

## Analyse clonale (suite) Les enseignements de l'analyse clonale

### Types de croissances clonales

Les cellules d'un clone marqué peuvent rester groupées au fur et à mesure des divisions cellulaires : on parle alors de croissance clonale cohérente. Dans d'autre cas, la croissance du clone est caractérisée par la dispersion de ses cellules au sein des tissus environnants (croissance clonale non cohérente). Le premier cas se rencontre chez la drosophile : des clones marqués très tôt au cours des stades larvaires ou même au cours de l'embryogenèse apparaissent dans les organes de l'adulte sous forme de groupes cellulaires compacts dont le dénombrement, lorsqu'il s'agit de clones répartis à la surface des organes, peut être relativement aisé. Les vertébrés sont au contraire caractérisés par une croissance clonale non cohérente. Par exemple, dans des souris-chimères issues de l'agrégation de deux morulas génétiquement distinctes, Wetts et Herrup ont pu (au prix d'un labeur considérable) évaluer à environ 100 000 le nombre total des cellules de Purkinje présentes dans le cervelet. Lorsqu'une mutation qui tue les précurseurs de ces cellules très tôt dans le développement (mutation *Lurcher*) est présente dans le génotype de l'une des morulas, on observe une diminution de ce nombre dans la chimère, due vraisemblablement à la disparition de tous les clones fondateurs qui se trouvaient porteurs de la mutation *Lurcher* [1]. Pourtant les cellules de Purkinje présentes (non *Lurcher*) continuent à être réparties uniformément dans le cervelet, où elles forment seulement une population moins dense. Même avec des marquages brefs, obtenus par injection de MuLV-lac Z dans le sac vitellin d'un embryon de 8 à 9 jours, et révélés 24 à 48 heures plus tard, les clones colorés de petite taille (moins de 10 cellules)

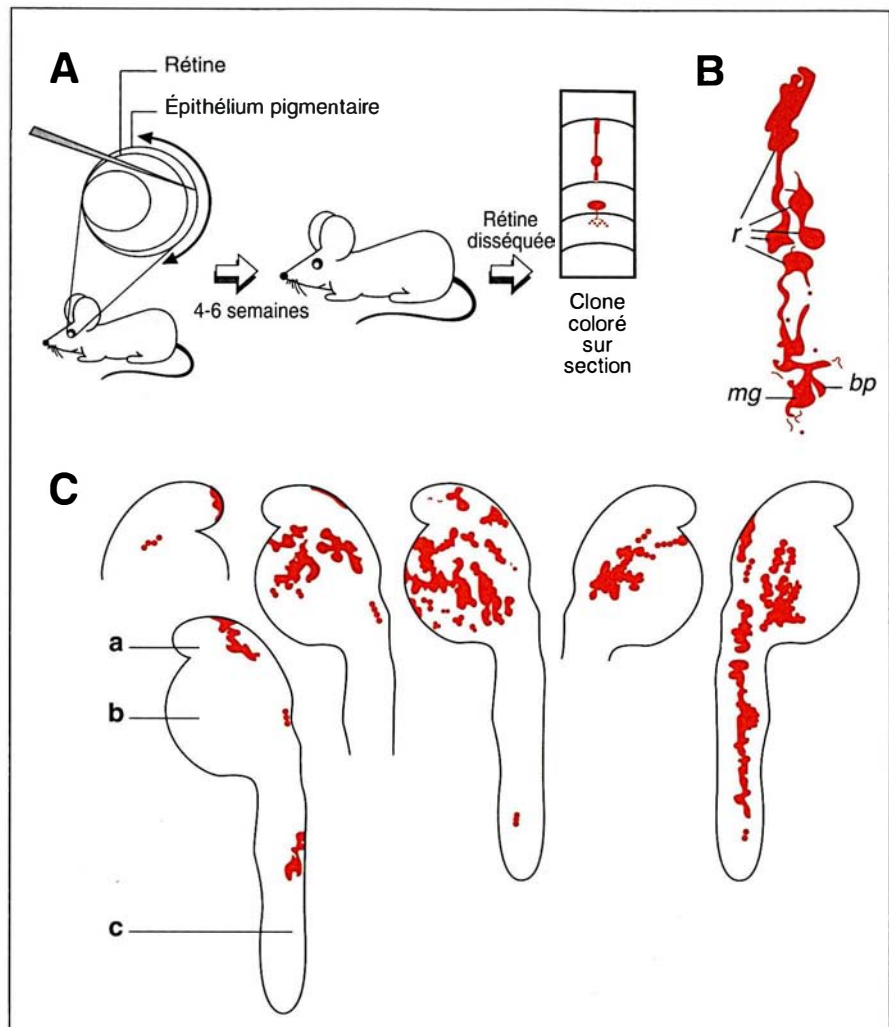


Figure 1. Marquage clonal chez le rat nouveau-né (A,B) et dans l'embryon de poisson zèbre (C). (A) Protocole de l'expérience de Turner et Cepko [6]. Des particules de MuLV-lac Z sont injectées au niveau de la rétine du rat nouveau-né. La rétine, disséquée chez l'adulte, est fixée et sectionnée transversalement. Une coloration appropriée révèle l'activité  $\beta$ -galactosidase et les clones marqués. (B) Schéma d'un clone marqué, de taille exceptionnelle, comportant cinq cellules en bâtonnet (r), une cellule de Müller (mg) et un neurone bipolaire (bp). (C) Clones dans l'embryon de poisson zèbre, marqués par injection d'un traceur fluorescent dans une cellule du stade à 32 cellules. Après marquage de la même cellule dans une série d'embryons, des clones de distribution très variable sont observés : le développement, à ce stade, est indéterminé. a : région céphalique ; b : vésicule vitelline ; c : région caudale. (A) (B) d'après Turner et Cepko [6] ; (C) d'après Kimmel et Warga [5].

E  
U  
O  
I  
X  
E  
7

que l'on observe sont plus ou moins disséminés parmi les cellules avoisinantes [2]. La gastrulation — qui, chez les vertébrés, met en jeu de très importantes migrations cellulaires — contribue beaucoup au brassage des clones, mais la croissance clonale non cohérente reste de règle dans la plupart des organes dont les cellules fondatrices sont mises à part après la gastrulation. Les clones de mélanocytes, que l'on repère dans le pelage de souris-chimères où coexistent des lignages albinos et colorés [3] et la structure clonale cohérente de l'épithélium des cryptes intestinales sont de rares exceptions connues à cette règle [4].

#### Détermination cellulaire et restriction des potentialités

Un problème important est celui de la détermination cellulaire, phénomène par lequel une cellule et ses descendants sont affectés à réaliser, plus tard dans le développement, un programme de différenciation  $x$ , à l'exclusion de programmes  $y$ ,  $z$ , etc., que les ancêtres de la cellule considérée gardaient la possibilité d'exprimer. Dans l'embryon, les déterminations cellulaires successives ferment donc progressivement l'éventail des potentialités qui caractérisent les cellules embryonnaires précoces. Par définition, une cellule est déterminée pour un programme  $x$  si, quelles que soient les conditions de milieu où elle est placée, elle exprime le programme  $x$  et rien d'autre. En conséquence, si une cellule marquée donne un clone où les cellules expriment respectivement des programmes distincts, neuronaux, musculaires, etc., c'est la preuve que la cellule marquée initiale n'était pas déterminée pour l'expression exclusive de l'un de ces programmes. A l'inverse, un clone dont toutes les cellules expriment le programme  $x$  provient d'une cellule initiale dont la détermination n'est pas prouvée pour autant : il se peut en effet que cette cellule, placée dans un environnement différent (dans l'embryon ou *in vitro*) exprime d'autres programmes.

Le caractère non déterminé des cellules embryonnaires précoces du poisson zèbre a reçu une très belle illustration récente due à Ch. Kimmel et à ses collaborateurs [5] (figure 1). Après marquage par l'injection d'une

substance fluorescente, une cellule de la blastula (stade 32 à 64 cellules) donne des descendants qui, après l'organogenèse, se distribuent au long de l'axe antéro-postérieur (pas de restriction régionale), indifféremment dans des dérivés neurectodermiques et mésodermiques (pas de restriction tissulaire).

Un autre cas très intéressant est celui de la rétine du rat nouveau-né, dont l'histogenèse a été suivie par l'analyse clonale dans les expériences de C. Cepko *et al.* [6] (figure 1). Le marquage était réalisé par injection dans la rétine du nouveau-né de MuLV défectueux, vecteur du gène *lac Z*. L'analyse histochimique de la rétine adulte révèle des clones qui, en dépit de leur faible taille (deux ou trois cellules en moyenne), sont étonnamment diversifiés et contiennent presque toujours deux et même trois des quatre types cellulaires qui se différencient dans la rétine après la naissance : cellules en bâtonnet, cellules amacrines, bipolaires, et de la glie de Müller. C'est un exemple remarquable de détermination ayant lieu très tard dans le développement de façon à peu près concomitante avec l'expression de la différenciation.

Chez la souris, le même marquage par MuLV-*lacZ*, mais beaucoup plus tôt au cours du développement embryonnaire (jours 7 à 9) met au jour des restrictions clonales probablement dues à des déterminations successives [2]. Injecté au jour 7 dans la cavité vitelline, *lac Z* marque des clones du feuillet mésodermique dans la paroi du sac vitellin. Examinés au jour 11, ces clones expriment toutes les différenciations mésodermiques : mésothélium, endothélium des capillaires, fibroblastes. En revanche, le marquage au jour 9 semble donner des clones qui contiennent soit des cellules endothéliales et des fibroblastes, soit du mésothélium, mais pas les trois types ensemble. Certains clones marqués au jour 9 semblent n'exprimer que la différenciation fibroblastique. Il est évidemment tentant de voir là le reflet de déterminations se succédant entre les jours 7 et 9.

#### Les compartiments de développement

La notion de compartiment a été proposée il y a une quinzaine

d'années pour rendre compte de résultats obtenus chez la drosophile à l'aide de marquages clonaux (par induction de *crossing-over* mitotiques) [7]. Un compartiment de développement est constitué par les cellules de plusieurs clones, dérivés chacun d'une cellule fondatrice initiale. Ce « polyclone » est affecté à l'élaboration d'un morceau précis de la mouche, par exemple la moitié antérieure de l'aile, et il est caractérisé par son autonomie ou, si l'on veut, sa fermeture à l'égard des cellules environnantes : le compartiment antérieur de l'aile ne peut s'accroître en recrutant des cellules dans les compartiments voisins, et réciproquement, il ne peut pas participer à l'élaboration de ces derniers. Une cellule marquée par *crossing-over* dans le compartiment antérieur donnera naissance à un clone situé tout entier à l'intérieur de celui-ci. Cette restriction géographique est particulièrement frappante lorsque la limite entre deux compartiments ne correspond à aucune frontière anatomique particulière. C'est le cas des compartiments antérieur et postérieur de l'aile, distribués de part et d'autre d'une ligne mise en évidence seulement lorsqu'un clone vient buter contre elle (figure 2).

A *contrario*, l'existence de cette frontière est illustrée par le fait que certaines mutations peuvent l'abolir. Par exemple, l'activité du gène *engrailed* est nécessaire au maintien de la compartimentation antéro-postérieure de l'aile [8]. En conséquence, un clone marqué que l'on s'arrange pour rendre en même temps homozygote pour une mutation *engrailed* peut franchir la frontière. On notera que les restrictions des potentialités liées à l'établissement des compartiments sont géographiques (ou, si l'on préfère, de position) mais ne concernent pas l'expression de la différenciation. Dans l'aile, les cellules sont soit antérieures, soit postérieures, mais les unes et les autres expriment les mêmes différenciations.

Il est remarquable que les compartiments, que l'on pensait caractéristiques de l'organisation « en pièces détachées » de la mouche, semblent pouvoir être retrouvés dans l'embryon de vertébré. Des unités segmentaires (appelées rhombomères) ont été récemment bien caractérisées



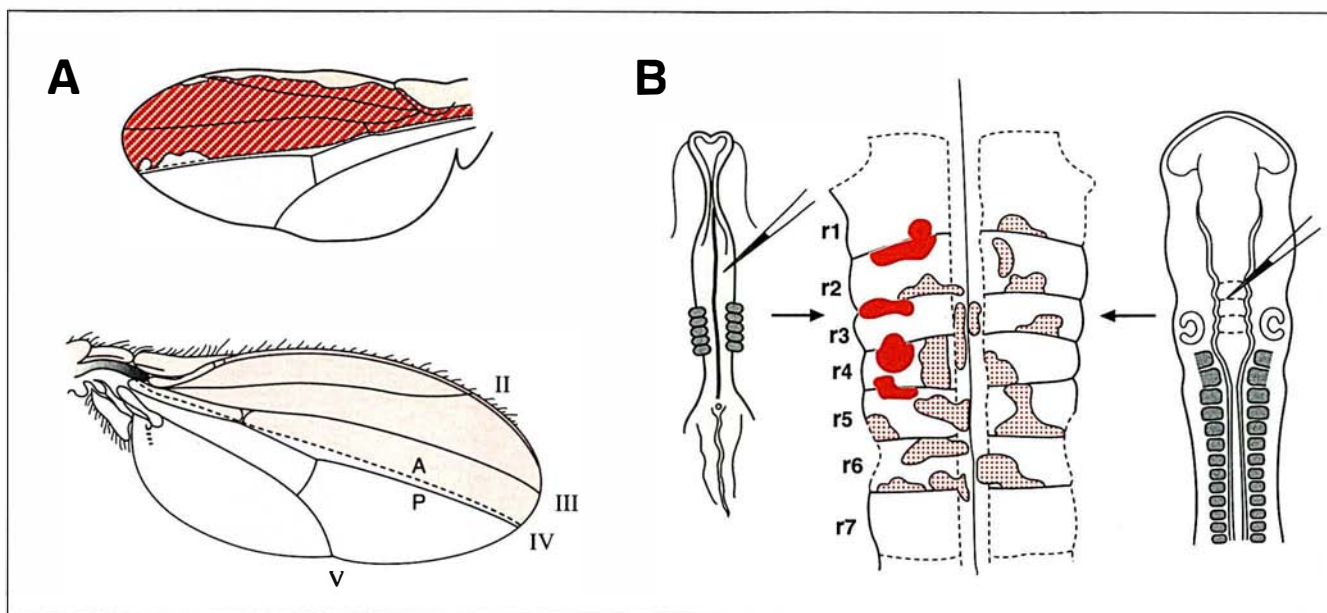


Figure 2. La révélation des compartiments de développement par marquage clonal. (A) Schéma d'une aile de drosophile, avec un clone marqué du compartiment antérieur (en haut). Sur l'aile du bas, la ligne pointillée indique la limite entre compartiments antérieur (A) et postérieur (P) : elle ne se confond avec aucune des nervures II, III, IV. (B) Marquage clonal dans le cerveau postérieur de l'embryon de poulet par injection d'un traceur fluorescent. A gauche, l'injection a lieu au stade à 5 somites et donne des clones dont certains (en rouge) chevauchent deux rhombomères successifs (r1 à r7). A droite, l'injection plus tardive ne donne plus de clones chevauchants. Chaque rhombomère pourrait être un compartiment. (A) d'après Lawrence et Morata [8] ; (B) d'après Fraser et al. [9].

dans le cerveau postérieur de l'embryon de poulet [9] et aussi de souris [10]. Des marquages clonaux, par injection d'un traceur fluorescent, réalisés chez le poulet mettent en évidence des restrictions géographiques à l'expansion des clones, très semblables à celles observées chez la drosophile, et suggèrent que chaque rhombomère pourrait être fait de deux compartiments, disposés de part et d'autre de la ligne médiane (figure 2). La preuve définitive nécessiterait que l'on puisse abolir, comme chez la drosophile, cette compartimentation supposée par des mutations spécifiques.

#### Numérologie du développement

Un problème important pour la biologie du développement consiste à savoir combien de cellules fondatrices sont, au départ, affectées à l'expression d'un programme de différenciation ou à la construction d'un organe donné. L'analyse clonale peut fournir des réponses à cette question, particulièrement lorsqu'on a affaire à un embryon dont la croissance clonale est cohérente. Supposons que l'on marque une cellule fondatrice du compartiment antérieur de l'aile de

la mouche au moment où a lieu la détermination de cette cellule. Cela donnera lieu à l'apparition d'un clone qui recouvre une fraction  $1/n$  de la surface de l'aile adulte. Si l'on admet que toutes les cellules fondatrices sont déterminées en même temps et qu'elles donnent naissance à des clones se développant tous à la même vitesse, on déduit que  $n$  cellules fondatrices sont requises pour édifier l'aile. Les *pools* cellulaires à l'origine de divers disques imaginaux ont été estimés de la sorte. Ces *pools* paraissent toujours être très petits : une dizaine de cellules, au plus, sont allouées, au départ, à l'édification du disque imaginal de l'aile ou de l'antenne, peu après le stade blastoderme [11].

Chez les vertébrés, où la croissance clonale non cohérente est presque toujours de règle, de telles estimations sont beaucoup plus délicates. En outre, chez la souris, l'analyse est souvent compliquée par le recours à des marquages « polyclonaux », résultant par exemple de l'agrégation de deux *morula* génétiquement distinctes. Dans ce dernier cas, le moment du marquage est fixe et très antérieur

aux déterminations qui allouent des cellules fondatrices à la construction des divers organes. Ces déterminations se passent dans des *pools* que l'on peut considérer comme tirés au sort dans une population formée du mélange de deux génotypes en égale proportion. Si, par exemple, trois cellules fondatrices sont tirées au sort, la probabilité qu'elles soient toutes de l'un ou de l'autre génotype est 25 %. On voit par là que la distribution des organes formés d'un seul génotype peut conduire à une estimation du *pool* fondateur (s'il n'est pas trop grand). La structure clonale de l'embryon de vertébré, comme les techniques encore limitées dont on dispose pour l'étudier, rendent de toute façon ces estimations assez hasardeuses le plus souvent. Elles suggèrent néanmoins que les *pools* fondateurs, comme chez la drosophile, sont petits : une trentaine de cellules seraient à l'origine des mélanocytes, une dizaine seulement pour les cellules de Purkinje [1, 3].

#### Conclusion

Issue de l'embryologie classique et de l'établissement de cartes des territoi-

res présomptifs, notamment par des marquages colorés vitaux, l'analyse clonale a été renouvelée par le recours à des techniques de marquage génétique. En dépit de leur relative sophistication, ces techniques sont loin d'avoir abouti à la description intégrale de l'histoire clonale du développement précoce, tant chez la drosophile que chez les vertébrés. Leur intérêt reste pourtant considérable parce qu'elles seules permettent de suivre *in vivo* l'apparition des restrictions de potentialités que subissent les cellules embryonnaires. Les progrès substantiels réalisés récemment font espérer que la part respective qui revient au lignage et à la position des cellules dans l'embryon, pour régler leur détermination, continuera à être de mieux en mieux comprise ■

#### Hubert Condamine

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

#### RÉFÉRENCES

1. Wetts R, Herrup K. Cerebellar Purkinje cells are descended from a small number of progenitors committed during early development : quantitative analysis of Lurcher chimeric mice. *J Neurosci* 1982 ; 2 : 1494-8.
2. Sanes JR, Rubenstein JLR, Nicolas JF. Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J* 1986 ; 5 : 3133-42.
3. Mintz B. Gene control of mammalian pigmentary differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967 ; 58 : 344-51.
4. Ponder BAJ, Wilkinson MM, Wood M. H-2 antigens as markers of cellular genotype in chimaeric mice. *J Embryol Exp Morphol* 1983 ; 76 : 83-93.
5. Kimmel CB, Warga RM. Indeterminate cell lineage of the zebrafish embryo. *Dev Biol* 1987 ; 124 : 269-80.
6. Turner D, Cepko C. Cell lineage in the rat retina : a common progenitor for neurons and glia persists late in development. *Nature* 1987 ; 328 : 131-6.
7. Garcia-Bellido A, Ripoll P, Morata G. Developmental compartmentalization of the wing disk of *Drosophila*. *Nature New Biol* 1973 ; 245 : 251-3.
8. Lawrence PA, Morata G. Compartments in the wing of *Drosophila* : a study of the engrailed gene. *Dev Biol* 1976 ; 50 : 321-37.
9. Fraser S, Keynes R, Lumsden A. Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature* 1990 ; 344 : 431-4.
10. Wilkinson DG, Bhatt S, Chavrier P, Bravo R, Charnay P. Segment-specific expression of a zinc-finger gene in the developing nervous system of the mouse. *Nature* 1989 ; 337 : 461-4.
11. Wieschaus E, Gehring W. Clonal analysis of primordial disc cells in the early embryo of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 1976 ; 50 : 249-63.