

## Analyse clonale

*Le gène, la génétique moléculaire appliquée à la médecine, l'immunologie, la neurobiologie... nos lexiques ont abordé successivement certaines des disciplines les plus modernes de nos sciences. Déjà, cependant, il s'agissait plus avec la neurobiologie de faire le point de progrès particulièrement novateurs — le terme « révolutionnaire » n'est pas exagéré — que d'explorer un champ vraiment nouveau. Il en va de même avec l'embryologie, discipline relativement ancienne et traditionnelle qui a, elle aussi, pleinement bénéficié des avancées de la génétique moléculaire et de la biologie cellulaire et est aujourd'hui une composante importante de cette biologie intégrée dont les mécanismes du développement, du contrôle de la division cellulaire, de la cancérisation, de la régulation de l'expression des gènes ne sont que des aspects d'une même unité. Comprendre cependant les règles et les moteurs de*

*l'édification du plan corporel nécessite, à la fois de se replonger dans la description — vieille souvent de plus d'un demi-siècle — du développement de l'embryon, et d'intégrer les données les plus récentes concernant les gènes en cause, les migrations des cellules, les phénomènes de reconnaissance et d'adhérence cellulaires, la signalisation et le rôle de gradients de morphogènes hypothétiques, etc. Pour aider les lecteurs de m/s à cheminer des classiques aux modernes de l'embryologie, deux pasteuriens issus d'une des principales écoles d'étude du développement des mammifères, Charles Babinet et Hubert Condamine, commencent donc aujourd'hui la publication de ce nouveau lexique qui devrait nous mener jusqu'à la fin de l'année 1992. Nous nous lancerons alors dans une autre aventure, en collaboration avec la Société française de génétique, nous en reparlerons...*

L'élucidation des lignages cellulaires qui président à l'édification d'un embryon suppose, idéalement, qu'on soit à même de prédire, et ce pour n'importe quelle cellule de l'embryon, le nombre, la nature et la répartition tissulaire des descendants de cette cellule. Ce résultat idéal n'a été obtenu jusqu'à maintenant que pour le *Caenorhabditis elegans*, petit ver rond du groupe des nématodes dont l'adulte comporte un nombre fixe de cellules. Les filiations cellulaires par lesquelles on passe de l'œuf à l'adulte ont pu être suivies directement dans cette espèce par l'observation au microscope [1].

Chez d'autres espèces auxquelles s'intéresse le biologiste du développement, notamment la drosophile et les vertébrés, la connaissance qu'on a des lignages est par comparaison très lacunaire. Pourtant ce type d'analyse, généralement désignée par le terme d'analyse clonale du développement (puisque, par définition, les descendants d'une cellule particulière forment un clone), reste la source de renseignements précieux, même s'ils sont limités. Avant de voir quelques exemples d'informations dues à l'analyse clonale, il est utile de passer en revue les techniques de marquage qui en ont permis l'obtention.

### Les techniques de marquage

Dans l'idéal, la marque appliquée à une cellule dont on se propose de caractériser le clone auquel elle donne naissance doit posséder deux caractéristiques essentielles : à la faveur de mitoses successives, elle est

transmise à tous les descendants de la cellule marquée, et à eux seulement (la marque ne doit pas contaminer d'autres clones en diffusant dans les cellules qui ne dérivent pas par mitoses de la cellule marquée initiale). En outre le marquage doit être facile à mettre en évidence dans l'ensemble du clone. On verra que ces diverses exigences ne sont pas toujours satisfaites simultanément. Pratiquement, une technique simple consiste à injecter, par micromanipulation, une microquantité du marqueur dans une cellule unique, à un stade de développement pas trop avancé où les cellules de l'embryon sont souvent d'assez grande taille (ce qui rend la technique plus facile). Un exemple récent est fourni par les injections de traceurs fluorescents dans l'embryon de poisson-zèbre effectuées par Ch. Kimmel à Eugene (Oregon, USA) [2]\*. La technique est limitée par la dilution progressive du marqueur au cours des mitoses successives.

Dans d'autres cas, on a recours à un marqueur génétique. Chez la drosophile, l'irradiation aux rayons X de la larve déclenche l'apparition de *crossing-over* mitotiques entre chromosomes homologues (figure 1). Or la propriété caractéristique d'un tel *cross-over* est de produire, à l'issue de la mitose, deux cellules-filles homozygotes pour tous les marqueurs du chromosome recombiné situés entre le point d'échange et l'extrémité non

centromérique [3]. Dès lors, si un échange se produit dans une cellule hétérozygote pour un marqueur récessif  $m$  ( $m/+$ ), il en résulte une cellule-fille homozygote  $m/m$ , fondatrice d'un clone où va s'exprimer le phénotype du marqueur récessif. Une particularité de cette technique est qu'elle ne donne lieu à aucune dilution de marquage : un clone initié par irradiation, à tel moment du développement embryonnaire ou larvaire, peut être observé longtemps après dans les organes de la mouche adulte.

Une technique très semblable a pu être utilisée pour le marquage de clones rétiniens chez le poisson-zèbre [4]. Chez la souris, où les *cross-over* mitotiques existent très vraisemblablement mais sont plus difficiles à mettre en évidence que chez la drosophile [5], d'autres types de marquage génétique sont possibles [3]. L'un d'eux consiste à placer, par micromanipulation parmi les cellules d'un embryon de génotype  $a/a$  pour un locus donné, une cellule unique d'un embryon donneur, de génotype  $b/b$ , au même locus. Cette cellule initie un clone dans l'embryon receveur, dont on pourra suivre la distribution grâce au marqueur  $b$ . En pratique, ce type d'expérience est réalisé avec des embryons pris à des stades précoces antérieurs à l'implantation (*morula* ou blastocyste). Le marquage clonal à des stades postérieurs à l'implantation est plus difficile mais a pu être obtenu en utilisant des rétrovirus (voir plus bas). Les marqueurs utilisés sont le plus

souvent des allèles codant pour des variants de migration électrophorétique faciles à mettre en évidence sur gel. Un exemple est fourni par la glucose-phosphatase isomérase (GPI) dont on connaît deux versions alléliques, respectivement lente et rapide. La proportion de forme lente dans l'extrait d'un tissu homozygote pour l'allèle rapide, et qu'on soupçonne d'être colonisé par un clone « lent », donne une estimation du niveau de la colonisation en question. L'inconvénient est qu'on ne peut visualiser de cette façon la disposition relative des cellules « lentes » et « rapides » au sein du tissu. Mais il existe des variants alléliques de certaines protéines cellulaires, notamment la  $\beta$ -glucuronidase, qui sont révélables par histochimie sur coupes et permettent d'obtenir ce résultat. En outre, d'autres types de marqueurs moléculaires révélables *in situ* sont parfois disponibles. Par exemple, des sondes d'ADN isolées à partir de *Mus musculus* reconnaissent l'ADN satellite de *M. musculus* mais pas de *M. caroli*. L'expansion clonale d'une cellule de *M. caroli* injectée dans un blastocyste de *M. musculus*, peut être révélée sur coupe dans n'importe quel tissu de l'embryon après implantation, par hybridation avec une telle sonde [6]. De même, l'insertion en un site unique d'un transgène comportant un grand nombre de copies en tandem a pu être utilisée pour identifier le génotype cellulaire sur coupe par hybridation [9] (pour un exemple d'utilisation de ce marqueur : [10]). Enfin, une autre manière d'obtenir

\* Voir aussi *m/s* n° 6, vol. 7, p. 553-60.

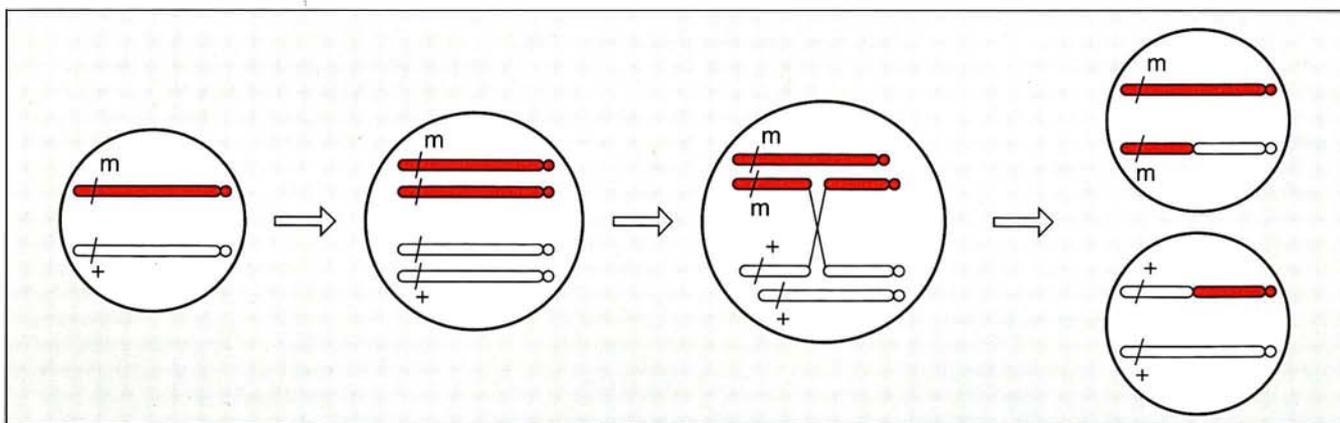


Figure 1. **La révélation des compartiments de développement par marquage clonal.** Marquage par *crossing-over* somatique : une cellule hétérozygote pour le marqueur récessif  $m$  donne, après *crossing-over* deux cellules filles homozygotes,  $m/m$  et  $+/+$ . Le lignage  $m/m$  exprime le phénotype récessif dû à  $m$ .

un marquage génétique clonal dans l'embryon de souris consiste à recourir aux rétrovirus, principalement dérivés de *MuLV* (*murine leukemia virus*) [7]. L'infection d'une cellule embryonnaire par une particule *MuLV* déclenche un cycle viral qui comporte notamment : la pénétration de l'ARN génomique viral dans le cytoplasme de la cellule infectée, la transcription inverse de cet ARN en ADN, le transfert de l'ADN dans le noyau et sa circularisation, l'intégration de l'ADN circulaire dans l'ADN de la cellule hôte en un site au hasard. Dès lors cette copie provirale intégrée fonctionne comme un nouveau marqueur stable dont la présence dans les cellules d'un tissu peut par exemple être révélée par hybridation sur filtre de l'ADN extrait du tissu avec une sonde appropriée. Comme dans le cas de la glucose-phosphate isomérase, la révélation du marqueur aboutit à détruire l'organisation du tissu. A cet inconvénient s'en ajoute un autre qui tient à ce que les fonctions codées par le rétrovirus commencent à être exprimées dans les cellules de l'embryon vers le 9<sup>e</sup> jour de l'embryogenèse (qui dure 20 jours chez la souris) [8]. Dès lors de nouvelles particules virales sont produites qui vont pouvoir infecter et marquer des cellules n'appartenant pas au clone marqué initial. Il y a en somme diffusion du marquage au-delà des limites du clone. Ces deux inconvénients peuvent être évités par l'emploi d'un *MuLV* défectueux (*defective*) dont un ou plusieurs gènes ont été délétés et remplacés par un gène codant pour une protéine facile à mettre en évidence *in situ* (on choisit souvent le gène *lac Z* d'*Escherichia coli*, qui code pour une enzyme, la  $\beta$ -galactosidase, révélable par une réaction colorée *in situ*). Des stocks de particules infectieuses dans lesquelles est encapsidé le génome défectueux peuvent être produits *in vitro* à l'aide de systèmes cellulaires appropriés. Les cellules d'un embryon placé dans un milieu contenant de telles particules peuvent être infectées et donner lieu à toutes les étapes initiales du cycle viral, jusqu'à (et y compris) l'intégration du provirus défectif dans l'ADN de l'hôte. Par la suite, ce provirus ne peut donner lieu à l'apparition de nouvelles particules infectieuses,

puisqu'il est défectueux et non complété dans les cellules de l'embryon : ainsi la « diffusion » du marquage est empêchée. En revanche, le gène *lac Z* va se trouver exprimé sous le contrôle du promoteur viral qu'on a laissé dans la construction défective. En fait, on trouve là la limitation propre à cette technique puisque le promoteur n'est actif dans les cellules embryonnaires qu'à partir du jour 9 : on ne peut donc révéler le marquage clonal avant ce moment de l'embryogenèse. A côté de ces techniques de marquage clonal proprement dit, on peut rappeler que les expériences classiques d'obtention de souris chimériques par agrégation d'embryons génétiquement distincts au stade *morula*, réalisent des marquages dont la particularité est que, dès le départ, ils sont polyclonaux. Ces expériences peuvent néanmoins fournir des informations du même type que celles obtenues par des marquages clonaux à des stades antérieurs à l'implantation [3] ■

Hubert Condamine,

Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux,  
75015 Paris, France.

## RÉFÉRENCES

1. Sulston J. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. In : Wood WB, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
2. Kimmel CB, Warga RM. Cell lineage and developmental potential of cells in the zebrafish embryo. *Trends Genet* 1988 ; 4 : 68-74.
3. Wilkins AS. *Genetic Analysis of Animal Development*. New York : Wiley, 1986.
4. Streisinger G, Coale F, Taggart C, Walker C, Grunwald DJ. Clonal origins of cells in the pigmented retina of the zebrafish eye. *Dev Biol* 1989 ; 131 : 60-9.
5. Panthier JJ, Condamine H. Mitotic recombination in mammals. *Bioessays* 1991 ; 13 : 351-6.
6. Rossant J, Vijn KM, Siracusa LD, Chapman VM. Identification of embryonic cell lineages in histological sections of *M. musculus*-*M. caroli* chimaeras. *J Embryol Exp Morphol* 1983 ; 73 : 179-91.
7. Price J. Retroviruses and the study of cell lineage. *Development* 1987 ; 101 : 409-19.
8. Savatier P, Morgenstern J, Bedington RSP. Permissiveness to murine leukemia virus expression during preimplantation and early post implantation development. *Development* 1990 ; 109 : 655-65.
9. Lo CW. Localization of low abundance DNA sequences in tissue sections by *in situ* hybridization. *J Cell Sci* 1986 ; 81 : 143-62.
10. Thomson JA, Solter D. Chimeras between parthenogenetic or androgenetic blastomeres and normal embryos : allocation to the inner cell mass and trophectoderm. *Dev Biol* 1989 ; 131 : 580-3.

### \*GLOSSAIRE\*

**Blastomère** : Les premières divisions de l'œuf produisent des cellules dont la taille diminue au fur et à mesure des divisions. Dans le même temps, la taille de l'embryon reste constante. On passe ainsi progressivement d'une très grande cellule (l'œuf) à des cellules embryonnaires de taille banale. Les blastomères sont ces cellules intermédiaires issues du clivage de l'œuf.

**Blastula** : Désigne l'embryon à la fin du clivage de l'œuf. A ce stade, l'organisation de l'embryon consiste souvent en une sphère creuse de cellules disposées en une couche (le **blastoderme**) autour d'une cavité (le **blastocèle**). Exemple : la blastula des amphibiens.

**Blastodisque** : Lorsque l'œuf est de très grande taille (oiseaux, poissons), les divisions de clivage sont partielles et ne segmentent pas la masse de substances de réserve (vitellus) dont l'œuf est pourvu.

Il se forme un disque de cellules qui recouvrent un pôle de l'œuf. C'est le **blastodisque**.

**Blastocyste** : Chez les mammifères, la fin du clivage aboutit à un embryon comportant une couche sphérique de cellules épithéliales dont les descendants auront une destinée purement extra-embryonnaire (**trophectoderme**) et un petit massif de cellules, logées sous le trophectoderme, en un pôle de la sphère (**masse cellulaire interne**), et dont les descendants édifieront l'embryon. Ce stade est appelé **blastocyste**.

**Morula** : Chez les mammifères, aux stades intermédiaires du clivage, l'embryon comporte 8-16 cellules agencées en une masse pleine dont la forme rappelle une petite mûre, en latin **morula**. D'où le nom donné à ce stade, auquel succédera le stade **blastocyste**.