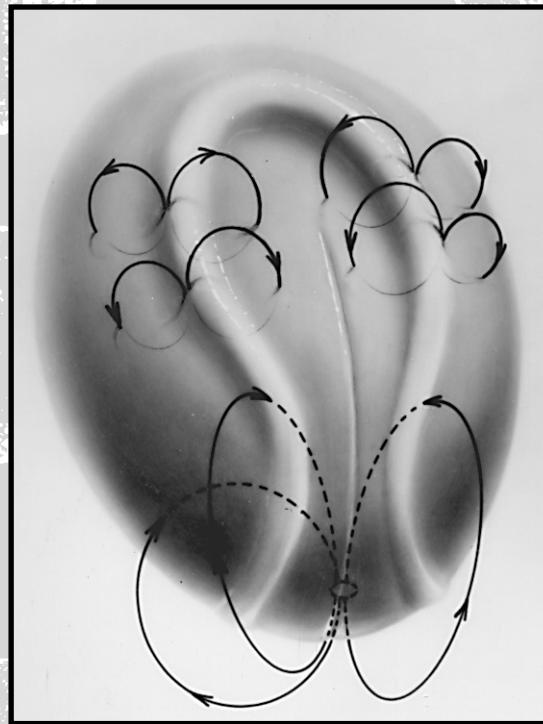


Comment les champs électriques façonnent l'embryon

COLIN LOWRY



Contrairement à la vision prévalant aujourd'hui en biologie, le développement embryonnaire est contrôlé par des champs électriques, dont l'existence réelle est ignorée par les réductionnistes de la biologie moléculaire.

A l'arrière-plan, différentes phases du développement embryonnaire de l'axolotl.
Au centre, schéma des courants ioniques traversant un embryon d'amphibien.

Au début des années 70, le biophysicien Lionel Jaffe se demandait comment un embryon crée l'axe du corps qui différencie la tête de la queue, ou le haut du bas. La première cellule de l'embryon paraît être symétrique. En se développant, l'embryon doit créer des asymétries ainsi que des singularités conduisant au plan du corps et, finalement, à la formation de types de cellules spécialisées. Comment l'embryon établit-il sa propre polarité ? Ces questions importantes ont guidé les scientifiques du XIX^e dans leurs études de l'organisation des systèmes vivants mais elles ont toutefois été largement ignorées au cours du XX^e siècle.

A l'université de Purdue, Jaffe s'efforçait de répondre à ces questions en étudiant les œufs fertilisés de fucus, un végétal semblable aux plantes marines. Le fucus, contrairement à de nombreuses espèces animales, ne possède pas d'axe préétabli dans l'œuf et ne crée le premier axe qu'après la fertilisation. Jaffe s'était plongé dans les documents et expériences de ces deux derniers siècles concernant les potentiels électriques et les systèmes vivants. Il se rappela qu'Elmer Lund, grâce à des expériences effectuées sur des fucus dans les années 20, avait trouvé que des facteurs externes influençaient la création de l'axe du corps. Normalement, l'exposition à la lumière, en provoquant une division inégale de la première cellule, peut déterminer la direction de cet axe dans le fucus. Lund a également cultivé des embryons de fucus dans le noir et, en appliquant un faible courant dans l'eau du milieu, il observa que ce courant pouvait aussi déterminer l'axe corporel.

Réfléchissant sur les résultats de Lund, Jaffe se demandait si les embryons du fucus créaient eux-mêmes un courant électrique capable d'établir une polarité et déterminer l'axe du corps. Il conçut alors une série d'expériences pour vérifier l'hypothèse selon laquelle les embryons créaient des courants électriques circulant en eux et autour d'eux. Pour pouvoir mesurer la force et la direction de ces courants électriques, Jaffe et son élève Richard Nuccitelli mirent au point en 1974 une microsonde à extrémité vibrante ultrasensible. Jaffe a ainsi pu mesurer des courants ioniques infimes circulant dans le milieu aqueux où se trouvaient les embryons de fucus, et a

découvert que ces courants suivaient une boucle à travers les embryons, établissant ainsi l'axe corporel.

Les résultats de Jaffe relançaient les études sur le rôle des champs électriques dans l'orientation du développement embryonnaire et dans le processus de régénération des membres. A présent armés d'un équipement plus moderne pour mesurer les courants bioélectriques, les élèves de Jaffe pouvaient tenter de répondre aux questions sur la manière dont les champs électriques peuvent influencer la migration d'une cellule, la guérison d'une blessure, la formation du plan de l'embryon et la façon dont les cellules peuvent « connaître » leur position dans un embryon. Cette approche était en opposition complète avec les visions réductionnistes radicales qui dominaient de plus en plus la biologie à cette époque... et encore aujourd'hui. Ce qui joua un rôle déterminant dans la capacité exceptionnelle de Jaffe à concevoir ces expériences cruciales, c'était d'avoir bâti ses fondements conceptuels sur les travaux des biologistes du début du XX^e siècle qui, pour la plupart, demeurent inconnus des scientifiques d'aujourd'hui.

Richard Borgens et Kenneth Robinson, diplômés de l'université de Purdue et formés par Jaffe, poursuivent toujours l'étude des champs électriques ainsi que des processus vivants, et ont même élargi le domaine d'investigation. Ces deux scientifiques faisaient partie d'un groupe très uni d'étudiants qui sont devenus chercheurs à une époque où la culture scientifique était très différente de celle que l'on trouve maintenant.

Jaffe, l'inspirateur de ce groupe, leur avait fait comprendre l'importance de l'histoire des sciences. Il demandait à ses étudiants de garder à l'esprit les questions fondamentales en embryologie soulevées au XIX^e et au début du XX^e siècle. Il exigeait des étudiants qu'ils apprennent l'histoire des sciences, les contributions et expériences cruciales de scientifiques depuis le XIX^e siècle. Trois fois par semaine, les étudiants se rencontraient en groupe avec Jaffe et son collègue Joseph Vanable, pour discuter des projets en cours au laboratoire. Pour Richard Borgens, ces réunions fournissaient « *un mélange fertile d'idées* » qui influença sa propre démarche scientifique.

Les courants électriques contrôlent-ils la régénération des membres ?

Richard Borgens était venu au laboratoire de Jaffe avec un solide intérêt pour la formation des membres au cours du développement. Il avait réalisé son projet de maîtrise sur la formation des os des membres dans l'embryon d'un poussin. Le développement des membres dans l'embryon a de nombreuses caractéristiques en commun avec la régénération des membres chez les amphibiens adultes. Après le développement de la sonde à extrémité vibrante, la première chose que Borgens examina à l'aide de ce nouvel instrument, fut le processus de régénération des membres chez les salamandres adultes.

Les expériences du début des années 40 avaient montré qu'il y a des changements électriques à la surface d'un membre lors de la régénération après amputation chez les amphibiens. Dans ses premières expériences en 1977, Borgens trouva qu'une réponse immédiate à l'amputation d'un membre chez les salamandres était la production d'un courant électrique intense, sorti de l'extrémité du moignon du membre. Ce courant suivait un chemin sortant de l'extrémité du moignon et retournait en boucle à travers l'eau ou l'humidité de la peau, jusqu'à l'endroit non endommagé du membre à l'arrière de l'amputation. La densité du courant s'étendait de 20 à plus de 100 micro-ampères (μA) par centimètre carré juste après l'amputation, et tombait de façon continue en quelques jours à un niveau de seulement quelques micro-ampères par centimètre carré.

La diminution du courant venant du moignon coïncide avec la formation de l'épithélium endommagé (la peau), qui crée une résistance accrue le long du circuit. Tous les animaux qui régénèrent naturellement leurs membres à l'âge adulte, parmi lesquels les tritons, les salamandres et les axolotls (tous les membres de l'ordre des urodèles, c'est-à-dire les amphibiens à queue), produisent un fort courant électrique circulant à travers l'extrémité du moignon du membre amputé.

Que savons-nous de ce qui se pro-

duit au niveau cellulaire durant la régénération ? Après l'amputation, la surface blessée du membre est recouverte en quelques heures d'un fin épithélium endommagé. Sous cet épithélium, des débris cellulaires sont évacués et des cellules intactes démarrent le processus de « différenciation ». Ces cellules perdent leurs caractéristiques spécifiques qui les identifient comme les cellules d'un muscle, d'un os ou du cartilage, et se transforment en une cellule comme celle du mésenchyme, appelée alors blastomère. Ces blastomères ont des propriétés similaires aux cellules embryonnaires, pouvant se différencier en n'importe quel type de cellule. Ce sont elles qui se développeront et formeront le membre régénéré.

Des expériences ont montré que deux tissus sont essentiels pour le démarrage et le contrôle de la régénération des membres. D'abord, cette régénération nécessite la formation d'un épithélium endommagé. De plus, cet épithélium donne une directionnalité au développement des blastomères qui sont en dessous. S'il est chirurgicalement déplacé dans une position excentrée sur le moignon, le membre régénéré se développera dans cette nouvelle direction.

Le deuxième élément essentiel à la régénération est la présence de nerfs périphériques intacts. Si les nerfs conduisant au membre endommagé sont supprimés, aucune régénération ne peut avoir lieu. Pour expliquer cela, on a recherché si les cellules nerveuses produisaient des facteurs de croissance. Jusqu'ici, de nombreux facteurs de croissance ont été identifiés mais aucun d'entre eux ne peut remplacer la présence du nerf intact dans le moignon.

Autres interrogations

Les courants électriques que Borgens avait mesurés à l'extrémité du moignon provoquèrent certaines interrogations. Qu'est-ce qui génère ce courant ? Le courant et le champ électrique résultant ont-ils influencé le comportement des cellules impliquées dans la régénération ? Borgens déclara avoir trouvé la source et la nature du courant électrique. Il était bien connu que la peau des amphibiens, et de tous les autres vertébrés, produit

une différence de voltage à travers sa surface. Cette « pile cutanée » maintient un potentiel interne positif de l'ordre de 40 à 80 millivolts (mV), en transportant activement des ions sodium (Na⁺) et d'autres ions chargés positivement de l'extérieur vers l'intérieur. Les cellules épithéliales étant elles-mêmes polarisées dans leur structure, et étroitement jointes, elles créent une barrière résistante au flux des ions positifs dans la direction opposée. Toutefois, toute fissure dans l'épithélium créerait un chemin de faible résistance, ce qui provoquerait immédiatement un flux vers l'extérieur des ions positivement chargés.

Afin de voir si la pile cutanée était responsable de la génération des courants partant du moignon du membre, Borgens manipula la concentration des ions sodium dans l'eau du bassin contenant les salamandres. Lorsqu'elle était cinq fois plus importante, les courants mesurés partant du moignon étaient aussi approximativement multipliés par cinq. Si l'on maintenait les salamandres dans une eau déficiente en sodium, les courants chutaient de 90 %. Ces effets pouvaient être inversés en replaçant les animaux dans l'eau normale d'un étang.

Quand les courants partant du moignon chez les salamandres ont été définis dans les grandes lignes, Jaffe, Borgens et Vanable furent curieux de voir si l'application de ces champs électriques sur un amphibien non régénérant comme la grenouille (de l'ordre des anoures), pouvait induire une régénération des membres. Ils choisirent la grenouille verte (genre *Rana*), et construisirent un stimulateur électrique qu'ils pouvaient implanter sous la peau du dos, avec deux électrodes qui en sortaient. Dans l'un des groupes d'animaux, l'électrode négative fut implantée à travers les tissus de la partie centrale du moignon, avec la partie non isolée en contact avec le tissu de l'extrémité du moignon. L'électrode positive fut implantée sous la peau du dos. Cette installation correspond à la polarité du courant qui avait été mesurée chez la salamandre. Dans le deuxième groupe expérimental, les électrodes furent inversées, avec l'électrode positive implantée dans l'extrémité du moignon. Un groupe de contrôle avait les électrodes reliées à un stimulateur électrique inactif.

Les résultats dans le groupe de

contrôle des grenouilles vertes n'ont fait apparaître aucune réponse régénératrice : le moignon guéri était recouvert d'une peau épaisse et d'un tissu cicatrisé. Cependant, après des semaines de stimulation avec l'électrode négative à l'extrémité du moignon, le second groupe d'animaux montra des degrés variés de régénération des membres. Ces membres étaient anormaux dans leur apparence externe, et après examen, on remarqua que leurs tissus internes étaient désorganisés et indifférenciés. Ce fut un résultat surprenant, même si les membres régénérés étaient incomplets et hypomorphiques. Le troisième groupe d'animaux, qui avaient une électrode positive implantée à l'extrémité du moignon, montra une dégénération des tissus du moignon et aucune réponse régénérative. Ces expériences démontrèrent qu'en imposant artificiellement des courants électriques de même polarité et d'intensité de champ similaire à celles trouvées chez la salamandre, on pouvait obtenir un début de régénération chez la grenouille adulte normalement non régénérative.

Expériences sur les grenouilles après amputation

Les expériences initiales furent poursuivies deux ans plus tard en 1979, avec l'observation des courants électriques chez les grenouilles non régénératives après amputation. Bien que les grenouilles (anoures) et les salamandres (urodèles) soient étroitement apparentées, il existe des différences anatomiques de leurs membres, ce qui peut aider à expliquer pourquoi les grenouilles adultes, dans des conditions normales, ne se régénèrent pas. Les larves de grenouilles sont capables de régénérer des portions de leur queue et d'autres membres jusqu'à la phase de métamorphose, lorsque les espaces lymphatiques sous-épidermiques commencent à se développer dans les membres. Cet espace lymphatique dans le membre de la grenouille adulte pourrait agir comme un chemin de faible résistance pour dériver un courant généré par la pile cutanée loin des tissus centraux du moignon. Les salamandres et autres urodèles ne

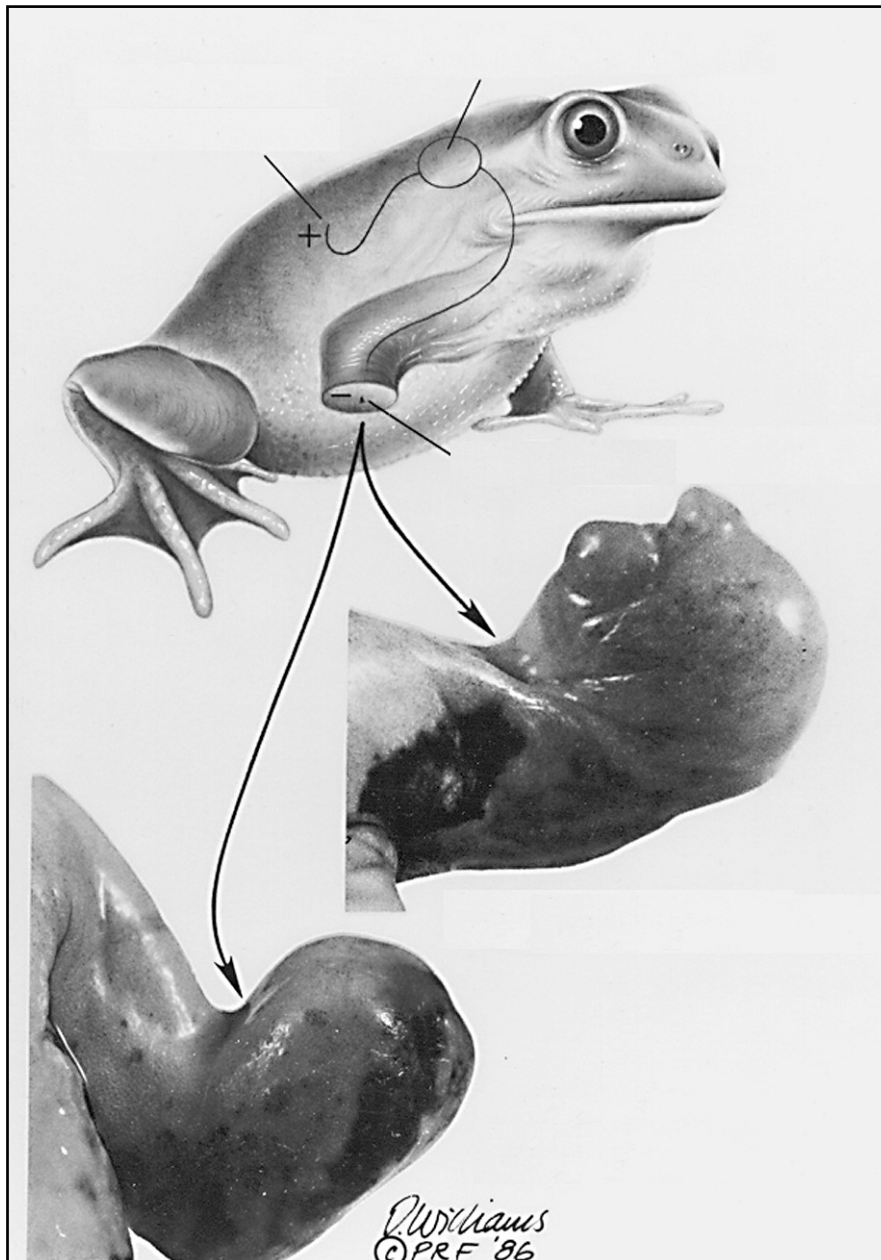


Figure 1. Stimulation électrique pour la régénération d'un membre antérieur chez la grenouille adulte. L'électrode négative est implantée à l'extrémité du moignon du membre et l'électrode positive sous la peau du dos, comme on peut le voir sur le dessin de la grenouille. Les photographies du dessous montrent les réponses effectives des membres traités par courant et par simulation. Lesèches indiquent l'endroit de l'amputation des membres.

Source : R. Borgens, *J. Exp. Zool.*, Vol. 200, pp 403-416, 1977. Republié avec l'autorisation de Wiley-Liss, Inc.

En prenant en considération que la grenouille adulte produit un courant dans le moignon, les chercheurs se sont demandés si la régénération serait plus complète si la topographie de ce courant était rendue similaire aux urodèles. Borgens affina l'expérience en utilisant des stimulateurs électriques sur les grenouilles avec cette fois la grenouille africaine *Xenopus laevis*. Cette dernière est connue pour produire naturellement une faible réponse régénérative à l'amputation, qui se limite à une petite pointe de cartilage recouverte de peau. À l'aide de stimulateurs électriques implantés à l'intérieur, les électrodes négatives situées à travers le tissu central du moignon, Borgens observa après deux mois que ces animaux avaient développé des membres similaires à ceux de la phase « pagaie » du membre chez les salamandres, c'est-à-dire juste avant que les doigts ne se forment.

Le groupe de contrôle présentait des pointes de cartilage entourées de peau, caractéristique d'une réponse naturelle. Curieusement, nombre des membres traités électriquement sont apparus presque normaux à l'extérieur, mais la structure interne était assez désorganisée et anormale. Ces structures régénératrices furent appelées des « pseudomembres », et avaient une grande quantité de tissu nerveux réparti de manière désorganisée à travers le cartilage.

L'explication conventionnelle du développement des membres est que l'organisation cellulaire interne détermine la forme externe. Cependant, les pseudomembres remettent en cause cette notion et montrent l'importance des champs électriques dans la détermination de la morphologie.

Dans son expérience suivante, également en 1979, Borgens voulait déterminer quel effet il obtiendrait sur la régénération chez les salamandres en bloquant spécifiquement des canaux des ions sodium dans la peau. Il avait auparavant montré que les courants du moignon semblaient dépendre des ions sodium qui servaient de porteurs de charges. Les salamandres et les tritons avaient les moignons de leurs membres antérieurs traités quotidiennement à l'amiloride afin de bloquer le canal sodium. Au début, tous les animaux traités n'étaient plus capables de régénérer leurs membres mais, après un laps de temps, environ la moitié

possèdent pas d'espace lymphatique sous-épidermique.

Borgens mesura les courants venant du moignon chez les grenouilles adultes, et découvrit que la densité de courant la plus élevée venait de l'espace lymphatique. Le courant circulant à travers les tissus centraux s'avéra être d'intensité quatre à cinq fois inférieure à ceux de l'espace lym-

phatique. De plus, le pic des courants venant des moignons de grenouilles adultes était inférieur à celui trouvé chez les tritons. Ces différences laissaient supposer que l'absence de courants électriques suffisants dans les tissus centraux du membre, la région qui donne naissance aux blastomères, entraîne une diminution de la capacité de régénération.

des animaux a commencé à se régénérer. Les mesures de courants provenant des extrémités du moignon chez ces animaux montraient qu'ils généraient en effet de forts courants en l'absence de sodium.

Certains des animaux qui avaient eu leur régénération inhibée durant des semaines par leur traitement à l'amiloride, guérirent et commencèrent à redévelopper leurs membres à une allure fortement accélérée. C'était un résultat surprenant qui soulevait encore de nouvelles questions. Lorsque ces animaux furent examinés durant la période d'inhibition, leurs moignons étaient recouverts d'une peau très épaisse et de tissu cicatrisé, ce qui est caractéristique des espèces non régénératives ou dont la régénération est bloquée en permanence. Cependant, ces animaux ont échappé à l'inhibition et se sont ensuite régénérés à une vitesse accrue, produisant parfois des membres qui se sont développés de manière plus complète que ceux du groupe de contrôle.

Y avait-il quelque chose en construction dans les moignons inhibés qui provoquait ce développement accéléré ? Les expériences d'alors ne permirent pas de répondre à cette question qui demeure encore aujourd'hui un mystère. Toutefois, le fait que les salamandres et les tritons pouvaient produire des courants dans le moignon après être guéris de l'inhibition, indiquait que ces animaux s'étaient adaptés en utilisant d'autres ions chargés positivement, comme le calcium et le potassium, lorsque les canaux sodium étaient bloqués. Au cours d'expériences ultérieures, il fut montré que si les animaux étaient maintenus dans un environnement déficient en calcium, potassium et sodium, les courants du moignon ne pouvaient être produits et la régénération s'en trouvait bloquée.

Modèle de régénération par les champs

Les expériences de Borgens ne laissent aucun doute sur l'importance du champ électrique pour amorcer et contrôler la régénération. Mais quelles sont les cibles de ce champ ? Quels effets un champ électrique

peut-il produire dans les cellules ? Nous savons d'expériences précédentes que les nerfs et l'épithélium endommagé sont les deux tissus essentiels pour que la régénération ait lieu : ils pourraient donc être des cibles du champ électrique.

D'après les mesures expérimentales, le champ électrique est plus fort au niveau de l'épithélium endommagé, là où le courant sort du moignon. Le flux du courant établit une polarité dans le membre, et crée des gradients de voltage qui pourraient fournir aux cellules un moyen de détecter leur position. De plus, le flux du courant détermine une directionnalité pour le développement des cellules vers l'extérieur. Il a été démontré que les champs électriques influençaient la direction de la migration cellulaire, aussi cela pourrait-il constituer l'un des effets dans le membre en développement.

Selon les résultats expérimentaux, il semble que le flux immédiat de courant après l'amputation soit crucial pour amorcer la réponse régénérative. En réfléchissant sur ce problème du point de vue de la réponse à la blessure, le premier changement que l'on observe après que la peau, ou même la membrane, d'une seule cellule soit endommagée, c'est un flux de courant électrique. Les cellules doivent avoir développé une réponse à la blessure qui détecte ce flux de courant comme un signal amorçant le processus de cicatrisation. Dans le cas de la régénération des amphibiens, la différenciation des cellules du blastème peut être le résultat direct ou indirect du courant provenant du moignon.

Logiquement, l'autre cible du champ électrique est le tissu nerveux, nécessaire à la régénération. Des expériences *in vitro* ont montré que des neurones développés en culture s'accroîtront et engendreront des neurites (précurseurs des axones et dendrites), de préférence vers la cathode (le pôle négatif) dans un champ électrique. Compte tenu de la formation du pseudomembre chez les grenouilles adultes, il est curieux d'observer qu'une si grande partie du tissu interne est constitué de nerfs. Avec l'électrode négative à l'extrémité du moignon chez la grenouille, une régénération hypomorphique se produit et la polarité du champ appliqué est identique à celle avec laquelle les neurites se développent en culture.

Borgens suggère que la polarité du champ aide à diriger le redéveloppement dans le moignon du nerf périphérique, sur lequel repose la régénération du membre. Cependant, en considérant la relation entre les nerfs et l'épithélium endommagé, la situation dans le membre qui se régénère laisse encore de nombreuses questions sans réponse. Comment le champ coordonne-t-il les actions de ces deux tissus essentiels durant la régénération ? Les cellules du membre qui se régénère croissent-elles suivant un champ électrique global, ayant déjà déterminé la forme et l'orientation du membre ? Pour aborder cette troublante question, Borgens dirigea son expérience suivante sur le processus de formation des membres dans l'embryon.

L'embryon utilise-t-il des champs pour opérer son développement ?

L'intérêt que Richard Borgens portait au développement embryonnaire des membres recoupait les travaux de son collègue et ami Kenneth Robinson. En 1983, ils publièrent ensemble des articles sur le rôle du champ électrique dans la prédétermination de l'emplacement du bourgeon du membre émergent chez deux embryons d'animaux différents. Le Dr Robinson avait étudié durant plusieurs années les effets des champs électriques sur le développement et le comportement des cellules. Robinson était le premier étudiant de Jaffe diplômé, et il cherchait à découvrir comment les champs électriques dans un embryon pouvaient contrôler le comportement des cellules.

L'histoire expérimentale des champs électriques et de leur influence sur les cellules, particulièrement sur les neurones, n'avait pas permis de trancher entre ceux qui prétendaient que les champs guidaient le développement nerveux et ceux qui niaient tout effet sur ce développement. Robinson connaissait les recherches menées par S. Ingvar en 1920, qui fut le premier à démontrer qu'un courant appliqué pouvait orienter la direction du développement des neurites le long des lignes de champ électrique. Les

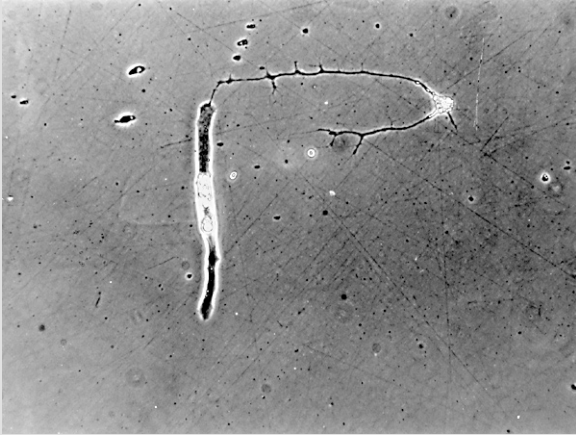


Figure 2. Réponse d'un neurone individuel, isolé du tube neural, au champ électrique. Le neurone (en haut sur la droite) étend des neurites vers le pôle négatif (cathode) du champ (sur la gauche). Le neurite le plus long est en train de toucher la cellule du myoblaste.

Source : K.R. Robinson, université de Purdue.

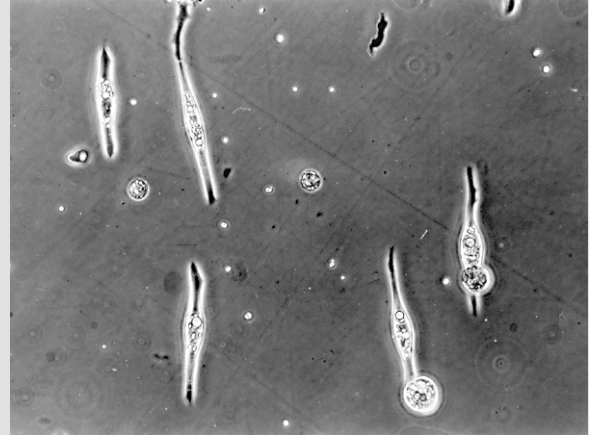


Figure 3. Myoblastes développés en présence d'un champ électrique. Les myoblastes répondent au champ électrique en orientant leurs axes longs perpendiculairement aux pôles du champ (négatif à gauche, positif à droite). Ces cellules sont celles qui donneront naissance au muscle.

Source : K.R. Robinson, université de Purdue.

travaux de ce dernier suggéraient aussi qu'il y avait une réponse différente dans le développement vers la cathode (-) et vers l'anode (+) du champ appliqué. Cependant, Paul Weiss, un scientifique de l'université Rockefeller, publia en 1934 ses propres résultats expérimentaux, déclarant sans équivoque que les champs électriques n'avaient *aucun* effet sur l'orientation et le développement des fibres nerveuses. La description des expériences dans son compte-rendu n'était qu'ébauchée et laissait apparaître de sérieuses failles dans les résultats. Pourtant, les travaux de Weiss sont restés la référence de ce qui est devenu la pensée dominante en la matière.

L'inspirateur de Robinson, Lionel Jaffe, avait publié en 1979 une étude sur la réponse des cellules ganglionnaires d'une racine dorsale à l'application d'un champ électrique, montrant un développement préférentiel des neurites vers la cathode. Toutefois, l'effet sur des cellules individuelles était difficilement visible, ces cultures contenant des centaines ou des milliers de fibres nerveuses. Robinson était convaincu que le compte-rendu de Weiss était faux, mais il voulait également pouvoir quantifier la force du champ électrique nécessaire pour influencer le développement d'un neurone individuel.

La solution de Robinson fut d'iso-

ler les neurones en développement du tube neural des embryons de *Xenopus laevis*, et de les cultiver en présence d'un champ électrique. On a pu ainsi étudier les cellules individuelles et définir le seuil de champ électrique entraînant un effet sur le développement des neurites. Lors d'expériences menées en 1981, travaillant avec son compagnon d'études Colin McCaig, Robinson observa que les neurones de *Xenopus* génèrent plus de neurites vers la cathode et que ces dernières effectuaient plusieurs tours pour s'orienter vers ce pôle. Ils s'aperçurent que le seuil pour produire cet effet était très bas : un champ de 7 mV/mm suffisait à influencer les cellules.

Ils ont également testé la réponse de myoblastes isolés (cellules embryonnaires qui donnent naissance aux muscles), à l'application d'un champ électrique en culture. Les myoblastes avaient un seuil plus élevé pour leur réponse (36 mV/mm), et se développaient en ayant leur grand axe de développement perpendiculaire aux pôles du champ électrique. Ces expériences établissent que différents types de cellules répondaient de manières distinctes à un champ électrique, ce qui serait très important chez l'embryon dont les cellules se différencient en des types spécifiques de cellules.

A présent que l'on avait défini les champs nécessaires pour influencer

le comportement des cellules *in vitro*, l'étape suivante était de voir si l'embryon possédait des champs de force similaire. McCaig et Robinson choisirent d'étudier l'embryon de *Xenopus* durant le processus de neurulation, au moment où s'établissent le tube neural et l'organisation du système nerveux.

Lors d'expériences en 1982, ils ont mesuré le potentiel électrique généré par l'ectoderme (couche la plus externe) de l'embryon, et observé qu'il s'élevait à 60 mV (positif intérieurement), ou plus encore à mesure que se déroulait la neurulation. Ce voltage était beaucoup plus élevé que ceux qu'ils avaient précédemment déterminés comme suffisants pour agir sur le comportement des cellules en culture. Toutefois, dans cette expérience initiale, ils ne pouvaient pas mesurer ni la direction ni le modèle de courant circulant dans l'embryon.

Au cours de la neurulation, les cellules doivent migrer de la zone entourant le tube neural vers de nombreuses parties du corps de l'embryon. Les champs électriques pourraient-ils provoquer cette migration et guider l'orientation des mouvements cellulaires ? La crête neurale est un groupe cellulaire important se formant autour du tube neural et migrant vers différents endroits. Ces cellules se différencient en une large variété de tissus, comprenant les

ganglions du système nerveux autonome, les glandes, la peau et même les os. On ne sait pas très bien ce qui engendre la migration des cellules, tout comme la façon dont elles sont conduites à leur destination.

Robinson isola des cellules de la crête neurale des embryons de *Xenopus*, et les exposa en culture à un champ électrique. Des cellules individuelles et des groupes de cellules migrèrent vers la cathode de champs de 10 mV/mm ou plus. Cela correspond à une chute de potentiel inférieure à 1 mV à travers le diamètre de chaque cellule. Des champs de cette magnitude pouvaient facilement se produire dans l'embryon, faisant du courant électrique un vecteur pouvant guider la migration des cellules de la crête neurale.

En 1984, Robinson utilisa une microsonde à extrémité vibrante pour tenter de détecter les caractéristiques des courants près de la surface de l'embryon de *Xenopus*. Il découvrit que des courants positifs étaient dirigés vers l'intérieur sur presque toute la surface de l'embryon, mais qu'il y avait un fort courant sortant du blastopore, un petit trou dans l'ectoderme restant d'une invagination antérieure des cellules. Cette expérience cruciale démontra qu'il y avait un modèle global des courants circulant dans l'embryon.

Développement du membre embryonnaire

Ce qui arrive aux cellules embryonnaires dans la région du membre en développement est assez bien défini anatomiquement chez les amphibiens. Robinson et Borgens étaient impatients de découvrir le rôle joué par les champs électriques dans la formation des membres embryonnaires. Le long du flanc de l'embryon de l'amphibien, l'endroit où le membre se formera, une des premières choses se produisant est que les cellules épithéliales perdent leurs étroites jonctions intercellulaires. Cela crée un épithélium qui fuit légèrement et continue à se dégrader jusqu'à la mort programmée de certaines cellules épithéliales dans la région où le membre bourgeonne. Sous l'épithélium, une grande quantité de cellules du mésenchyme s'accumulent et, plus tard, se mettent à migrer et se développer vers l'extérieur. On assiste, dans le processus, à la migration de nombreux types de cellules, comme des cellules de la crête neurale, et, plus tard, la croissance des neurites qui s'étendent dans le bourgeon du membre en développement.

Robinson examina l'embryon de *Xenopus* lorsqu'il commence à for-

mer ses membres postérieurs, et il constata que la zone où le membre bourgeonne était le lieu d'où sortait un fort courant. Les courants, entre 2 à 12 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, quittaient le bourgeon et retournaient en boucle vers les régions voisines du flanc. Le développement des membres postérieurs ayant lieu chez la *Xenopus* et d'autres grenouilles lorsque les embryons sont encore assez petits, et la durée du processus étant relativement courte, il était difficile d'effectuer des mesures de courant.

Pour étudier les courants dans le membre en développement, Borgens utilisa l'axolotl, profitant de la grande taille de sa larve et du temps plus long pour le développement des membres postérieurs. L'axolotl est assez bien différencié à ce stade du développement, ses membres postérieurs se développant après ses membres antérieurs (Figure 4). A l'aide de la microsonde à extrémité vibrante, Borgens observa que dans la semaine précédant la formation visible du bourgeon, l'épithélium du flanc de l'axolotl était le siège d'un courant sortant diffus qui se concentrait et augmentait en intensité à l'endroit du bourgeon. En fait, le pic de courants sortants de 2 à 3 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ apparaît à l'endroit où se forme le bourgeon, juste avant que le membre ne devienne visible. En mesurant le flux de courant sortant, on pouvait prédire le lieu exact du bourgeon quatre à six jours avant qu'il ne se forme réellement ! Le trajet du courant quitte la région du bourgeon et retourne en boucles vers les zones du flanc à proximité du bourgeon. Borgens continua à mesurer les courants dans le bourgeon, notant qu'à mesure que ce dernier se développe à l'extérieur de l'épithélium du flanc, l'intensité du courant décroît lentement et, dans certains cas, le courant inverse par la suite sa polarité et circule vers l'extrémité des gros bourgeons, d'une longueur d'environ 0,5 mm. Grâce aux expériences de Robinson et Borgens, on a ouvert de nouvelles voies pour comprendre la formation des membres. Une perte programmée des jonctions étroites entre les cellules de l'épiderme permet au courant de commencer à fuir du lieu où le bourgeon se formera. Cette rupture du potentiel transépidermique amène de plus grands changements dans l'anatomie de l'épiderme du flanc, tels que la mort et le détachement

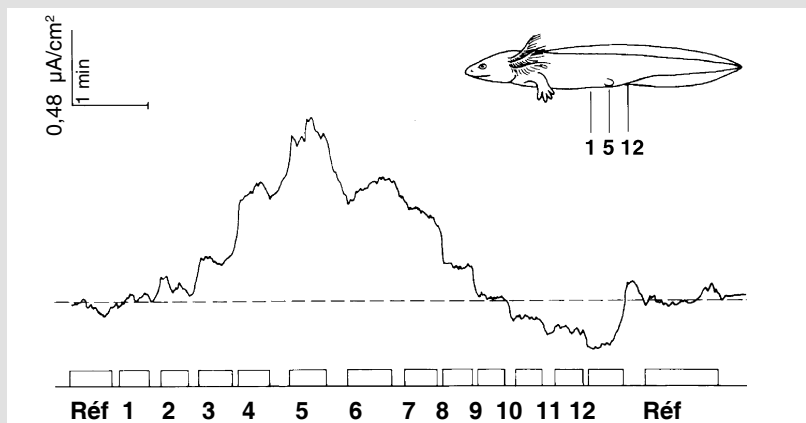


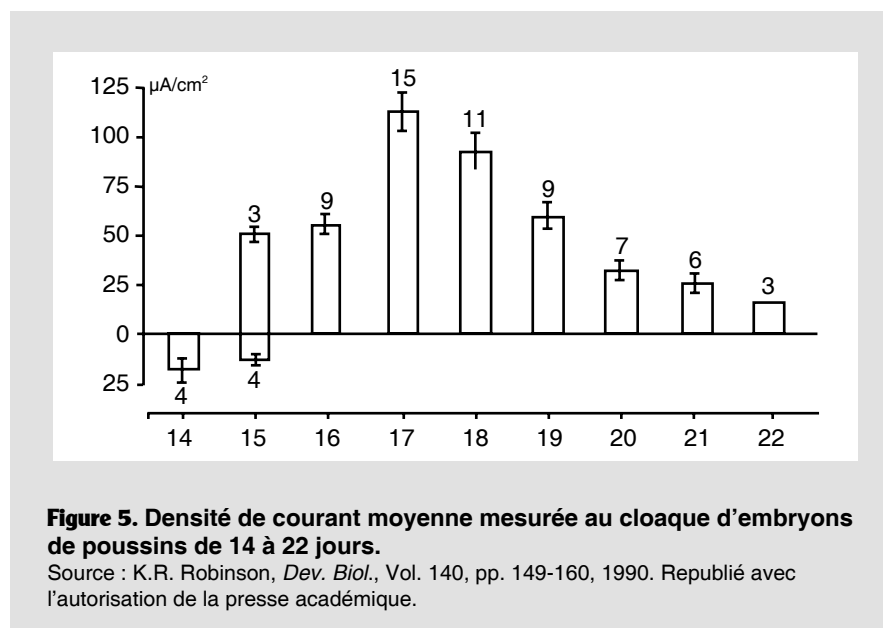
Figure 4. Courants électriques mesurés le long du flanc de l'axolotl durant la formation du bourgeon du membre. Les pics au-dessus de la ligne en pointillés indiquent les courants sortants et, en dessous, les courants entrants. Les nombres représentent l'emplacement sur l'axolotl où les mesures sont effectuées. On remarque le fort courant sortant à la position 5, qui correspond à l'emplacement du bourgeon émergent sur l'axolotl.

Source : R. Borgens, *J. Exp. Zool.*, Vol. 228, pp 491-503, 1983. Republié avec l'autorisation de Wiley-Liss, Inc.

des cellules épidermiques de la région. Le gradient de voltage créé par ce courant serait ainsi négatif dans la région de la fuite. L'accumulation de cellules du mésenchyme et la migration d'autres cellules vers le bourgeon peuvent être dirigées par le champ électrique. La région du bourgeon agirait ainsi comme la cathode d'un champ électrique. Les neurites qui innervent le membre en développement se développent aussi de préférence dans cette direction.

Les champs électriques embryonnaires globaux

Le processus de formation d'un plan dans un embryon en développement a fasciné les scientifiques durant des décennies. Robinson voulait découvrir si les changements de caractéristiques du flux de courant pouvaient être corrélés avec les changements physiques dans l'arrangement des cellules et des tissus dans l'embryon. En 1990, avec son élève Kevin Hotary, ils examinèrent le poulet embryonnaire, mesurant des courants externes et des potentiels dans des poussins de 2,5 jours à 4 jours. Ils mesurèrent les courants entourant l'orifice digestif postérieur (ODP), une région où les intestins en développement, proches de la queue, créent une rupture de l'épithélium alors qu'ils se remodelent (**Figure 5**). Les mesures provenant de la microsonde à extrémité vibrante furent effectuées sur des poussins aux stades de développement 14 à 22. A 14 jours, seuls les faibles courants circulant dans l'ODP pouvaient être détectés, mais au stade de 16 jours, le courant inversa sa direction et quitta l'ODP. Le fort courant sortant de l'ODP s'étendait de $50 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ à un pic de $110 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ au stade de 17 jours, et correspondait à la rupture de l'épithélium de l'intestin. Robinson et Hotary mesurèrent également le potentiel transépidermique des embryons de poussins aux mêmes stades de développement, en insérant des microélectrodes en verre à travers la peau de l'embryon. Le potentiel moyen à travers la peau était de 16 mV, mais variait selon la position dans l'embryon et le stade de développement. En effectuant de nombreuses mesures des change-



ments de voltage depuis la tête jusqu'à la queue le long de l'embryon, ils ont constaté qu'il y avait un gradient interne de potentiel atteignant une moyenne de 10 mV/mm vers la queue, qui était le plus négatif. Dans les régions proches de la queue, le gradient atteignait 21 mV/mm. Les cellules de la crête neurale commencent à migrer dans le poussin au moment où les premiers courants sortant de l'ODP sont détectés. De plus, puisqu'il a été constaté que les cellules de la crête neurale migraient *in vitro* vers la cathode dans un champ de force d'au moins 10 mV/mm, les gradients de voltage mesurés dans le poussin seraient amplement suffisants pour guider leur migration vers l'extrémité de la queue, laquelle agit comme une cathode. A la suite de ces résultats d'expériences, Robinson proposa que les champs électriques avaient comme rôle majeur le guidage de la migration des cellules dans l'embryon. Mais que pouvaient-ils contrôler d'autre ? La formation du tube neural depuis le repliement de l'ectoderme, et le détachement qui s'en suit de la couche externe du nouvel ectoderme, établit les bases pour le développement du système nerveux central. Une fois que le tube neural se forme, sa présence induit la différenciation et la formation d'autres structures et systèmes d'organes. Des cellules indifférenciées au voisinage du tube neural se développeront en des types spécifiques de cellules selon leur position relative par rapport à lui. Hans Driesch affirmait, il y a environ quatre-vingt dix ans, que le

développement ultérieur d'une cellule individuelle était fonction de sa position dans l'embryon.

Considérant son importance dans la détermination du sort des cellules dans l'embryon, Robinson se demanda si le tube neural lui-même générerait un champ électrique. Pour répondre à cette question, Hotary et lui insérèrent des microélectrodes dans les tubes neuraux des embryons de *Xenopus*. En enregistrant le potentiel électrique à travers la paroi du tube neural, ils trouvèrent un voltage de -23 mV à travers le côté dorsal (arrière) du tube, avec le lumen intérieur négatif. La polarité est l'inverse de celle trouvée à l'ectoderme de l'embryon, qui maintient intérieurement un potentiel positif. Toutefois, ce n'est pas surprenant car l'intérieur du tube neural est, du fait du repliement, le même à l'extérieur de l'ectoderme de l'embryon.

Lorsque le potentiel du côté ventral du tube neural fut mesuré, on trouva qu'il était plus positif que le côté dorsal. De façon surprenante, les régions immédiatement adjacentes au côté ventral du tube différaient en voltage d'une moyenne de 5 mV. Le modèle des potentiels électriques montre que le champ électrique généré autour du tube neural n'est pas radialement uniforme. De plus, les mesures des potentiels autour du tube neural chez les embryons de *Xenopus* à des stades de développement différents ont montré que l'intensité du champ variait suivant les stades.

D'après les mesures, il était clair que le tube neural conduisait le cou-

rant en une ligne allant du côté dorsal au côté ventral, créant des champs puissants variant en magnitude de 50 jusqu'à 500 mV/mm. Les cellules proches des faces latérales de l'extérieur du tube neural seraient exposées à des champs très puissants qui influenceraient certainement leur développement. Les somites qui se transforment en muscle sont trouvés près des parois latérales du tube neural, et la réponse des myoblastes (qui se développent à partir des somites) a déjà été montrée dans les expériences *in vitro* avec des champs de seulement 36 mV/mm. Le champ électrique du tube neural coïncide aussi avec l'établissement de la polarisation dorso-ventrale dans le système nerveux central.

A présent que deux sources majeures de champs électriques ont été découvertes dans l'embryon, on

peut se demander quelle est l'importance de l'interaction entre les deux champs durant la différenciation de l'embryon.

Changement de la topographie naturelle du courant

Si le chemin normal du flux de courant était altéré au cours du développement de l'embryon, quelle sorte d'effet cela aurait-il ? En 1992, Robinson revint à l'embryon de poussin et imagina des expériences qui prouvèrent l'importance du champ électrique dans son développement. Robinson et Hotary implantèrent de minuscules dériviatives en verres

creux remplis d'une solution conductrice ionique dans l'ectoderme du flanc d'embryons de poussins de 11 à 15 jours. Comme contrôle, ils implantèrent des verres solides non conducteurs au même endroit et cela dans un même groupe d'embryons. Les dériviatives étaient implantées juste avant l'apparition de forts courants vers l'extérieur provenant de l'ODP près de la queue du poussin. Robinson s'attendait à ce que ces dériviatives conductrices réduisent le courant naturel émanant de l'ODP et dirigent le courant à l'extérieur de l'embryon dans un chemin différent.

Après avoir permis aux embryons de continuer à se développer pendant une période de 3 jours, ils furent collectés et examinés au stade de 18 ou 20 jours (**Figure 6**). Les résultats

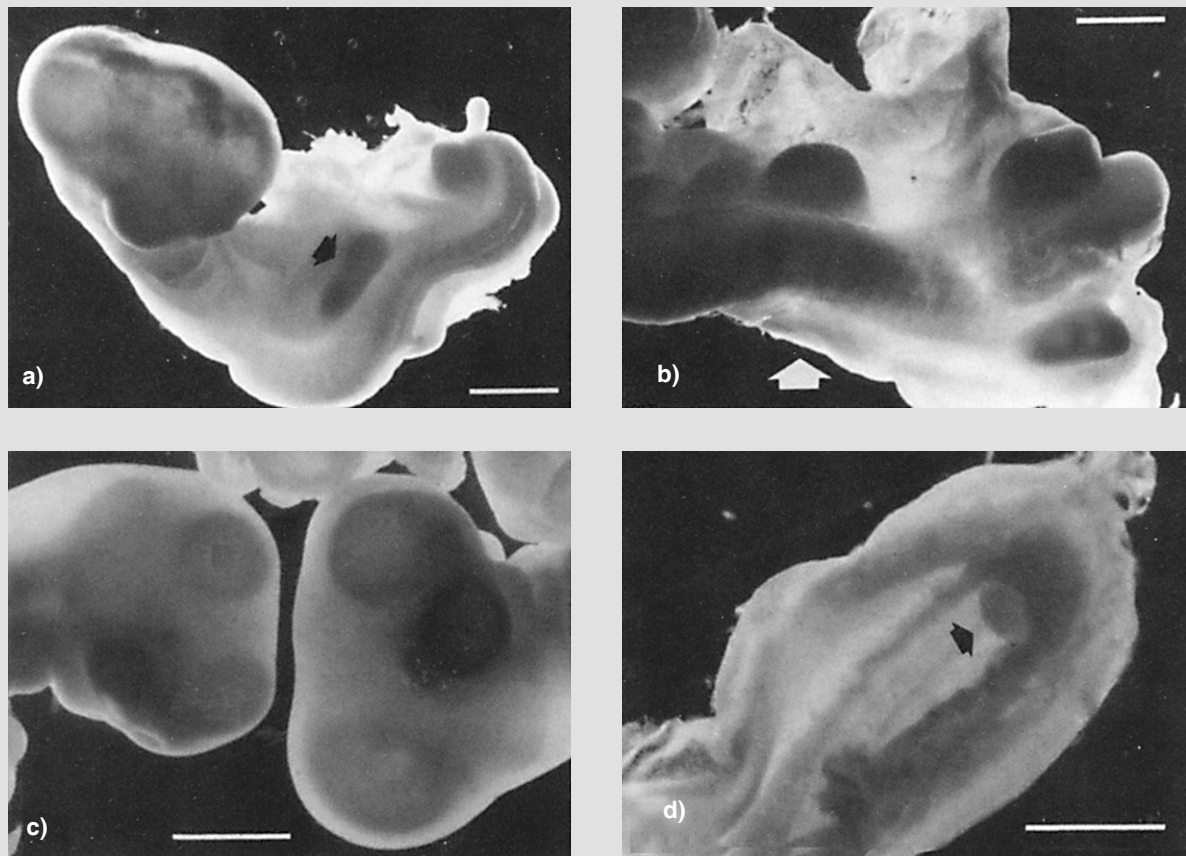


Figure 6. Anomalies dans le développement du membre, de la tête et des intestins, dans les embryons de poussins au courant dérivé.

a) L'embryon a le bourgeon d'une aile dupliqué du côté opposé à celui où la dérivation est implantée (èche). La queue est aussi anormale. b) Le bourgeon de l'aile est totalement absent (èche), tandis que les bourgeons des pattes sont élargis et aplatis (astérisque). c) Les divisions cérébrales sont petites et anormales, comparées à l'embryon de droite. Les régions cérébrales, le mésencéphale (m) et le télencéphale (t) sont étiquetés. d) Le côté ventral d'un embryon au courant dérivé montre une excroissance anormale au niveau du cloaque (èche).

Source : K.R. Robinson, *Development*, Vol. 114, pp.985-996, 1992. Republié avec l'autorisation de la Compagnie des Biologistes, LTD.

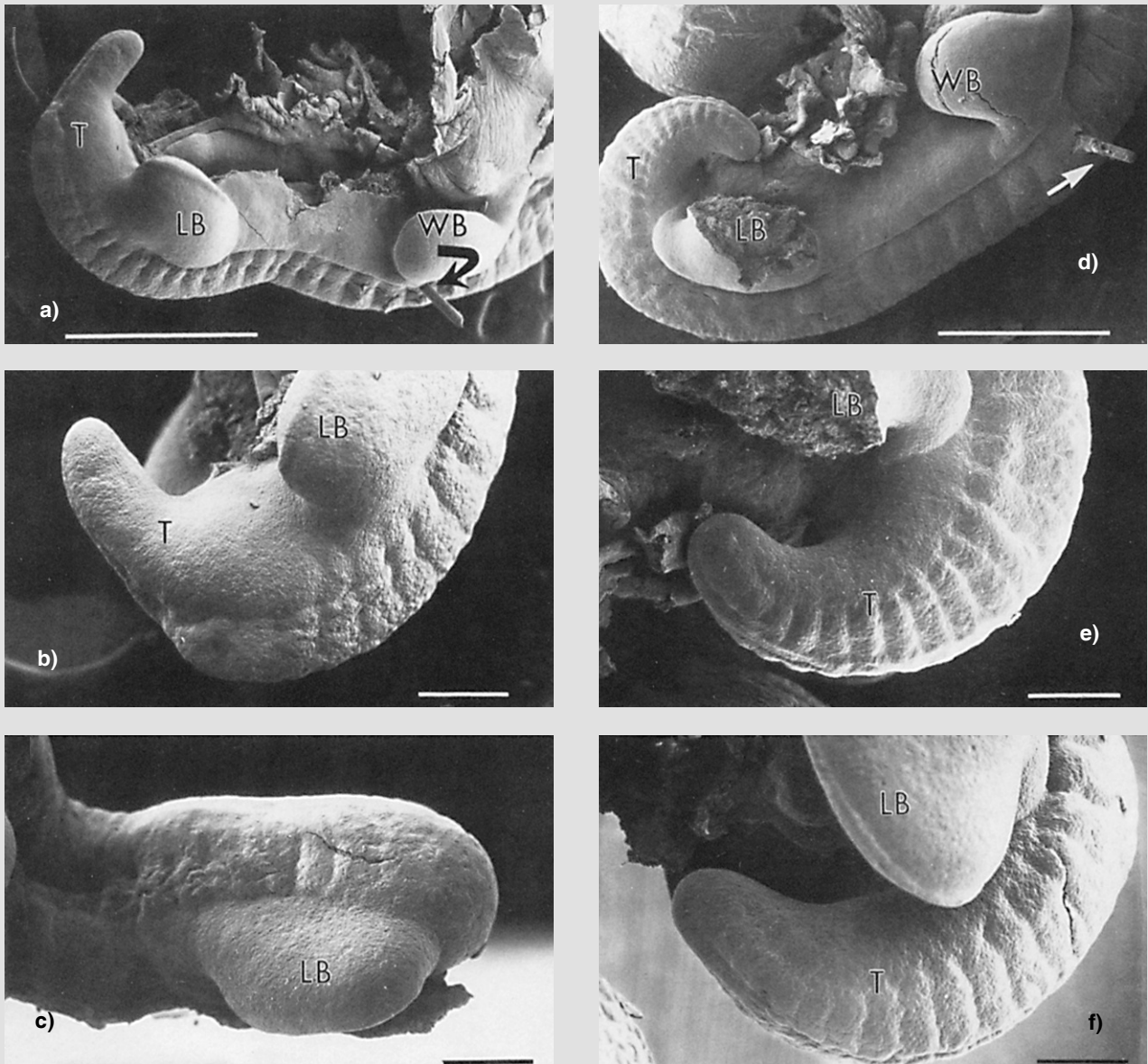


Figure 7. Micrographies électroniques d'embryons de poussins.

a) Embryon au courant dérivé montrant un développement défectueux de la queue. Laèche indique l'endroit où la dérivation est implantée. b) Fermeture de la queue de l'embryon montré en (a). Il manque au bout de la queue un tube neural et d'autres structures internes. c) Embryon traité par courant électrique et qui n'est pas parvenu à développer de queue. d) Implant de verre solide non conducteur entraînant des structures d'apparence normale dans cet embryon. e) Fermeture de la région de la queue de l'embryon en (d), montrant une structure normale de la queue. Le bourgeon de la patte a été partiellement déplacé pour permettre un meilleur examen de la queue. f) Queue normale d'embryon de poussin. Les repères utilisés sont WB pour le bourgeon de l'aile, LB pour le bourgeon de la patte et T pour la queue.

Source : K.R. Robinson, *Development*, Vol. 114, pp.985-996, 1992. Republié avec l'autorisation de la Compagnie des Biologistes, LTD.

dans les embryons au courant dérivé montrèrent un nombre étonnant de défauts de structure à travers le corps. Environ 92 % de ces poussins montrèrent au moins un défaut, alors que seulement 11 % des contrôles avec dérivation en verre solide montrèrent des défauts mineurs dans leur développement. Les mesures du courant quittant les dérivation

conductrices et sortant ensuite de l'embryon, atteignaient en moyenne $18 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, tandis qu'aucun courant ne pouvait être détecté sortant des dérivation en verre solide. Les mesures par sonde vibrante du courant de l'ODP dans les poussins à dérivation conductrice firent apparaître une réduction du courant de 30 % en moyenne, en comparaison avec une

réduction de seulement 1 à 7 % avec les dérivation en verre solide. Dans les embryons dont le courant avait été court-circuité par les dérivation conductrices, les défauts les plus fréquents furent observés dans la région de la queue, ce qui est cohérent avec la réduction du courant de l'ODP. Les queues étaient parfois totalement absentes dans ces embryons ou

æ

alors raccourcies (**Figure 7**). Dans les quelques embryons qui produisirent une queue de longueur normale, le tissu interne manquait de structures normales, comme un tube neural complet, une corde ou des somites. Ces embryons avaient des structures intestinales anormales, parmi lesquelles des sacs remplis de cellules indifférenciées du mésenchyme.

Les embryons au courant dérivé présentèrent également un développement altéré de la tête, comme l'absence de divisions cérébrales, un développement défectueux de l'œil, bien que moins fréquemment. On constata aussi des défauts dans la formation du bourgeon du membre, avec des bourgeons manquants ou dupliqués apparaissant de chaque côté de l'embryon. Aucun des embryons de contrôle ne présentait de bourgeon altéré. Changer le trajet du flux du courant avait des effets globaux sur l'embryon, ce qui remettait clairement en question la notion selon laquelle la première influence du champ électrique sur le développement consistait seulement à guider les migrations des cellules. La plupart des événements dans le développement de l'embryon ne dépend pas de la migration des cellules mais plutôt de l'interprétation de la position pour diriger la différenciation. De plus, les régions au-dessus

des dérivations du courant dans le poussin, telle que la tête, ont encore montré une grande variété de défauts de développement. Seul un concept du contrôle du développement par le champ pouvait permettre de comprendre ces résultats surprenants. La perturbation du champ électrique global dans l'embryon par les dérivations peut avoir altéré la reconnaissance de position des cellules, ce qui aiderait à expliquer certains des résultats. Cette perturbation change également l'interaction entre le champ produit par l'ectoderme et le champ interne produit par la moelle épinière.

Manipulation du champ embryonnaire

En 1994, Robinson et Borgens élaborèrent chacun des expériences pour interrompre le champ électrique endogène des embryons précoces d'amphibiens, en utilisant un champ appliqué de l'extérieur. Toutefois, avant d'interrompre le champ, Borgens examina les embryons de *Xenopus* et de l'axolotl durant la phase où l'ectoderme se replie pour former le tube neural. A l'aide de la microsonde à extrémité vibrante, il observa de forts

courants ioniques sortant du bord des plis neuraux (**Figure 8**). En mesurant latéralement en bas du flanc, loin des lèvres des plis, les courants externes diminuèrent en intensité et on constata qu'ils circulaient vers l'intérieur. Ces boucles de courant sortant disparaissaient dans cette région une fois que le tube neural s'était totalement soudé (**Figure 9**).

Les potentiels transépithéliaux (PTE) furent cartographiés chez les plus gros embryons d'axolotl, durant les phases de la formation du tube neural. En insérant des microélectrodes en verre dans la zone située au-dessous du tube neural en développement, des mesures de potentiel furent effectuées s'étendant de 18 à 64 mV. Un gradient de voltage de la tête à la queue fut observé (négatif à la queue). Les différences de voltage entre deux points de mesure variaient considérablement, de 5 mV/mm jusqu'à 63 mV/mm. Ce gradient de voltage changeait aussi au fur et à mesure que l'embryon se développait.

Borgens testa alors l'effet d'un champ appliqué sur le développement des embryons d'axolotl. Les embryons subissant une neurulation furent mis dans une chambre dans laquelle on les exposa à des forces de champs électriques prévus pour être similaires ou légèrement plus élevés que les champs naturels. Les em-

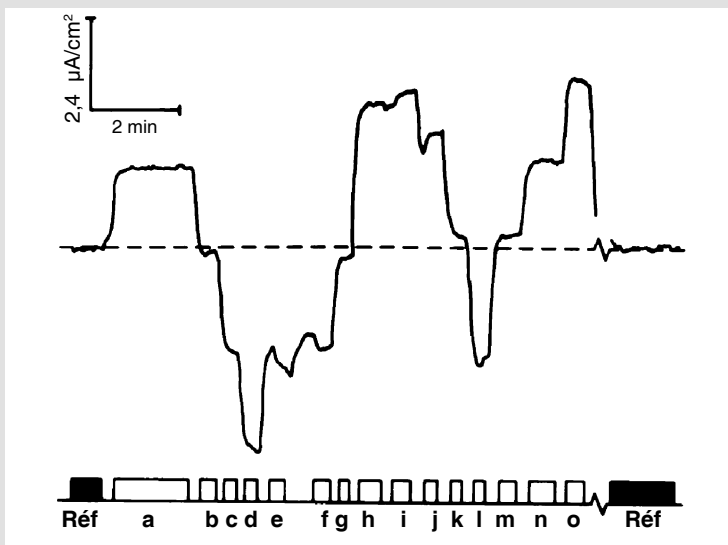


Figure 8. Mesure de courant ionique autour des plis neuraux de l'embryon de *Xenopus*. Le graphique à gauche montre le courant sortant de l'embryon (en dessous de la ligne en pointillés), et circulant dans l'embryon (au-dessus des pointillés). Les lettres sous le graphique correspondent aux positions sur le dessin de l'embryon à droite. Les courants vers l'extérieur sont plus forts près de la lèvre des plis neuraux ; les courants en bas du anc circulent vers l'intérieur.

Source : R. Borgens, *J. Exp. Zool.*, Vol. 268, pp. 307-322, 1994. Republié avec l'autorisation de Wiley-Liss, Inc.

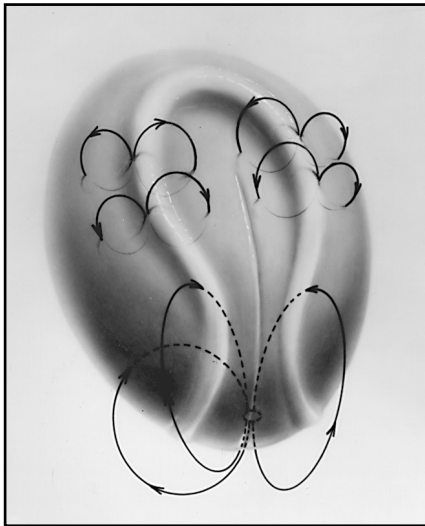


Figure 9. Dessin d'artiste des boucles du courant autour des plis neuraux dans l'embryon de *Xenopus*. Le dessin est basé sur les mesures effectuées par Borgens. Les boucles en bas de l'embryon décrivent le courant quittant le blastopore. Ces courants dirigent la formation du tube neural.

Source : R. Borgens, *Dev. Dynamics*, Vol. 202, pp. 101-114, 1995. Republié avec l'autorisation de Wiley-Liss, Inc.

bryons étaient orientés par rapport aux pôles du champ dans trois directions : la tête vers la cathode, la queue vers la cathode ou perpendiculaire à la cathode. De graves anomalies dans les structures du corps sont apparues au sein des trois groupes. Cependant, le bout de l'embryon le plus proche de la cathode montrait les malformations les plus fréquentes et les plus graves (**Figure 10**). Lorsque le bout de la queue faisait face à la cathode, les défauts de la queue et de l'abdomen étaient les plus fréquents, et dans de nombreux cas les structures de la tête semblaient normales. Dans l'orientation opposée, les défauts de la tête étaient prédominants et la structure de la queue apparaissait normale. Les embryons placés perpendiculairement à la cathode montrèrent une même distribution de défauts aux régions de la tête et de la queue.

Borgens mesura également le PTE des embryons pendant qu'ils étaient exposés à un champ extérieur. Quand la queue faisait face à la cathode, le PTE de l'ectoderme de la queue subissait une hyperpolarisation et

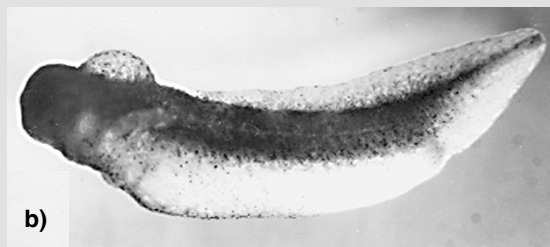
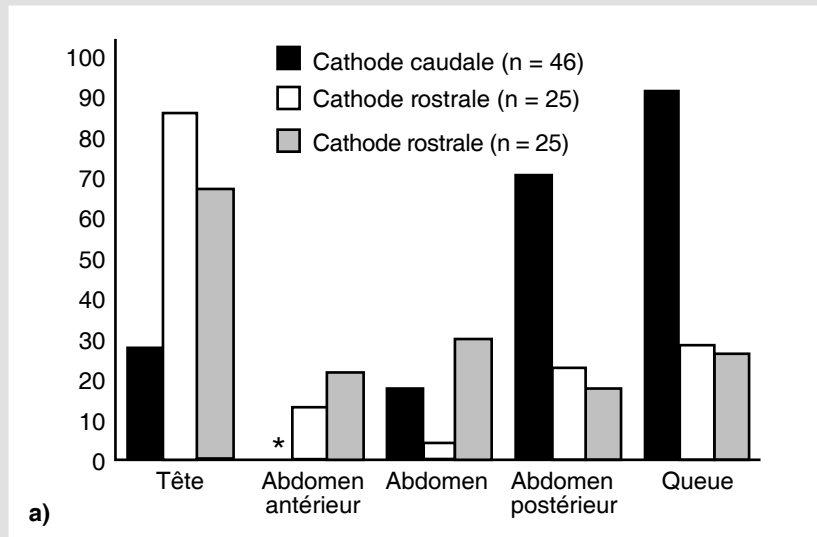


Figure 10. Effet d'un champ électrique de 50 mV/mm sur des embryons d'axolotl orientés dans trois positions par rapport à la cathode du champ.

a) Le graphique montre le pourcentage de défauts dans des parties du corps dans les trois différentes orientations : cathode caudale (face à la queue), cathode rostrale (face à la tête) et perpendiculaire. b) L'embryon orienté la tête vers la cathode présente une bosse importante sur la surface dorsale de la tête, ainsi que des défauts dans d'autres structures du crâne. c) L'embryon orienté la queue vers la cathode montre un développement anormal de la queue et un abdomen en é. d) Embryon de contrôle non exposé montrant des structures normales.

Source : R. Borgens, *J. Exp. Zool.*, Vol. 268, pp. 323-338, 1994. Republié avec l'autorisation de Wiley-Liss, Inc.

augmentait de 16 à 56 mV. L'ectoderme de la tête était dépolarisé, et souvent de polarité inversée, avec un changement de 30 à 80 mV négatif. Le seuil de la force de champ nécessaire pour altérer le PTE fut trouvé entre 6 mV/mm et 25 mV/mm.

Robinson et son élève Hotary adoptèrent une approche différente pour altérer le champ électrique dans l'embryon de *Xenopus*. Ils ont d'abord réexaminé le courant sortant du blastopore et ils l'ont trouvé plus important que dans leurs mesures précédentes. Les courants étaient détectés sortant du blastopore au stade de 14 jours et faisant un pic au stade de 22 jours, coïncidant avec le processus de neurulation de l'embryon. Durant cette période, les courants endogènes s'étendaient de 2 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ jusqu'à un pic de 115 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Figure 11).

Que se passerait-il si ces courants naturels pouvaient être annulés ou même inversés en polarité? Quel en serait l'effet sur le développement de l'embryon? Robinson décida d'utiliser une microélectrode insérée juste sous l'ectoderme de l'embryon pour interrompre le flux de courant

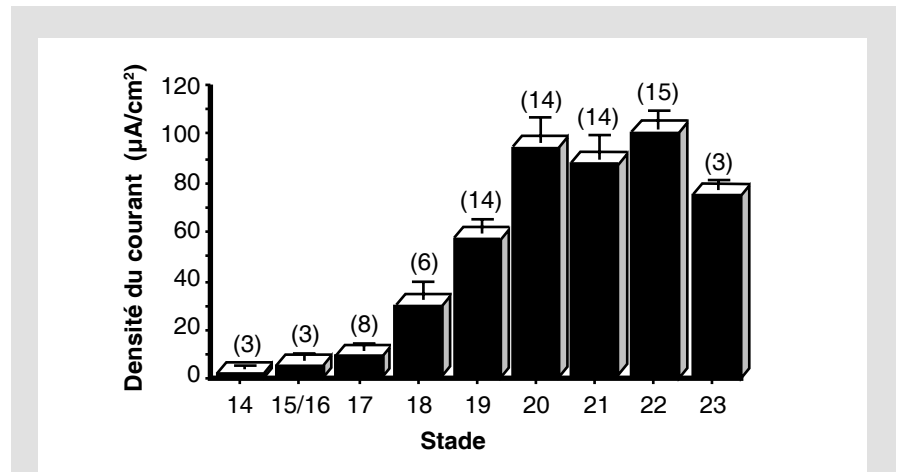


Figure 11. Densités moyennes de courant sortant mesurées au blastopore d'embryons de *Xenopus* de 14 à 23 jours. Les nombres entre parenthèses au-dessus des barres indiquent combien d'embryons ont été examinés à ce stade.

Source : K.R. Robinson, *Dev. Biol.*, Vol. 166, pp.789-800, 1994. Republié avec l'autorisation de la presse académique.

naturel. Cependant, il devait avant cela déterminer la force de courant requise pour interférer avec le courant du blastopore. En mesurant le courant sortant du blastopore avec la microsonde à extrémité vibrante,

simultanément avec l'application du courant de la microélectrode, il trouva qu'un courant appliqué de 100 nano-ampères (nA) éliminait le flux de courant sortant. Un courant appliqué de 500 nA inversait effica-

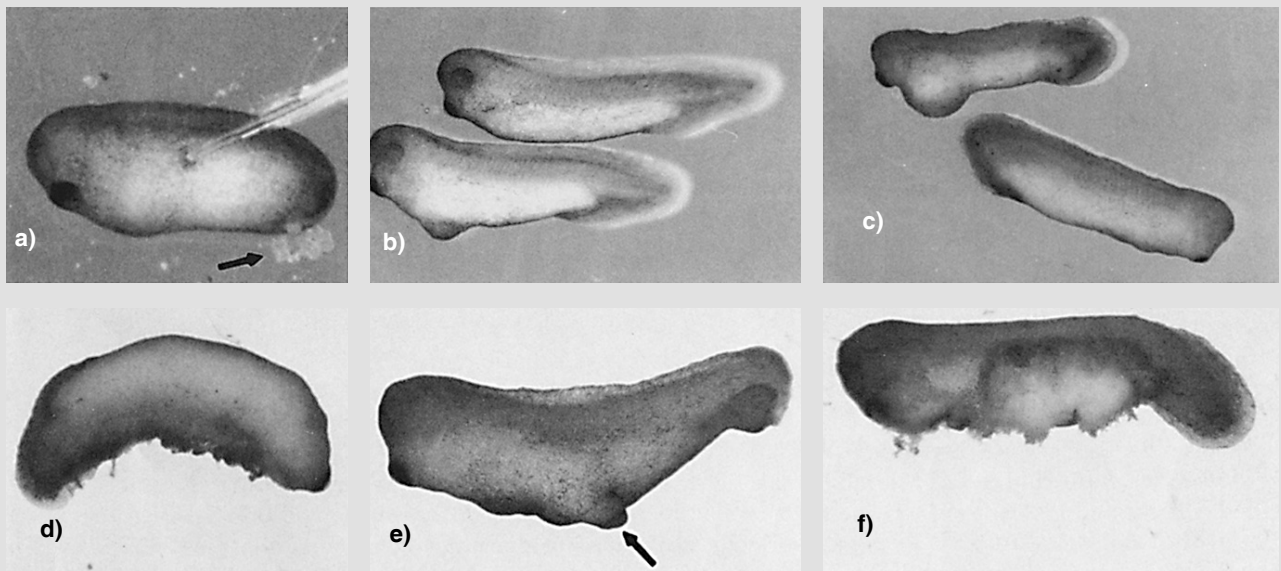


Figure 12. Effets des courants électriques appliqués à l'intérieur des embryons de *Xenopus*.

a) Un courant de 100 nA appliqué vers l'intérieur au moyen d'une électrode annule le courant naturel et provoque l'éjection des cellules à l'extérieur du blastopore. b) Embryon traité montré à un stade ultérieur (en bas) avec un contrôle non traité (en haut). On remarque la bosse ventrale et la forme en *e*, en le comparant à l'embryon de contrôle. c) Embryon traité avec 100 nA (au-dessus) et le contrôle (au-dessous). d) Un embryon traité avec un courant de 250 nA engendre des structures réduites de la tête. e) Embryon traité avec un courant de 250 nA présentant une structure réduite de la tête, une queue anormale et une glande ectopique (èche). f) Embryon traité avec 500 nA, qui inverse complètement la polarité du courant naturel. Il se désintègre le long de son côté ventral.

Source : K.R. Robinson, *Dev. Biol.*, Vol. 166, pp.789-800, 1994. Republié avec l'autorisation de la presse académique.

gement la polarité du flux de courant au blastopore, induisant de forts courants vers l'intérieur.

Ce test fut effectué sur les embryons de *Xenopus*, entre les stades de 14 et 16 jours, et le courant fut appliqué pendant 11 heures. Un groupe d'embryons exposés à 100 nA de courant entrant, annulant le courant du blastopore, montra des structures significativement anormales dans 20 embryons sur 23. Des défauts communs furent trouvés dans la structure de la tête : l'absence du développement de l'œil et l'incapacité du tube neural à ressouder au bout antérieur. Dans de nombreux cas apparurent des poches sur la surface ventrale de l'embryon qui parfois se rompaient, répandant des cellules dans l'eau environnante (**Figure 12**). A des plus hauts niveaux de courant appliqué (250 nA ou 500 nA), les anomalies devenaient plus graves (**Figure 12f**).

Une expérience supplémentaire fut effectuée sur deux groupes d'embryons auxquels on appliqua un courant de 100 nA de polarité opposée. Dans les cinq embryons avec des courants vers l'intérieur, tous développèrent des anomalies. Dans les cinq autres où le courant appliqué circulait vers l'extérieur, augmentant le courant endogène, un seul se développa anormalement. Les résultats renforcèrent l'idée que la rupture de polarité du champ électrique global dans l'embryon a de graves effets sur son développement.

Une forme externe peut-elle exister sans une différenciation interne ?

En 1995, Borgens en collaboration avec Riya Shi réalisa une série d'expériences qui démontrèrent le rôle crucial joué par le champ électrique du tube neural pour diriger la différenciation de la structure interne de l'embryon. Les résultats remirent en cause également la notion longtemps acceptée selon laquelle la différenciation interne des cellules produit la forme externe de l'embryon.

Les embryons d'axolotl complètent la formation et la fusion du tube neural vers le stade de 20 jours. Borgens avait auparavant mesuré le potentiel électrique à travers les parois du tube neural chez l'axolotl, et

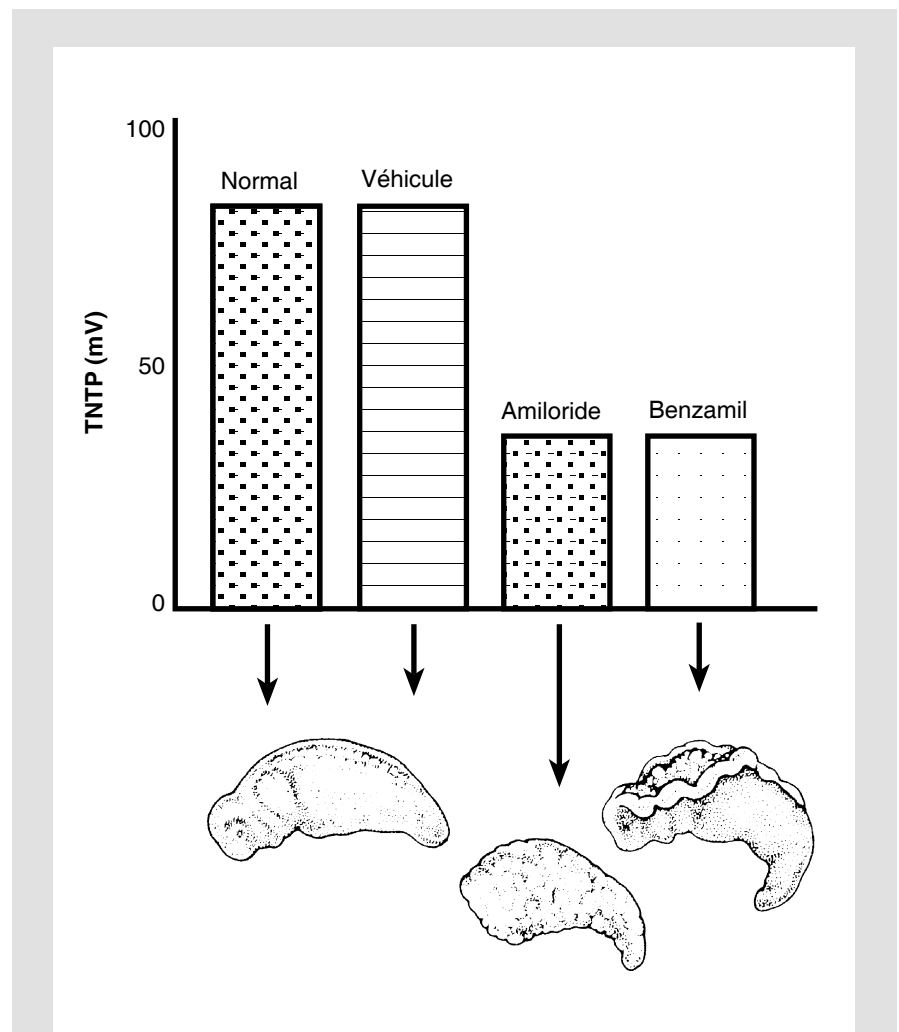


Figure 13. Effet d'une réduction du champ électrique du tube neural sur le développement. Les barres du graphique montrent le potentiel électrique du tube neural (PTTN) dans des embryons traités avec les bloquants du canal sodium, l'amiloride et le benzamil, comparé à l'embryon normal. Les dessins en dessous décrivent la morphologie très anormale des embryons traités. L'embryon traité à l'amiloride manque de toutes les structures de la tête. Le tube neural de l'embryon traité au benzamil se dissocie et s'exvagine à travers l'ectoderme externe de la surface dorsale.

Source : R. Borgens, *Dev. Dynamics*, Vol. 203, pp. 456-467, 1995. Republié avec l'autorisation de Wiley-Liss, Inc.

avait trouvé qu'il se situait en général entre 80 et 90 mV, ce qui produit de forts champs électriques qui ne sont pas radialement uniformes dans les cellules environnantes. L'ectoderme et le tube neural sont tous deux générateurs de champs électriques dans l'embryon. Borgens voulait tester ce qui arriverait à l'embryon si seul le champ interne généré par le tube neural était interrompu. Le potentiel électrique du tube neural dépend largement du transport d'ions sodium et d'autres ions positivement chargés à l'extérieur du lumen interne du tube.

Borgens et Shi en profitèrent pour utiliser des bloquants du canal sodium (le benzamil et l'amiloride) afin de réduire le potentiel du tube transneural (PTTN) chez des embryons d'axolotl aux stades de 21 à 23 jours. Quand le benzamil ou l'amiloride fut introduit dans le lumen du tube neural, le PPTN fut réduit de 50 % au plus (**Figure 13**). On laissa ensuite les embryons traités se développer pendant 36 à 56 heures de plus, après quoi ils furent collectés et comparés aux embryons de contrôle aux stades de 31 à 34 jours.

Dans tous les embryons où le

PTTN s'était effondré en raison du traitement par le benzamil ou l'amiloride, on trouvait des anomalies de deux types différents. Le premier était la formation d'embryons qui avaient une organisation interne complètement chaotique et une morphologie externe grossièrement malformée. Ils manquaient d'yeux, d'oreilles ou de structures du tube neural, et ne ressemblaient en aucune manière à la structure normale des embryons de contrôle. Il était impossible de déterminer le côté dorsal du côté ventral, ou la tête de la queue, car les axes majeurs du corps étaient absents. Nombre de ces embryons ne survécurent pas au stade de 34 jours. Le second groupe apparut relativement normal dans sa forme externe mais avec une structure interne anormale et indifférenciée (Figure 14). Ils furent appelés des « pseudo-embryons ». Ces derniers présentaient une désintégration des cellules du tube neural. Ils manquaient de toutes les structures internes normales, y compris les intestins. Dans les embryons où des groupes de cellules avaient commencé à former le primordia de la chorde et les somites avant le traitement, ces cellules furent trouvées dissociées. Presque tout le corps était rempli de masses désorganisées de cellules indifférenciées. Dans certains de ces embryons, comme les cellules du tube neural avaient perdu leur polarité, elles formaient une évagination en couche et faisaient irruption à travers la couche supérieure de l'ectoderme, ce qui conduisait à la mort de l'embryon. On détermina que dans les pseudo-embryons qui survécurent, les cellules du tube neural n'étaient pas tuées par le traitement avec les bloquants des canaux sodium : elles perdaient juste leur capacité à générer un champ électrique, ce qui semble déterminer leur association physique.

La formation de ces pseudo-embryons remet en question le concept selon lequel la différenciation du tissu interne détermine la forme externe (morphologie). Dans ce cas, interrompre le champ interne du tube neural a entraîné un manque de différenciation de la structure interne. Néanmoins, la forme globale de l'embryon s'est encore développée de façon presque normale. Borgens décrit cela comme le découplage entre le contrôle global de la formation d'un modèle et les contrôles locaux de la



Figure 14. Pseudo-embryon. Section demi-sagittale à travers un pseudo-embryon, montrant le manque total de structure interne avec seulement des groupes de cellules indifférenciées. La structure interne normale d'un embryon d'axolotl est surimposée (en gris) juste au-dessus du pseudo-embryon. On remarque que la forme externe du pseudo-embryon est fondamentalement normale.

Source : R. Borgens, *Dev. Dynamics*, Vol. 203, pp. 456-467, 1995. Republié avec l'autorisation de Wiley-Liss, Inc.

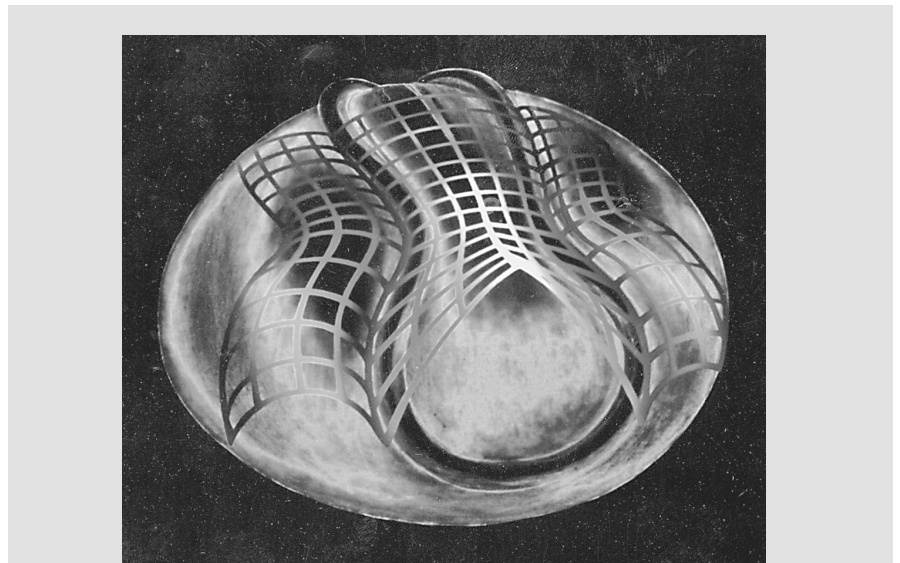


Figure 15. Topographie d'un champ électrique à la surface d'un embryon d'amphibien. Le graphique décrit l'intensité du potentiel de voltage à la surface de l'embryon pendant la neurulation.

Source : R. Borgens, *Dev. Dynamics*, Vol. 202, pp. 101-114, 1995. Republié avec l'autorisation de Wiley-Liss, Inc.

différenciation des tissus.

Cela peut signifier que le champ externe global produit par l'ectoderme, qui n'a pas été directement affecté dans les expériences, continue de guider la formation de la forme de l'embryon en l'absence du champ du tube neural. Une situation analogue a été rencontrée dans la formation des pseudomembres lors

de la régénération stimulée électriquement chez les grenouilles adultes. La structure interne du membre était anormale et désorganisée, toutefois le membre apparaissait presque normal extérieurement.

Ces résultats ne peuvent s'expliquer par la vision traditionnelle de la relation entre la structure du tissu interne et la forme externe.

Utilisation des champs électriques pour traiter une blessure de la moelle épinière

Le Dr Richard Borgens est le directeur du Centre de recherche sur la paralysie à l'université de Purdue. En 1992, après des années d'études sur la manière dont les champs électriques peuvent influencer le développement des cellules nerveuses, Borgens rechercha si un courant électrique appliqué pouvait aider à réparer la moelle épinière blessée de chiens paralysés. Il conçut des stimulateurs électriques, dont les électrodes pouvaient être implantées près de l'emplacement de la blessure de la moelle épinière, pour délivrer un courant de 200 μ A qui crée un champ de force allant de 135 à 210 microvolts/mm.



Dans la moelle épinière de mammifère, les axones s'étendent des corps cellulaires du nerf dans les deux directions. Il était donc nécessaire d'inverser la polarité du champ toutes les quinze minutes, car les axones se développent de préférence vers la cathode du champ. Dans un essai clinique sur des chiens blessés, les stimulateurs de champ électrique entraînaient un progrès significatif dans la fonction neurologique après six mois. Il s'avéra que pour que les stimulateurs soient efficaces, le traitement devait commencer dans les deux semaines après la blessure.

Pour la première fois, Borgens et son collègue, le Dr Riyi Shi, ont

restauré la transmission de l'impulsion électrique dans une moelle épinière isolée de mammifère. Travaillant sur des moelles épinières isolées de cochons d'Inde, ils utilisèrent le polymère polyéthylène glycol (PEG) pour souder les moelles épinières endommagées. Le PEG amalgame les membranes des cellules et, quand il est appliqué sur la zone de la blessure, il agit comme une colle cellulaire. Lorsque les moelles épinières traitées au PEG furent testées pour la transmission de l'impulsion électrique, 5 à 58 % des impulsions étaient rétablies. Pour être efficace, le traitement au PEG doit être effectué dans les vingt-quatre à trente-six heures.

Ce traitement est maintenant étudié dans des modèles d'animaux vivants, et l'on peut espérer qu'il sera éventuellement utilisé dans des essais cliniques chez les humains. Si cela réussit, on peut espérer une révolution dans la manière de traiter un traumatisme de la moelle épinière.

Une théorie du développement par le champ

Il existe un paradoxe inhérent dans les décennies de recherches sur les champs électriques dans les systèmes vivants. Même si les cellules sont la source du champ électrique, leur comportement est cependant subordonné au champ. En outre, l'existence du champ électrique peut précéder le mouvement ou la différenciation des

cellules. Cela peut se voir clairement dans la formation du membre embryonnaire, où le courant jaillit de la région où se formera le bourgeon du membre, 4 à 6 jours avant son émergence physique. Dans de nombreux cas de développement embryonnaire, les cellules paraissent « croître dans » la forme et la direction défini par le champ électrique.

Ce problème fut étudié par le grand biologiste russe Alexandre Gurwitch qui, dans son écrit intitulé *Un concept des champs embryonnaires* (1922), proposa que les cellules créent un

champ déterminant leurs modèles de migration et de développement futurs lorsqu'un organisme se développe (les travaux de Gurwitch sont présentés dans les numéros de *Fusion* n°71, 72 et 73). Selon Gurwitch, le champ avait une nature vectorielle, ce qui est certainement le cas pour les champs électriques étudié par Borgens et Robinson.

Les travaux de Borgens et Robinson ont produit un nouveau concept de développement par le champ. En 1995, Borgens proposa que les champs électriques créent des gradients de voltage tridimensionnels qui établissent les coordonnées de position, créent le modèle et influencent le développement de l'embryon. D'après les mesures du champ, il était possible de construire une carte topographique du modèle de champ électrique à la surface de l'embryon. Les courants circulant dans le jeune embryon sont alignés avec les axes principaux du corps : tête-queue, dorsal-ventral. Les gradients de voltage, comme celui trouvé le long de l'axe tête-queue, permettent aux cellules de connaître les coordonnées de leur position et influencent la direction ainsi que la destination des cellules migrantes. Les champs résultants dans un embryon, comme le champ du tube neural, ne sont pas uniformes dans toutes les directions.

De plus, des régions différentes de l'embryon peuvent avoir une résistance différente aux flux de courant, produisant un modèle de champ très complexe et variable qui pourrait être nécessaire pour créer des tissus et structures distincts. Les divers types de cellules donnent des réponses différentes au champ électrique et différents seuils pour produire un effet. Les cellules musculaires s'orientent perpendiculairement aux pôles d'un champ électrique, tandis que les cellules nerveuses développent leurs extensions de préférence vers le pôle négatif. Le champ électrique permet à l'embryon de créer des singularités en lui-même, même si ce champ est global.

Pour Robinson, l'embryon produit des fuites et des flux de courant électrique de façon spécifique à chaque stade et régulée par le développement. L'embryon utilise le flux de courant et le champ électrique pour diriger la formation des structures principales et établir la polarité de forme. On le voit dans les flux de courant associés

au repliement du tube neural, la formation précoce des intestins et dans le développement du bourgeon du membre.

Le modèle des flux de courant et des gradients de voltage change au cours des phases du développement et varie selon les espèces. Toutefois, *le modèle pour une espèce donnée, peu importe sa phase, est invariant*. Ce concept fait directement écho au principe d'invariance de Gurwitsch. Ce dernier proposa également que le champ embryonnaire varie à travers le développement mais que ce modèle soit invariant pour une espèce donnée. Il est intéressant de noter les similarités entre le concept de champ de Gurwitsch et les idées développées par Borgens et Robinson, bien qu'ils n'avaient pas connaissance de ces travaux.

Borgens et Robinson travaillent actuellement à combler le vide entre les sommes d'information sur ce qui se produit à l'échelle moléculaire et leurs découvertes sur le rôle crucial du champ électrique dans le développement de l'embryon. Les scientifiques formés seulement en biologie moléculaire réductionniste ne pourront jamais découvrir le rôle *global* joué par le champ électrique dans le développement. Il est impossible d'étudier tous les minuscules détails des événements se produisant à l'échelle moléculaire, et ensuite de déterminer que quelque chose de plus vaste doit contrôler ces processus variés. En fait, Borgens et Robinson ont été capables de faire ces découvertes car ils avaient été formés dans une perspective historique de la science par des professeurs qui n'étaient pas enfermés dans une idéologie réductionniste.

Commentant les limitations imposées sur la science contemporaine par l'idéologie moléculaire réductionniste prédominante, Richard Borgens déclara que « *cela revient à enlever la biologie au biologiste* ». Le problème est que cette approche a tenté de réduire les processus vivants à rien de plus qu'un ping-pong moléculaire, tout en évitant les questions fondamentales sur le caractère unique des systèmes vivants. Kenneth Robinson déclara de façon amusante qu'il « *aurait des douzaines de contrats de recherche supplémentaires s'il pouvait trouver un gène ou un canal ionique* » responsable de tous les champs électriques qu'il a trouvés durant des décennies de recherche !

Les découvertes de Borgens et Robinson ont posé les bases pour une révolution dans la compréhension des mécanismes permettant aux organismes vivants de créer des champs électriques pour diriger leur développement. Les prochaines percées en biologie seront probablement réalisées par ces scientifiques, qui emploient le concept de champ pour résoudre les problèmes aux niveaux moléculaire, cellulaire et organique.n

Colin Lowry, biologiste cellulaire, est un rédacteur associé au magazine *21st Century*.

Références

R.B. Borgens, 1982. « What is the role of naturally produced electric current in vertebrate regeneration and healing ? », *Int. Rev. Cytology*, Vol. 76, pp. 245-298.

_____, 1989. « Natural and Applied Currents in Limb régénération and Development » in *Electric Fields and Vertebrate Repair*, pp. 27-75. (New-York : Alan R. Liss Publishing).

R.B. Borgens, L. Callahan et M.F. Rouleau, 1987. « Anatomy of axolotl ank integument during limb bud development with special reference to a transcutaneous current predicting limb formation », *J. Exp. Zool.*, Vol. 244, pp. 203-214.

R.B. Borgens et M.E. Metcalf, 1994. « Weak applied voltages interfere with amphibian morphogenesis and pattern », *J. Exp. Zool.*, Vol. 268, pp. 323-338.

R.B. Borgens, M.E. Metcalf et R. Shi, 1994. « Endogeneous ionic currents and voltages in amphibian embryos », *J. Exp. Zool.*, Vol. 268, pp. 307-322.

R.B. Borgens, M.F. Rouleau et L.E. Delaney, 1983. « A steady flux of ionic current predicts hind limb development in the axolotl », *J. Exp. Zool.*, Vol. 228, pp. 491-503.

R.B. Borgens et R. Shi, 1995a. « Three-dimensional gradients of voltage during development of the nervous system as invisible coordinates for the establishment of embryonic pattern », *Developmental dynamics*, Vol. 202, pp. 101-114.

_____, 1995b. « Uncoupling histogenesis from morphogenesis in the vertebrate embryo by collapse of the transneural tube potential », *Developmental dynamics*, Vol. 203, pp. 456-467.

R.B. Borgens, J.W. Vanable et L.F. Jaffe, 1977a. « Bioelectricity and régénération : Large currents leave the stumps of regenerating newt limbs », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 74, pp. 4528-4532.

_____, 1977b. « Bioelectricity and régénération : initiation of frog limb régénération by minute currents », *J. Exp. Zool.*, Vol. 200, pp. 403-416.

_____, 1979a. « Small artificial currents enhance Xenopus limb régénération », *J. Exp. Zool.*, Vol. 207, pp. 217-255.

_____, 1979b. « Reduction of sodium dependent stump currents disturbs urodele limb régénération », *J. Exp. Zool.*, Vol. 209, pp. 377-386.

A.G. Gurwitsch, 1922. « Über den Begriff des Embryonalen Feldes », *W. Roux Archiv für Entwicklungsmechanik*, Vol. 51, pp. 383-415.

S. Ingvar, 1920. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Vol. 17, pp. 198-199.

L.F. Jaffe et R. Nuccitelli, 1974. « An ultrasensitive vibrating probe for measuring steady extra-cellular currents », *J. Cell. Biol.*, Vol. 63, pp. 614-628.

L.F. Jaffe et M.M. Poo, 1979. « Neurites grow faster toward the cathode than the anode in a steady field », *J. Exp. Zool.*, Vol. 209, pp.115-128.

E.J. Lund, 1947. *Bioelectric Fields and Growth* (Austin : Univ. Texas Press).

A. Monroy, 1941. « Ricerche sulle correnti elettriche dalla superficie del corpo di tritoni adulti normali e durante la reigenerazione degli arti e della coda », *P Pubbl. Stn. Zool. Napoli* (II), Vol. 18, pp. 265-281.

K.R. Robinson, 1983. « Endogenous electrical current leaves the limb and pre-limb region of the Xenopus embryo », *Developmental Biology*, Vol. 97, pp. 203-211.

_____, 1985. « The responses of cells to electrical fields : A review », *J. Cell. Biol.*, Vol. 101, pp. 2023-2027.

K.R. Robinson, L. Hinkle et C.D. McCaig, 1981. « The direction of growth of differentiating neurons and myoblasts from frog embryos in an applied electric field », *J. Physiology*, Vol. 314, pp. 121-135.

K.R. Robinson et K.B. Hotary, 1990. « Endogenous electrical currents and the resultant voltage gradients in the chick embryo », *Developmental Biology*, Vol. 140, pp. 149-160.

_____, 1992. « Evidence of a role for endogenous electrical fields in chick embryo development », *Development*, Vol. 114, pp. 985-996.

_____, 1994. « Endogenous electrical currents and voltage gradients in Xenopus embryos and the consequences of their disruption », *Developmental Biology*, Vol. 166, pp. 789-800.

K.R. Robinson et C.D. McCaig, 1982. « The ontogeny of the transepidermal potential difference in frog embryos », *Developmental Biology*, Vol. 90, pp. 335-339.

K.R. Robinson et M. Messerli, 1996. « Electric Embryos : The embryonic epithelium as a generator of developmental information », in *Frontiers in Neurobiology*, Vol. 2, C.D. McCaig ed. (Portland Press), pp. 131-149.

K.R. Robinson et R.F. Stump, 1983. « Xenopus neural crest cell migration in an applied electrical field », *J. Cell Biology*, Vol. 97, pp. 1226-1233.

_____, 1984. « Self generated electrical currents through Xenopus neurulae », *J. Physiology*, Vol. 352, pp. 339-352.

P. Weiss, 1934. *J. Exp. Zool.*, Vol. 68, pp. 393-448.