

# Que les modèles de culture prolongée postimplantatoire nous apprennent-ils sur le développement de l'embryon humain ?

**What do post-implantation extended culture models tell us about the development of the human embryo?**

Lucile Ferreux<sup>1</sup>  
Julie Firmin<sup>1</sup>  
Khaled Pocate-Cheriet<sup>1</sup>  
Catherine Patrat<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), hôpital universitaire Paris Centre, centre hospitalier universitaire (CHU) Cochin, service d'histologie, d'embryologie et de biologie de la reproduction, 53 avenue de l'Observatoire, 75014 Paris, France  
<Lucile.ferreux@aphp.fr>

<sup>2</sup> Université Paris Descartes, U1016, Institut Cochin

**Résumé.** Étudier le développement embryonnaire humain précoce est un défi à la fois éthique et technique. De plus, la recherche sur l'embryon humain est soumise à une réglementation stricte. Du fait de la difficulté d'étudier le développement embryonnaire postimplantatoire *in vivo*, et en l'absence de modes de culture *ex vivo* suffisamment performants, des modèles de culture *in vitro* pour étudier la morphogenèse ont été proposés. Ces modèles, initialement développés sur l'embryon de souris et plus récemment appliqués à l'embryon humain, ont permis d'analyser l'organisation de l'embryon à la période cruciale péri-implantatoire et d'appréhender ces étapes de développement jusqu'alors méconnues car difficilement accessibles en raison de l'enfouissement endométrial de l'embryon. Le développement de nouvelles techniques d'analyse d'image, combiné à la mise au point de modèles de culture (amélioration de la composition des milieux de culture, développement de supports en trois dimensions [3D]), ont permis de révéler la croissance et la morphogenèse de l'embryon en culture *in vitro* très prolongée, jusqu'au quatorzième jour postfécondation. Ainsi, ces nouveaux modèles ont abouti au développement d'une organisation cellulaire polarisée en 3D, à partir de cellules pluripotentes non jointives. L'étude du développement de l'embryon de mammifère décrit les étapes allant de la transition du blastocyste vers le disque didermique formé des deux feuillets, l'épiblaste et l'endoderme primitif dans l'embryon humain ou jusqu'au stade d'œuf cylindre chez la souris, structure composée de la cavité proamniotique délimitée par l'épiblaste et l'endoderme extra-embryonnaire entouré de l'endoderme primitif. Au décours du développement péri-implantatoire, deux modifications majeures concernant la morphogenèse embryonnaire se déroulent, avec l'établissement de l'axe antéropostérieur en 2D et son évolution vers une structure en 3D, au moment de la gastrulation. Ces prouesses techniques de culture *in vitro* montrent la capacité de l'embryon humain, comme prouvé précédemment chez la souris, de se développer en l'absence de tissu maternel. Les études récentes soulignent l'autonomie de l'embryon dans cette organisation précoce et ceci jusqu'à la fin de la deuxième semaine postfécondation. Ces avancées techniques, permettant une culture embryonnaire à des stades toujours plus poussés, soulèvent néanmoins un certain nombre de questions sur le plan éthique et des limites à poser.

**Mots clés :** embryon, période péri-implantatoire, culture prolongée *in vitro*, humain

**Summary.** Studying early development in human embryo is both an ethical and a technical challenge. In addition, a strict legislation surrounds research on human embryo. As it is difficult to study the post-implantation embryonic development *in vivo* and without enough efficient culture method previously available *ex vivo*, *in vitro* culture models have been proposed for studying morphogenesis. These models, initially developed on mouse embryo and more recently on human embryo, allowed analyzing the embryo organization at this crucial peri-implantation period. However, it remained a "black box" because it takes place as the blastocyst is implanting into the uterus. The development of new techniques of image analysis and the improvement of culture models, thanks to the advance of both the culture media composition and the three dimensions (3D) supports development, made it possible to reveal the growth and morphogenesis of the embryo in *in vitro* very prolonged culture methods, until the 14<sup>th</sup> day post-fertilization. More precisely, and to summarize, these recent studies paved the way of a better understanding of the embryo development from pluripotent cells to a three-dimensional polarized cellular organization. The transition from the blastocyst to the dermal disc surrounded by the two layers : the epiblast and the primitive endoderm in the human embryo or egg-cylinder stage in the mouse, a structure composed of the pro-amniotic cavity delimited by the epiblast and the extra-embryonic endoderm surrounded by the primitive endoderm. In the course of peri-implant development, two major modifications concerning embryonic morphogenesis take place with the establishment of the anteroposterior axis in 2D and its evolution towards a 3D structure at the time of gastrulation. These technical significant

progress report the ability of the human embryo, as previously proved in mice, to develop in the absence of maternal tissue. Recent studies emphasize the autonomy of the embryo in this early organization. Nevertheless these technical advances, allowing an embryonic culture at increasingly advanced stages, raise a certain number of ethical issues.

**Key words:** mammalian embryo, peri-implantation period, prolonged *in vitro* culture, human embryo

Chez l'homme, l'embryon se développe durant la période allant de la première division du zygote (jour 1 [J1] post-fécondation) jusqu'à la huitième semaine de développement (SD). *In vivo*, l'ensemble des étapes du développement de l'embryon humain est naturellement inaccessible à la recherche. Or, comprendre les mécanismes et voies de signalisation impliqués dans le développement de l'embryon humain, notamment après l'implantation, est un enjeu majeur de la biologie humaine de la reproduction et du développement, non seulement en termes de connaissances scientifiques, mais aussi et surtout dans l'idée d'améliorer les techniques de fécondation *in vitro* (FIV), de comprendre le mécanisme des fausses couches ou dans le cadre de la médecine régénérative. Le développement postimplantatoire qui précède la gastrulation est en effet crucial sur le plan des réorganisations tissulaires concomitantes.

Avec l'avènement des techniques de FIV, les premières étapes du développement de l'embryon humain (de J1 à J7) ont été rendues accessibles à la recherche, et l'on voit depuis plusieurs années fleurir une littérature abondante sur les principaux mécanismes régulant le développement préimplantatoire de l'embryon [1-3]. En revanche, l'embryogenèse péri-implantatoire est une période de développement peu connue, d'une part pour des raisons éthiques évidentes, d'autre part en raison des difficultés d'étude liées à l'enfouissement embryonnaire endométrial. Les principales études ont longtemps porté sur des modèles d'embryons d'autres mammifères étudiés *in vivo*. Grâce à ces modèles, en particulier de souris, la morphogenèse et les différentes voies de signalisation impliquées dans le processus implantatoire sont devenues accessibles, et pour certaines, transposables à l'humain. Bien qu'il existe de grandes différences morphologiques entre les différents embryons mammifères à ces stades, il semblerait en effet que certaines étapes initiales du développement postimplantatoire soient conservées au cours de l'évolution. Chez l'humain, les possibilités techniques sont restées difficilement accessibles. Depuis de nombreuses années, l'analyse des produits de grossesse a permis d'accéder à des embryons après leur implantation [4]. De même, des essais de culture embryonnaire sur culture endométriale [5] ont facilité l'étude du développement embryonnaire à des stades un peu plus tardifs. Ces études sont néanmoins restées confidentielles et ce n'est que très récemment que la possibilité de culture *in vitro* d'embryons humains en l'absence de tissu maternel a ouvert de nouvelles perspectives [6].

## Utilisation de modèles *in vitro* en l'absence de tissu maternel

### Chez la souris

Différents substrats et supports biologiques ont été testés initialement, afin de permettre l'implantation « artificielle » de l'embryon *in vitro* et de mimer cette période cruciale. Des surfaces sans revêtement à type de plaques de plastique ont ainsi été expérimentées [7], ainsi que des surfaces revêtues de collagène, de laminine ou de fibronectine [8, 9]. Ont également été testés des modèles de coculture sur cellules endométriales, afin de se rapprocher au mieux de l'environnement utérin [10] ou en présence de cellules somatiques telles que des fibroblastes ou des cellules Vero isolées à partir de cellules épithéliales de rein de singe [11].

Les premiers travaux de modèles de culture *in vitro* d'embryons pour étudier les stades péri-implantatoires ont été initiés dans les années 1970, avec un succès limité [9]. Cependant, il s'agissait là d'une étape préalable fondamentale, puisque ces expériences sur le modèle murin ont permis d'établir les premières images, sorte « d'état de l'art » du développement embryonnaire, péri- ou postimplantatoire. Deux faits majeurs ressortent de ces premiers travaux de culture embryonnaire prolongée *in vitro* : premièrement, il semble crucial de compléter le milieu avec du sérum issu de sang de cordon de veau fœtal, deuxièmement, il convient de fournir à l'embryon un support composé d'un hydrogel de polyacrylamide d'une rigidité adaptée et recouvert d'une matrice protéique, dont le collagène, qui est essentiel. Ces études préliminaires chez la souris ont facilité les travaux de l'équipe de Zernicka-Goetz, et par là même la mise en évidence précise des événements et des réorganisations cellulaires qui s'opèrent au cours de l'implantation embryonnaire [12]. Ces avancées ont été obtenues grâce à l'optimisation des systèmes de culture *in vitro*, notamment via l'utilisation de blastocystes dépellucidés, après exposition au Tyrode acide, déposés directement sur des microplaques de plastique sous observation microscopique – selon un système de type *time-lapse*. Il était également nécessaire d'ajuster la composition du milieu de culture afin de pallier les variations de lots entre échantillons de sérum fœtal. Afin de faire évoluer et d'améliorer la composition du milieu initialement décrit par Morris *et al.* [12], la préparation a été complétée par un cocktail de  $\beta$ -œstradiol, de progestérone, de N-acétyl-I-cystéine, et d'un mélange d'insuline, de transferrine, de sélénium d'éthanolamine, baptisé IVC2 (pour *in vitro culture 2*) [13].

---

À partir de ces simples conditions, environ 80 % des embryons se sont attachés au support avec multiplication et propagation des cellules du trophoctoderme. Par la suite, environ la moitié de ces embryons ont atteint l'aspect d'œuf cylindrique, reproduisant les mêmes profils d'expression dans l'espace des gènes spécifiques de la masse cellulaire interne (*Oct4*) ou du trophoctoderme (*Cdx2*) que lors du développement naturel de l'embryon [12].

### Chez l'homme

Jusqu'en 2016, les seules indications du développement embryonnaire humain péri- et postimplantatoire provenaient de descriptions anatomiques de produits de fausses couches ou de pièces chirurgicales d'hystérectomie [14]. Des modèles *ex vivo* de coculture d'embryons donnés pour la recherche [5, 15] sur cellules endométriales, pour tenter de se rapprocher des conditions utérines, ont ensuite été décrits. Ces publications sont cependant restées confidentielles, le modèle difficile à établir (nécessité de disposer de cellules endométriales humaines, mise au point technique, etc.) et insuffisant pour récapituler les étapes du développement de l'embryon humain péri- et postimplantatoire.

Après avoir établi un modèle de culture *in vitro* robuste chez la souris, l'équipe de Zernicka-Goetz *et al.* a pu transposer ce modèle sur l'embryon humain avec succès [12]. Afin de s'assurer de la reproductibilité de ce modèle chez l'humain, deux autres équipes ont tenté de reproduire ces expériences, l'une à Cambridge [16] et l'autre à l'université de Rockefeller [6]. Ainsi ces deux équipes ont-elles accompli la prouesse de permettre la culture très prolongée d'embryons humains jusqu'au stade de gastrulation, soit quatorze jours postfécondation. Toutefois, au-delà de J12, les auteurs observent un collapsus des cavités avec un développement désorganisé des structures embryonnaires sans doute lié aux conditions de culture inadéquates pour le bon développement de l'embryon humain. Néanmoins, le trophoctoderme poursuit sa différenciation en cas de culture très étendue. Ces deux études récentes ont néanmoins prouvé que l'embryon humain, comme celui de la souris, possède la capacité intrinsèque d'auto-organisation en l'absence de tissu maternel.

## Culture cellulaire en tapis versus préservation de la structure cellulaire en trois dimensions

### Méthode classique de culture en deux dimensions

Classiquement, les embryons étaient cultivés en deux dimensions, dans des coupelles ou des boîtes de Petri destinées à la culture tissulaire. La croissance embryonnaire dans des boîtes à fond de verre, recouvertes d'un hydrogel de polyacrylamide surplombé de collagène,

permettait d'obtenir des sites de fixation pour le blastocyste jusqu'au stade d'œuf cylindrique chez la souris, en présence de milieu de culture supplémenté par du sérum de cordon fœtal (SCF). Grâce à ce type de modèle de culture *in vitro*, les techniques d'imagerie moderne pouvaient être appliquées avec une résolution optimale. Le SCF nécessite néanmoins du placenta frais, et présente une grande variabilité de composition selon les échantillons, rendant les conditions expérimentales parfois hasardeuses. Du fait du manque de fiabilité et de reproductibilité de ce procédé, il apparaissait utile d'essayer d'autres substances, quand bien même elles ne surpasseraient pas les performances du SCF.

Ces systèmes en deux dimensions, bien qu'efficaces, posaient cependant des problèmes d'adhésion cellulaire au support, entraînant une déformation de l'embryon. Ce phénomène pouvait ainsi fausser l'interprétation de la cinétique de développement ou de la polarisation cellulaire, du fait de la modification des contraintes physiques s'exerçant sur l'embryon sur un support plat. De ce fait, il apparaissait nécessaire de créer un autre système, garantissant la croissance optimale de l'embryon dans ses trois dimensions.

### Culture en matrice tridimensionnelle

Les systèmes de croissance dans une matrice en trois dimensions permettent de surmonter cette difficulté, en raison de l'absence de contact direct entre le support et les lignées cellulaires. Le principe de la culture en matrice tridimensionnelle est de recréer le plus fidèlement possible l'environnement dans lequel se trouve l'embryon, en le laissant croître dans toutes les dimensions de l'espace.

Les matrices d'hydrogel utilisées peuvent être composées de collagène, d'alginate [17] ou encore d'acide hyaluronique [18]. En faisant varier la concentration des biomatériaux utilisés, il est possible de modifier la perméabilité et la rigidité du milieu afin de préserver les caractéristiques architecturales lors du développement embryonnaire. La composition de la matrice peut également être modifiée afin de se rapprocher le plus possible des conditions *in vivo*.

La culture embryonnaire tridimensionnelle contribue donc à préserver le bon déroulement de la différenciation cellulaire et à limiter les interférences avec les fonctions cellulaires.

## Étapes clefs du développement de l'embryon humain : du blastocyste à l'embryon didermique

La période allant de l'implantation à la gastrulation est une période critique, au cours de laquelle s'établit l'interconnexion entre l'embryon et l'environnement

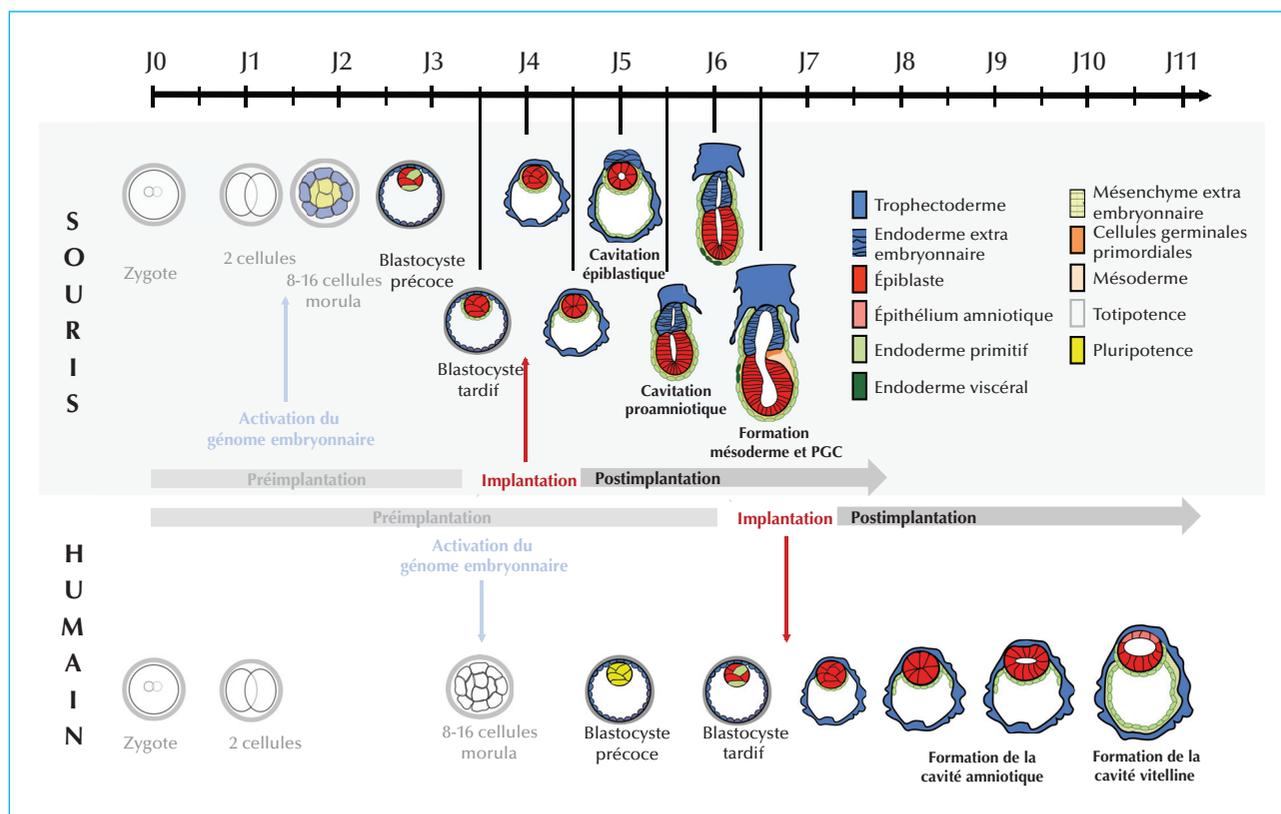
maternel. C'est également au cours de cette période que s'effectuent les événements initiaux de différenciation morphogénétique qui aboutissent à l'établissement de l'axe antéropostérieur et l'initiation de la formation de la ligne primitive.

En fin de deuxième semaine, la nidation est achevée, le bouton embryonnaire est constitué de deux cavités hémisphériques superposées et de deux feuilletts accolés : l'épiblaste (EPI) et l'endoderme primitif (EP) (également dénommé hypoblaste), qui forment, chez l'Homme, le disque embryonnaire didermique.

### L'implantation

Après les étapes clés initiales d'apposition et d'adhésion du blastocyste à l'endomètre, l'implantation est caractérisée par la prolifération et la formation de syncytiums au niveau des cellules trophoblastiques, ainsi que par l'invasion de l'endomètre par le trophoblaste pour aboutir à la nidation, c'est-à-dire l'enfouissement complet de l'embryon dans la paroi utérine. Bien que ce processus soit conservé chez les mammifères, il existe des différences en fonction des espèces, notamment concernant le site

d'apposition du trophectoderme (TE) sur l'endomètre [19]. Chez l'Homme, l'embryon s'attache au niveau du trophectoderme polaire : contingent adjacent à la masse cellulaire interne (MCI). Cette observation prévaut également dans les modèles de développement postimplantatoire *in vitro* de l'embryon humain [6, 16] et chez le singe [20]. En revanche, le blastocyste murin s'appose à la paroi utérine par le contingent mural du TE (*figure 1*). Cela suggère qu'il pourrait exister au sein du TE péri-implantatoire une différence entre les cellules polaires et murales, laquelle pourrait être médiée par des facteurs provenant de la MCI. Cette hypothèse a été confirmée chez la souris, puisque le TE polaire répond au facteur de croissance des fibroblastes (FGF), produit par les cellules de la MCI et prolifère pour former l'ectoderme extraembryonnaire et le cône ectoplacentaire [21, 22], structures absentes dans l'embryon humain péri-implantatoire. La preuve de ce concept a été faite quand a été démontrée la possibilité, chez la souris, de dériver des lignées stables de cellules souches trophoblastiques (TSC) à partir de blastocystes murins en présence de FGF [23]. Cette transition n'a pas été réalisable chez l'Homme [24], attestant qu'il existe bien des différences interspécifiques dans



**Figure 1.** Embryogénèse *in vivo* comparée chez l'Homme et la souris en péri-implantatoire. Pour la souris, à partir de J5, seule la région périembryonnaire est schématisée. Pour la souris, la schématisation se base sur les travaux de Theiler (1989), pour l'Homme sur les stades de Carnegie, travaux réalisés sur des coupes embryonnaires par l'équipe de O'Rahilly et Muller (1987). J = jour embryonnaire, cells = cellules, PGC = cellules germinales primordiales.

le cours du développement embryonnaire, y compris en ce qui concerne le contingent trophoblastique des embryons. Chez l'homme, il semblerait que les cellules du TE préimplantatoire doivent acquérir une compétence à l'implantation, caractérisée notamment par leur capacité à sécréter l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG). Cette hormone est nécessaire au dialogue moléculaire et à l'induction d'une tolérance immune entre le blastocyste et l'endomètre [25, 26]. De façon intéressante, plus les embryons ont un TE préimplantatoire de bon grade sur le plan morphologique, plus ces embryons sécrètent de l'hCG précocement et à des concentrations plus élevées [27, 28]. D'autres données montrent des différences du profil de transcription entre le TE préimplantatoire d'embryons ayant abouti à une grossesse ou à une naissance vivante et ceux ne s'étant pas implantés [29]. Les analyses récentes du transcriptome d'embryons humains préimplantatoires en cellule unique montrent qu'il existe chez l'Homme une expression différentielle, concernant une centaine de gènes, entre le TE polaire et le TE mural [1]. Les gènes surexprimés sont notamment impliqués dans l'adhésion et la communication cellulaire.

### La différenciation de l'épiblaste et de l'endoderme primitif

L'événement de différenciation le plus précoce dans la MCI aboutit à la formation de l'EPI et de l'EP. L'EPI donnera l'ensemble des tissus de l'embryon humain à proprement parler, alors que l'EP formera notamment les structures vitellines importantes dans la mise en place du système sanguin de l'embryon. Cette différenciation diverge entre les espèces, tout particulièrement entre l'Homme et la souris. La spécification de l'EP existe au sein de la MCI dès le stade du blastocyste préimplantatoire chez l'Homme [1] et chez la souris, mais la ségrégation physique de l'EPI et de l'EP est mise en place avant l'implantation du blastocyste murin, à J4, alors qu'elle semble avoir lieu après l'attachement du blastocyste humain [30], à J7-J8, dans les modèles de culture d'embryons humains [6, 16] (figure 1). De plus, même si la plupart des gènes impliqués dans cette spécification de lignée sont exprimés dans les mêmes cellules chez l'Homme, la souris, le bovin, le porc et le primate [31-33], le timing et les événements régulant les voies de signalisation diffèrent suivant les espèces [1, 2, 34]. Ainsi, on observe une expression conservée des facteurs de transcription NANOG et GATA6, et restreinte respectivement à l'EPI et à l'EP, mais avec une temporalité d'expression variable. Cependant, certains gènes notamment impliqués dans le réseau de pluripotence naïve sont spécifiques des primates comme *KLF17* et *ARGFX* [35]. Chez la souris, la différenciation des cellules de l'EP est sous le contrôle des voies de signalisation FGF/MAP-kinase, dont l'inhibition ne perturbe pas l'établissement de l'EP des embryons humains [36, 37], suggérant que

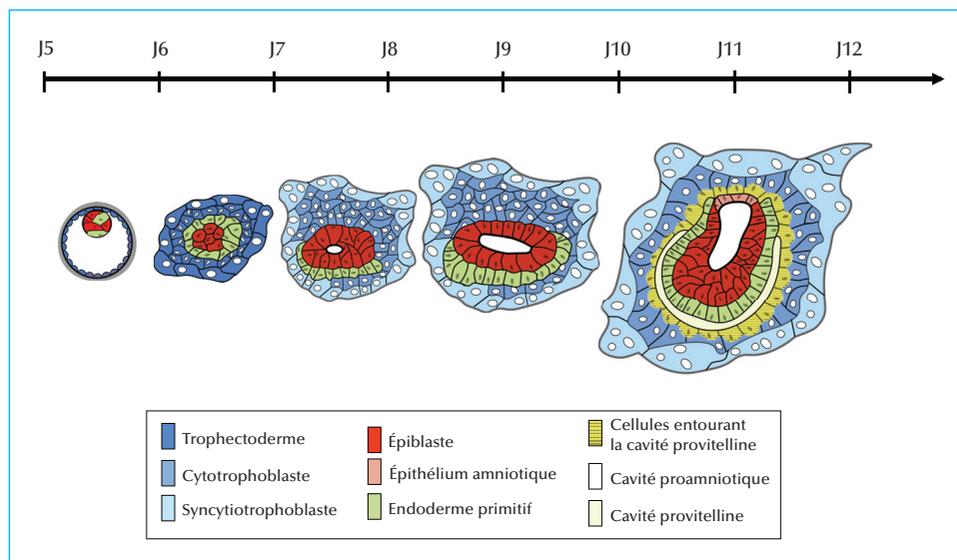
d'autres voies seraient impliquées dans la spécification de l'EP chez l'Homme. Il importe donc de connaître les acteurs moléculaires des voies de signalisation propres à chaque espèce, pour assurer un développement optimal des embryons *in vitro*.

### La morphogénèse

Dans cette période postimplantatoire, les cellules de la lignée épiblastique effectuent le premier événement de différenciation morphogénétique qui aboutit à l'établissement de l'axe antéro-postérieur et à l'initiation de la formation de la ligne primitive. L'analyse morphologique de coupes histologiques d'embryons obtenus dans la période immédiate suivant l'implantation et issus de fausses couches, révèle que la séquence des événements de la morphogénèse diffère entre les espèces, notamment entre l'homme et la souris (O'Rahilly and Muller 1987) (figure 1) ce qui semble confirmé par les modèles de culture d'embryons humains *in vitro* en l'absence de tissu maternel [6, 16] (figure 2).

Chez l'homme, le singe et la souris, l'épiblaste est remodelé par une cavitation et une polarisation qui forme initialement une structure en cocarde (Bedzhov 2014, Shahbazi 2016, Boroviak 2017), et qui aboutit à la formation d'une barrière épithéliale délimitant une lumière centrale (figures 1 et 2). Une donnée majeure est que cet événement morphologique résulte de la polarisation de cellules de l'EPI et non de phénomènes apoptotiques, comme cela fut un temps évoqué. Chez l'Homme, la cavité amniotique (ou amnios) se forme, à partir de J8, avec l'apparition au sein de l'EPI de cellules polarisées, caractérisées par une localisation apicale de l'actine et de la protéine kinase C atypique (aPKC), qui s'organisent progressivement sous la forme d'un épithélium. Cette observation est également faite dans différentes espèces simiennes, suggérant que ce processus biologique serait conservé chez les primates (Boroviak *et al*, 2017). Chez la souris, au sein de l'EPI se forme la cavité proamniotique qui s'ouvre sur une cavité congruente : la future cavité chorionique, dans l'ectoderme extraembryonnaire (ExE) (dérivé du TE polaire), pour ne former qu'une cavité amniotique délimitée par l'EPI et l'ExE. L'épithélium « amniotique », tel qu'il existe chez les primates, n'est pas présent chez l'embryon de souris. Les précurseurs de l'amnios restent localisés dans l'EPI, et l'amnios ne se forme, comme cavité amniotique individualisée, qu'au moment de la gastrulation. L'EPI de la souris est ainsi directement apposé à l'ExE jusqu'à ce qu'il en soit séparé par le mésoderme extraembryonnaire qui émerge de la ligne primitive (figure 1).

Certaines interactions directes entre l'ExE et l'EPI sont essentielles pour la signalisation intracellulaire qui est impliquée dans la formation de la ligne primitive, la mise en place de l'axe antéro-postérieur, et l'induction de



**Figure 2.** Développement de l'embryon humain péri-implantatoire *in vitro*. Les principaux événements qui ont lieu en période préimplantatoire sont : la ségrégation postimplantatoire de l'épiblaste et de l'endoderme primitif (vers J7) ; la polarisation des cellules épiblastiques avec la formation d'une cavité proamniotique (J8-J10) ; la différenciation du trophoctoderme en cytotrophoblaste et syncytiotrophoblaste (J8-J10) ; la formation d'un épithélium amniotique, de l'embryon didermique et de la cavité provitelline (J10-J11). D'après les articles du développement de l'embryon humain en l'absence de tissu maternel [6, 16]. J = jour embryonnaire.

cellules souches [38, 39]. Ainsi, *in vivo*, le dialogue moléculaire entre les voies de signalisation du FGF4, exprimé par l'ExE, et de NANOG, exprimé par l'EPI, permet le développement de l'embryon cylindrique caractéristique de la souris [13]. Chez l'embryon humain, l'épithélium amniotique, reconnaissable par l'aspect prismatique des cellules en regard de la cavité amniotique dès J10 [6], crée une barrière physique pour des interactions potentiellement directes entre les dérivés du TE et la partie embryonnaire de l'EPI. Cependant, cet épithélium amniotique (qui dérive de l'EPI), est initialement en contact avec le TE, et est contigu avec l'EPI.

La formation de l'EP et de l'EPI épithélial aboutit à la formation d'un embryon laminaire didermique : cylindrique dans le cas de la souris, discoïde chez l'Homme (*figure 1*). Les différences dans la configuration physique des embryons pourraient être liées aux relations spatiales entre les tissus embryonnaires et extraembryonnaires. L'initiation de la gastrulation, à la fin de la deuxième semaine de développement chez l'Homme, aboutit à la formation de la ligne primitive, structure cellulaire dérivée de l'EPI, qui contribuera à l'ensemble des trois feuillets embryonnaires à partir desquels dérivent toutes les structures de l'embryon à proprement parler. Chez la souris, la rupture de la symétrie de l'embryon cylindrique a lieu au niveau de la jonction entre les tissus embryonnaires et extraembryonnaires sous l'influence des facteurs Nodal, Wnt et Bmp, et aboutit à l'établissement d'un axe antéro-postérieur avec, *in fine*, la formation de la ligne primitive et du mésoderme. Chez l'Homme, les mécanismes impliqués dans l'induction d'un axe antéro-posté-

rieur et de la ligne primitive sont encore mal connus. Toutefois, des travaux réalisés à partir de cellules souches embryonnaires humaines ont montré que des cellules embryonnaires organisées en couches concentriques répondaient à la protéine morphogénétique osseuse 4 (BMP4) par une différenciation et une auto-organisation : l'ectoderme au centre, du tissu extraembryonnaire en périphérie et du mésoderme et de l'endoderme entre les deux [40]. Plus récemment, et selon le même modèle, la même équipe a rapporté l'implication des voies de signalisation Wnt et Activin dans la mise en place et l'établissement de l'axe antéro-postérieur dans l'embryon humain [41].

D'autres structures sont présentes dans l'embryon humain au stade de la prégastrula : la cavité vitelline et le mésenchyme extraembryonnaire. La cavité vitelline constitue une seconde cavité embryonnaire qui semble formée dans l'EP en expansion à J10-J11, chez l'Homme [6, 16]. Cependant, l'origine des cellules constituant la paroi de la cavité vitelline n'est pas très claire. Il s'agit là d'un aspect singulier du développement de l'embryon humain par rapport à la souris : ce cluster de cellules apparaît à J10 et la fonction de ces cellules reste indéterminée. À l'image de ce qui a été montré chez le singe rhésus, ces cellules pourraient exprimer des marqueurs conservés de l'EP, présupposant une origine hypoblastique [6, 20]. Cependant, les modèles d'embryons humains implantés *in vitro* montrent que ces cellules auraient des similarités avec le TE caractérisées par un marquage essentiellement CDX2 et plus faible pour GATA6 et OCT4 [16]. Le mésenchyme extraem-

bryonnaire est un mésenchyme lâche, comblant l'espace entre la couche de trophoblaste et l'embryon à proprement parler chez l'Homme. Chez les primates, il se forme à partir de l'implantation, alors que chez la souris, sa formation a lieu plus tardivement, pendant la gastrulation [35] (figure 1).

### Résumé de la morphogénèse de l'embryon humain entre J7 et J11 à partir des modèles de développement *in vitro* (figure 2)

#### J7-J8 : développement des lignées embryonnaires et extraembryonnaires

Après attachement à la boîte de culture, le blastocyste s'étale, ce qui rend la cavité du blastocèle virtuelle, et une claire séparation se dessine et se maintient entre les cellules exprimant *OCT4* (*OCT4*<sup>+</sup>, épiblaste) et *GATA6* (*GATA6*<sup>+</sup>, hypoblaste), de morphologie similaire, qui formeront le disque didermique. De la même manière, les cellules du trophoctoderme (*CK7*<sup>+</sup>) sont à l'origine de deux lignées distinctes :

- des cellules mononucléées et polarisées donnant le cytotrophoblaste,
- en périphérie des cellules multinucléées et lacunaires, futur syncytiotrophoblaste.

#### J8-J9 : formation de la cavité amniotique

L'épiblaste se polarise et la cavité amniotique se forme, au centre, par un mécanisme qui ne semble pas être celui de l'apoptose, comme il avait été décrit précédemment chez le primate.

#### J10-J11 : identification du disque embryonnaire didermique

Au sein des cellules épiblastiques (*OCT4*<sup>+</sup>), il est possible de détecter deux groupes morphologiquement différents :

- un groupe à proximité de l'hypoblaste, avec un épithélium cylindrique (épiblaste à proprement parler),
- un groupe de cellules aplaties (épithélium amniotique) en regard de la cavité amniotique.

#### J11 : formation de la vésicule vitelline primaire

Une seconde cavité, appelée vésicule vitelline, se forme sous l'épiblaste, entourée de cellules *GATA6*<sup>+</sup> (d'origine hypoblastique).

## Intérêts et limites des modèles de culture *in vitro* très prolongée

Les publications récentes de l'équipe de Zernicka-Goetz ont mis en lumière la possibilité de disposer de modèles de culture embryonnaire qui permettent de mieux connaître l'embryogenèse dans l'espèce humaine, tant

pour ce qui est du développement morphocinétique de l'embryon que de l'ensemble des voies de signalisation impliquées dans le développement des tissus embryonnaires et extraembryonnaires et des programmations génique et épigénétique en cause. Il s'agit également d'une voie prometteuse dans le domaine de la médecine régénérative, avec la possibilité de développer des cellules pluripotentes humaines directement à partir des trois couches tissulaires devenues accessibles vers un type cellulaire spécialisé. Ces modèles pourraient également permettre de comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-jacents impliqués dans les fausses couches précoces.

Si l'intérêt scientifique et la possible application dans le cadre du soin sont évidents, il n'en demeure pas moins que ce type d'avancées scientifiques chez l'humain soulève de nombreuses questions. Celles-là sont tout d'abord d'ordre technique, puisque les méthodes de culture actuellement utilisées ne permettent pas un véritable développement tridimensionnel de l'embryon humain. L'individualisation et l'identification précise des structures sont délicates, sans possibilité de comparaison par rapport à la réalité *in vivo* pour des raisons éthiques évidentes – et il n'est pas à exclure que cela soit lié aux conditions expérimentales. À titre d'exemple, des contradictions demeurent quant à la persistance (coupes embryonnaires fixées de Carnegie) [4] ou la disparition (modèle d'implantation *in vitro* en l'absence de tissu maternel) [6, 16] de la cavité du blastocèle au cours de l'implantation (figures 1 et 2). D'autres questions se posent quant à la nature des lignées cellulaires, notamment celles entourant la cavité vitelline. L'étude des profils d'expression des structures cellulaires observées permettrait d'affiner leur caractérisation.

C'est, en second lieu, un questionnement éthique qui est soulevé, la culture d'embryon humain au-delà de sept jours n'ayant jamais été décrite jusqu'à présent. La question de la recherche sur l'embryon humain est ainsi revivifiée, une limite étant encore une fois encore dépassée, plaçant le chercheur devant un embryon encore plus organisé qu'auparavant. Elle met en évidence l'opposition entre les domaines du possible et du souhaitable. En France, le Comité consultatif national d'éthique s'était prononcé sur un délai maximal de culture de sept jours. À l'étranger, la règle des quatorze jours est un consensus international généralement appliqué [42]. La législation américaine avait, dès 1979, établi cette limite de quatorze jours, date de début de gastrulation chez l'embryon humain. Cela correspond au dernier stade du développement pour lequel la survenue de jumeaux peut être observée (notion d'individualisation) et à l'absence de cellule de la lignée du système nerveux, autrement dit avant l'apparition de la ligne primitive et un début de sensibilité. Toutefois, à ce jour, douze pays, dont le Royaume-Uni, vont au-delà de cette limite. Certains experts, comme la biologiste Magdalena Zernicka-Goetz,

de l'université de Cambridge, doutent cependant que les embryons puissent évoluer après J14, compte tenu des besoins encore méconnus en nutriments et en hormones d'origine maternelle nécessaires à leur survie.

## Conclusion

La capacité à cultiver des blastocystes de souris, de singe et d'Homme au-delà de la période péri-implantatoire génère de nouvelles opportunités pour suivre l'embryogenèse et la différenciation de lignées au cours de cette phase inaccessible du développement intra-utérin des mammifères. Même si les modèles *in vitro* sont un récapitulatif imparfait du timing et des processus de la morphogenèse *in vivo*, ces résultats offrent pour la première fois un aperçu de l'organisation tissulaire et de l'émergence des types cellulaires embryonnaires et extraembryonnaires, jusqu'à la gastrulation. En particulier, ces données ont souligné la similarité de l'organisation de l'EPI et de l'hypoblaste des modèles d'embryons humains *in vitro* avec les descriptions anatomiques documentées des sections d'embryons humains [4] et avec les modèles primates non humains [35]. L'expression de l'analyse de marqueurs cellulaires (sélectionnés d'après les données de la souris) a établi la présence de lignées cellulaires distinctes : EPI, PE et TE, mais aussi de types cellulaires très spécifiques d'espèces [6, 16]. Dans ce contexte, la culture d'embryon *in vitro* offre une possibilité d'élucider directement la spécification des types cellulaires embryonnaires chez l'Homme, et amène à reconsidérer les limites techniques de la culture *in vitro* des embryons en périgastrulation – avec les remises en cause éthiques que cela induit. Un modèle d'expérimentation alternatif est la culture de cellules souches embryonnaires humaines [40, 41], qui peut permettre de reproduire des organisations cellulaires proches de celle de la ligne primitive. L'étude de ces structures gastruloïdes pourrait ouvrir de nouvelles voies vers la compréhension du développement de l'embryon humain au-delà de la deuxième semaine d'implantation, ainsi que vers la compréhension de la différenciation des cellules souches au sein des différents feuillet embryonnaires. *In fine*, les champs de la biologie de la reproduction et de la médecine régénérative pourraient en être remaniés.

**Liens d'intérêt :** Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

## Références

- Petropoulos S, Edsgård D, Reinius B, *et al.* Single-cell RNA-Seq reveals lineage and X chromosome dynamics in human preimplantation embryos. *Cell* 2016 ; 167 : 285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.009>.
- Blakeley P, Fogarty NME, del Valle I, *et al.* Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq. *Dev Camb Engl* 2015 ; 142 : 3151-65. <https://doi.org/10.1242/dev.123547>.
- Niakan KK, Eggan K. Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Dev Biol* 2013 ; 375 : 54-64. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.12.008>.
- O'Rahilly R. Human embryo. *Nature* 1987 ; 329 : 385. <https://doi.org/10.1038/329385e0>.
- Teklenburg G, Weimar CHE, Fauser BCJM, *et al.* Cell lineage specific distribution of H3K27 trimethylation accumulation in an *in vitro* model for human implantation. *PLoS One* 2012 ; 7 : e32701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032701>.
- Shahbazi MN, Jedrusik A, Vuoristo S, *et al.* Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nat Cell Biol* 2016 ; 18 : 700-8. <https://doi.org/10.1038/ncb3347>.
- Wu TC, Wan YJ, Damjanov I. Positioning of inner cell mass determines the development of mouse blastocysts *in vitro*. *J Embryol Exp Morphol* 1981 ; 65 : 105-17.
- Carson DD, Tang JP, Gay S. Collagens support embryo attachment and outgrowth *in vitro*: effects of the Arg-Gly-Asp sequence. *Dev Biol* 1988 ; 127 : 368-75.
- Hsu YC. Differentiation *in vitro* of mouse embryos to the stage of early somite. *Dev Biol* 1973 ; 33 : 403-11.
- Salomon DS, Sherman MI. Implantation and invasiveness of mouse blastocysts on uterine monolayers. *Exp Cell Res* 1975 ; 90 : 261-8.
- Kauma SW, Matt DW. Coculture cells that express leukemia inhibitory factor (LIF) enhance mouse blastocyst development *in vitro*. *J Assist Reprod Genet* 1995 ; 12 : 153-6.
- Morris SA, Grewal S, Barrios F, *et al.* Dynamics of anterior-posterior axis formation in the developing mouse embryo. *Nat Commun* 2012 ; 3 : 673. <https://doi.org/10.1038/ncomms1671>.
- Bedzhov I, Zernicka-Goetz M. Self-organizing properties of mouse pluripotent cells initiate morphogenesis upon implantation. *Cell* 2014 ; 156 : 1032-44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.023>.
- Hertig AT, Rock J, Adams EC. A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *Am J Anat* 1956 ; 98 : 435-93.
- Weimar CHE, Post Uiterweer ED, Teklenburg G, Heijnen CJ, Macklon NS. *In-vitro* model systems for the study of human embryo-endometrium interactions. *Reprod Biomed Online* 2013 ; 27 : 461-76. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.08.002>.
- Deglincerti A, Croft GF, Pietila LN, Zernicka-Goetz M, Siggia ED, Brivanlou AH. Self-organization of the *in vitro* attached human embryo. *Nature* 2016 ; 533 : 251-4. <https://doi.org/10.1038/nature17948>.
- Kreeger PK, Fernandes NN, Woodruff TK, Shea LD. Regulation of mouse follicle development by follicle-stimulating hormone in a three-dimensional *in vitro* culture system is dependent on follicle stage and dose. *Biol Reprod* 2005 ; 73 : 942-50. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.042390>.
- Desai N, Abdelhafez F, Calabro A, Falcone T. Three dimensional culture of fresh and vitrified mouse pre-antral follicles in a hyaluronan-based hydrogel: a preliminary investigation of a novel biomaterial for *in vitro* follicle maturation. *Reprod Biol Endocrinol* 2012 ; 10 : 29. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-29>.

- 
19. Wimsatt WA. Some comparative aspects of implantation. *Biol Reprod* 1975 ; 12 : 1-40.
20. Enders AC, Schlafke S, Hendrickx AG. Differentiation of the embryonic disc, amnion and yolk sac in the rhesus monkey. *Am J Anat* 1986 ; 177 : 161-85. <https://doi.org/10.1002/aja.1001770205>.
21. Corson LB, Yamanaka Y, Lai K-MV, Rossant J. Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Dev Camb Engl* 2003 ; 130 : 4527-37. <https://doi.org/10.1242/dev.006669>.
22. Gardner RL, Papaioannou VE, Barton SC. Origin of the ectoplacental cone and secondary giant cells in mouse blastocysts reconstituted from isolated trophoblast and inner cell mass. *J Embryol Exp Morphol* 1973 ; 30 : 561-72.
23. Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 1998 ; 282 : 2072-5.
24. Kunath T, Yamanaka Y, Detmar J, et al. Developmental differences in the expression of FGF receptors between human and mouse embryos. *Placenta* 2014 ; 35 : 1079-88. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.09.008>.
25. Licht P, Russu V, Lehmeier S, Wildt L. Molecular aspects of direct LH/hCG effects on human endometrium—lessons from intrauterine microdialysis in the human female *in vivo*. *Reprod Biol* 2001 ; 1 : 10-9.
26. Tsampalás M, Grídelet V, Berndt S, Foidart J-M, Geenen V, Perrier d'Hauterive S. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J Reprod Immunol* 2010 ; 85 : 93-8. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.11.008>.
27. Dokras A, Sargent IL, Ross C, Gardner RL, Barlow DH. The human blastocyst: morphology and human chorionic gonadotrophin secretion *in vitro*. *Hum Reprod Oxf Engl* 1991 ; 6 : 1143-51.
28. Lopata A. Implantation of the human embryo. *Hum Reprod* 1996 ; 11(Suppl 1):175-84.
29. Kirkegaard K, Villesen P, Jensen JM, et al. Distinct differences in global gene expression profiles in non-implanted blastocysts and blastocysts resulting in live birth. *Gene* 2015 ; 571 : 212-20. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.06.057>.
30. Rossant J, Tam PPL. New insights into early human development: lessons for stem cell derivation and differentiation. *Cell Stem Cell* 2017 ; 20 : 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.12.004>.
31. Dietrich J-E, Hiiragi T. Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Dev Camb Engl* 2007 ; 134 : 4219-31. <https://doi.org/10.1242/dev.003798>.
32. Harvey AJ, Armant DR, Bavister BD, Nichols SM, Brenner CA. Inner cell mass localization of NANOG precedes OCT3/4 in rhesus monkey blastocysts. *Stem Cells Dev* 2009 ; 18 : 1451-8. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0122>.
33. Pant D, Keefer CL. Expression of pluripotency-related genes during bovine inner cell mass explant culture. *Cloning Stem Cells* 2009 ; 11 : 355-65. <https://doi.org/10.1089/clo.2008.0078>.
34. Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RAR. Human pre-implantation embryo development. *Dev Camb Engl* 2012 ; 139 : 829-41. <https://doi.org/10.1242/dev.060426>.
35. Boroviak T, Nichols J. Primate embryogenesis predicts the hallmarks of human naïve pluripotency. *Dev Camb Engl* 2017 ; 144 : 175-86. <https://doi.org/10.1242/dev.145177>.
36. Kuijk EW, van Tol LTA, Van de Velde H, et al. The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Dev Camb Engl* 2012 ; 139 : 871-82. <https://doi.org/10.1242/dev.071688>.
37. Roode M, Blair K, Snell P, et al. Human hypoblast formation is not dependent on FGF signalling. *Dev Biol* 2012 ; 361 : 358-63. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.10.030>.
38. Arnold SJ, Robertson EJ. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009 ; 10 : 91-103. <https://doi.org/10.1038/nrm2618>.
39. Tam PPL, Loebel DAF. Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nat Rev Genet* 2007 ; 8 : 368-81. <https://doi.org/10.1038/nrg2084>.
40. Warmflash A, Sorre B, Etoc F, Siggia ED, Brivanlou AH. A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells. *Nat Methods* 2014 ; 11 : 847-54. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3016>.
41. Martyn I, Kanno TY, Ruzo A, Siggia ED, Brivanlou AH. Self-organization of a human organizer by combined Wnt and Nodal signalling. *Nature* 2018 ; 558 : 132-5.
42. Chan S. How to rethink the fourteen-day rule. *Hast Cent Rep* 2017 ; 47(3):5-6. doi: 10.1002/hast.698.