotopiques de tube neural, où l'on modifie la position d'un territoire donné le long de l'axe antéropostérieur de l'embryon, ont permis de mettre en évidence le rôle décisif joué par l'environnement dans la différenciation de la plupart des dérivés de la crête neurale.

Ces expériences ont révélé qu'après transposition hétérotopique les cellules de crête atteignent les tissus cibles correspondant à leur position sur l'axe neural (et non pas ceux qu'elles colonisent en l'absence de transposition). Ensuite, elles se différencient en fonction de leur nouvel environnement plutôt qu'en fonction de leur destinée normale, régie par leur emplacement d'origine.

Une autre façon d'évaluer la pluripotentialité des cellules de crête est de les transplanter *in vitro* dans un milieu qui permet l'expression de la totalité des phénotypes auxquels elles donnent naissance chez l'embryon. Si les cellules sont transplantées isolément, elles donnent naissance, par divisions cellulaires successives, à une colonie, ou clone. Dans le cas où la cellule initiale est pluripotente, plusieurs phénotypes cellulaires sont représentés dans le clone. Au contraire, quand la cellule est monopotentielle ou bipotentielle, respectivement un ou deux types cellulaires sont présents dans le clone.

Quand elles commencent à migrer, les cellules de la crête neurale sont pour la plupart pluripotentes, c'est-à-dire que leur descendance se compose par exemple de neurones, de cellules gliales, ou de mélanocytes. *In vivo*, le «choix» de différenciation est dicté par des facteurs spécifiques des différentes régions de l'embryon : les mélanocytes se développent dans la peau, ou les neurones dans les ganglions du système nerveux périphérique. Ainsi, la différenciation des dérivés de la crête neurale dépend des interactions qui ont lieu entre les cellules de la crête et celles des tissus embryonnaires environnants.

Nous avons également étudié le rôle de la crête neurale dans l'embryogenèse de la tête chez les vertébrés supérieurs. Mes premières recherches sur ce sujet ont été effectuées en collabo-

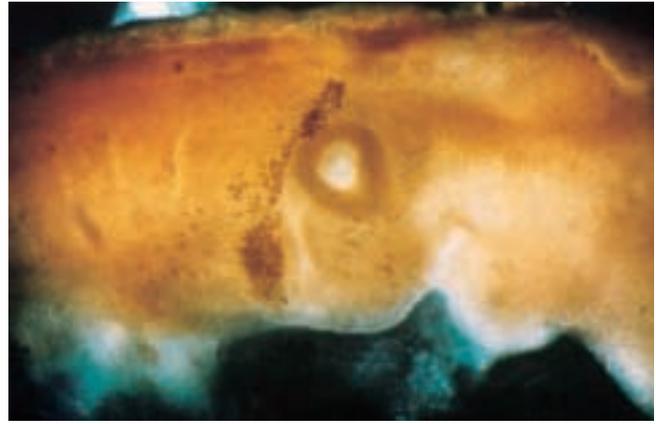


Institut d'embryologie

4. LE CRÂNE DES VERTÉBRÉS dérive, pour l'essentiel, de la crête neurale (en rouge). Les quelques zones qui ne dérivent pas de la crête neurale proviennent d'autres régions de l'embryon nommées mésenchyme céphalique (en bleu) ou mésoderme somitique (en vert).



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.

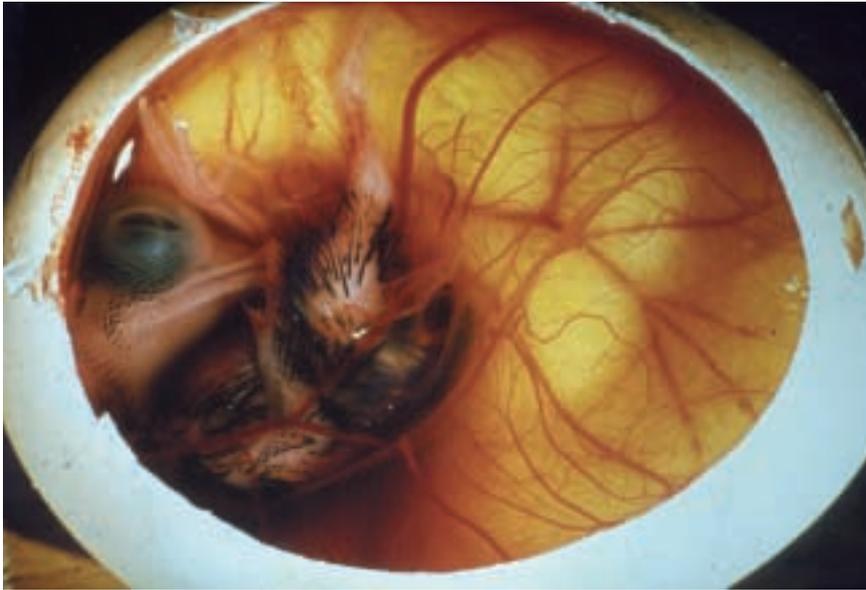
L'intégration des tissus nerveux d'embryon de caille dans le poulet étant suivie du développement normal des structures nerveuses, nous nous sommes demandé si les chimères neuronales ainsi construites sont capables d'éclore. Les premières expériences ont montré que des greffes dans le territoire de la 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, inexistants 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-

este 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

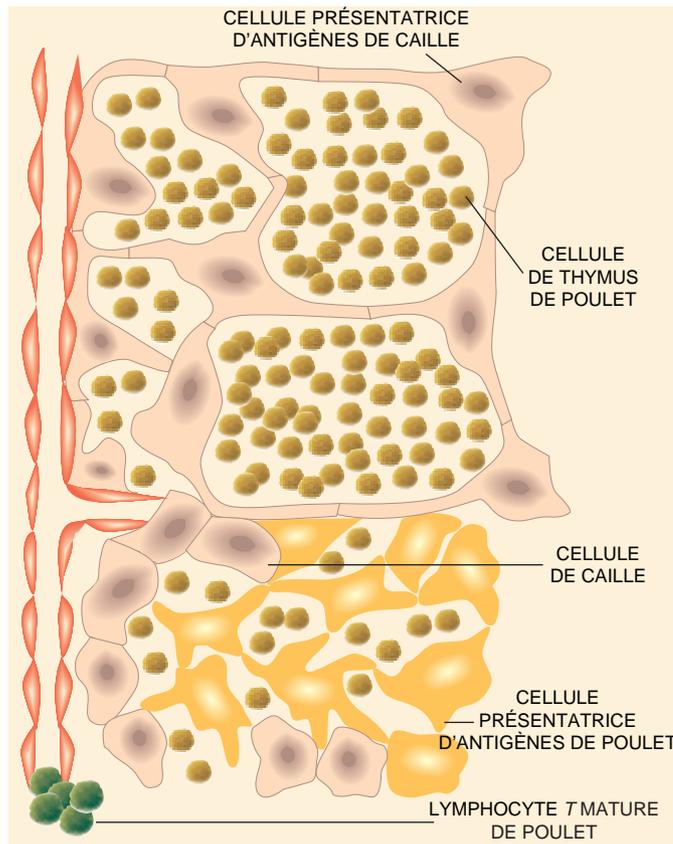
Pourquoi les cellules hématopoïétiques pénètrent-elles dans le thymus par vagues successives? Selon l'hypothèse la plus plausible, l'épithélium du thymus produit une substance chimiotactique à laquelle les cellules souches du sang circulant sont sensibles. En effet, quand l'épithélium du thymus est réceptif 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 ocre). 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 Chimaeras 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.
