

Embryologie cellulaire et moléculaire

M^{me} Nicole LE DOUARIN, membre de l'Institut
(Académie des Sciences), professeur

Le cours de cette année a porté sur « La crête neurale. Un modèle d'étude des mécanismes du développement chez les Vertébrés ». La crête neurale est une structure transitoire de l'embryon des Vertébrés. Elle se forme selon un gradient crânio-caudal lors de la fermeture du tube neural et résulte de la fusion des bords latéraux de l'ébauche neurale primitive (la plaque neurale). Elle constitue un modèle d'étude intéressant à plusieurs titres. Tout d'abord, dès qu'elle est formée, les cellules qui la constituent effectuent des migrations qui les amènent à se localiser dans des territoires précis de l'embryon où elles s'aggrègent et se différencient en une grande variété de types cellulaires. L'ontogenèse de la crête neurale permet donc l'étude des mécanismes de la diversification des cellules au cours de l'embryogenèse ainsi que de processus morphogénétiques tels que les migrations cellulaires.

Depuis sa découverte par His en 1868, la crête neurale a suscité un grand intérêt chez les Embryologistes. Les travaux des pionniers de l'Embryologie expérimentale, réalisés surtout sur l'embryon des Amphibiens, et très bien résumés dans la monographie de S. Hörstadius parue en 1950, ont été d'abord évoqués. On a ensuite analysé les recherches modernes portant sur les Vertébrés supérieurs, notamment l'embryon d'Oiseau. Celles-ci ont pu progresser grâce à l'utilisation de marqueurs cellulaires permettant de suivre les cellules au cours de leur migration et de connaître leur contribution histogénétique précise chez l'adulte. Une revue critique des différentes techniques de marquage cellulaire (colorants vitaux, marqueurs isotopiques...) a été présentée et le marqueur nucléaire fourni par les cellules de Caille (*Coturnix coturnix japonica*) ainsi que sa mise en œuvre ont été décrits en détail.

La réalisation des chimères neurales entre embryon de Caille et de Poulet a conduit à la découverte de dérivés de la crête neurale jusque là ignorés (cellules à calcitonine, corps carotidien) et à la démonstration du rôle prépondérant qu'elle joue dans la genèse des structures squelettiques et conjonctives (derme, tissu conjonctif des glandes dérivées de l'endoderme buccopharyn-

gien) de la face et du cou. Enfin cette méthode de marquage a permis de déterminer avec précision le niveau d'origine le long du névraxe des différents constituants du système nerveux périphérique (SNP). Ainsi une carte des territoires présomptifs de la crête neurale de l'embryon d'Oiseau a-t-elle été établie. Elle montre que la capacité de la crête neurale à fournir des dérivés mésenchymateux (méséctoderme) est limitée à la région céphalique jusqu'au niveau du 5e somite. D'autre part l'origine des ganglions du système nerveux périphérique sensoriel (ganglions spinaux) parasymphatique, sympathique et entérique a été déterminée précisément. Il en ressort que la crête neurale est divisée en régions distinctes à partir desquelles prennent leur origine un nombre limité de phénotypes neuronaux (définis par leur appartenance à l'une ou l'autre des subdivisions du SNP et par leur neurotransmetteur majeur, tel que l'acétylcholine ou une catecholamine). On peut ainsi reconnaître, dans la région vagale du névraxe, le territoire dont sont issus les neurones cholinergiques du système nerveux entérique (SNE) et dans la région troncale le territoire d'origine des cellules adrénérgiques des chaînes sympathiques et des glandes adrénomédullaires.

Des greffes hétérotopiques de territoires vagues dans la zone troncale, et vice-versa, ont été réalisées afin de déterminer le degré de plasticité de la différenciation neuronale dans le SNP. Celle-ci s'est révélée très grande. En effet, lorsqu'on change la position antéropostérieure des cellules de la crête neurale avant qu'elles n'aient commencé à migrer, on ne perturbe pratiquement pas l'ontogenèse du SNP. Les cellules normalement destinées à coloniser le tube digestif et à y fournir les plexus cholinergiques peuvent former les chaînes sympathiques et la glande surrénale si elles sont greffées dans la région troncale. L'inverse est également vrai. De plus, la différenciation des neurones qui en dérivent est conforme à la position qu'ils occupent à la suite de ces transplantations hétérotopiques et non à leur destinée dans le développement normal.

Il apparaît ainsi que l'environnement dans lequel les cellules de la crête neurale migrent exerce une influence décisive sur leur évolution ultérieure.

Les expériences de transplantation de l'ébauche neurale primitive entre embryons de Caille et de Poulet et la capacité de suivre le devenir des cellules greffées pendant toute la durée de l'ontogenèse, ont permis de déterminer la limite antérieure de la crête neurale et la contribution du bourrelet neural antérieur à la genèse des structures céphaliques.

L'origine complexe des neurones et de la glie des ganglions sensoriels des nerfs crâniens V, VII, IX et X à partir des placodes céphaliques et de la crête neurale a été établie précisément par plusieurs groupes d'investigateurs, ce qui a mis fin à une ancienne controverse.

Des expériences réalisées aux stades précoces de la neurulation ont permis de situer la limite antérieure de la crête neurale au niveau du diencéphale et

plus précisément en arrière du territoire de l'épiphysse. Le bourrelet neural antérieur fournit la poche de Rathke et l'adénohypophyse (en position rostrale) latéralement par rapport à celle-ci, l'épithélium de la placode olfactive et des cavités du nasopharynx. Plus latéralement encore (c'est-à-dire en avant du territoire épiphysaire), le bourrelet neural fournit l'épithélium superficiel du bec (de la lèvre supérieure et du nez chez les Mammifères) et de la zone mésofrontale.

Le fait que le bord antérieur de la plaque neurale primitive fournisse des territoires épidermiques étroitement intriqués avec des structures nerveuses et avec du mésectoderme est une donnée nouvelle. Les influences locales conduisant à diversification cellulaire de ces territoires au cours de l'embryogenèse de la tête devraient constituer un sujet d'études du plus grand intérêt.

La démonstration que l'évolution des cellules de la crête neurale est sous la dépendance d'une information positionnelle conduit à s'interroger sur la nature des facteurs qui influencent la différenciation des cellules de la crête neurale au site de leur migration.

On a pu montrer que le développement des ganglions spinaux est sous la dépendance de facteurs émanant du tube neural. Le « Brain derived neurotrophic factor » (BDNF) isolé par Barde *et al.*¹ intervient pour une large part dans ce processus et agit en conjonction avec une molécule de la matrice extracellulaire, la laminine. D'autre part, l'insuline et l'insuline-like growth factor I (IGF1) sont capables, au moins en culture *in vitro*, d'assurer la survie et de stimuler la phase précoce de la différenciation des sympathoblastes.

Un des problèmes fondamentaux posés par la diversification des cellules embryonnaires concerne les mécanismes qui président à l'engagement initial des cellules dans une voie donnée de différenciation, c'est-à-dire à leur « détermination ».

Pendant longtemps la crête neurale était vue comme un ensemble de cellules pluripotentes ne commençant à se différencier que lorsqu'elles ont atteint le site ultime de leur migration où elles s'agglomèrent pour former un ganglion du SNP ou toute autre structure (e.g. os, cartilage, glande endocrine, mélanocyte, gaine cellulaire des nerfs périphériques, méninges). En fait, une étude plus approfondie de l'ontogenèse de ces cellules a fait apparaître une toute autre réalité. Par clonage cellulaire, on a pu analyser en culture *in vitro*, les capacités de différenciation de cellules isolées prélevées dans la crête neurale au cours de leur migration. Il est apparu que ces cellules sont d'une grande hétérogénéité au double point de vue de leur capacité de prolifération et de différenciation. Certaines sont pluripotentes et fournissent des clones contenant de nombreux types cellulaires. D'autres le sont moins, d'autres enfin sont déjà déterminées à se différencier en un seul type cellulaire. Il

1. Y.A. Barde, D. Edgar and H. Thoenen (1982), *EMBO J.*, 1, 549-553.

apparaît donc qu'au cours de la migration les cellules qui se divisent rapidement deviennent progressivement de plus en plus restreintes dans leur potentialité de différenciation. Ces résultats, obtenus *in vitro*, ont été corroborés par des expériences réalisées *in vivo*, par marquage de cellules individuelles par injection iontophorétique d'un colorant vital.

En conclusion, les voies de recherches qu'il convient d'envisager pour aborder l'étude des mécanismes présidant à la mise en place et à la différenciation des dérivés de la crête neurale au niveau moléculaire ont été discutées.

N. L.D.

SÉMINAIRES

Embryologie cellulaire et moléculaire

Le cours a été complété par une série de séminaires sur la crête neurale, son rôle dans l'histogenèse des Vertébrés et sur les facteurs intervenant dans son évolution ontogénétique.

Séminaires d'Embryologie cellulaire et moléculaire, sous la direction de M^{me} Nicole LE DOUARIN, Professeur.

P^r Gérard COULY, Hôpital Necker Enfants Malades : « Neurocristopathies malformatives de la face et du cerveau chez l'homme ».

D^r Jean-Paul THIERY, Ecole Normale Supérieure : « Statut adhésif des cellules embryonnaires et tumorales ».

P^r Jean-Claude BOUCAUT, Université Paris VI : « Rôle des constituants de la matrice extracellulaire dans la gastrulation des amphibiens ».

D^r Jacques MALLET, CNRS, Gif-sur-Yvette : « La biologie moléculaire des catécholamines ».

D^r Christo GORIDIS, Centre d'Immunologie INSERM-CNRS de Marseille : « Les molécules adhésives du système nerveux appartenant à la superfamille des immunoglobulines ».

D^r Chaya KALCHEIM, Hebrew University, Hadassah Medical School : « The role of cellular and molecular mechanisms in early development of sensory ganglia ».

P^r Clayton BUCK, Wistar Institute of Anatomy and Biology of Philadelphia : « Integrins and endoCAM's : molecules controlling adhesive events during development ».

P^r Gérard COULY, Hôpital Necker Enfants Malades : « Tumeurs et dysplasies tumorales de la crête neurale chez l'homme ».

D^r Yves-Alain BARDE, Max Planck Institut für Psychiatrie : « Rôle et caractérisation d'un nouveau facteur neurotrophique ».

NEUROEMBRYOLOGIE

INTRODUCTION

L'activité du groupe de Neuroembryologie s'est caractérisée par : i) l'utilisation des méthodes de la Biologie moléculaire pour l'étude de la différenciation du système nerveux central et périphérique ; ii) l'élargissement de notre programme d'étude du développement du système nerveux central basé sur l'utilisation du système des chimères construites *in ovo* entre poulet et caille ou entre poulets porteurs de caractères génétiques différents.

Nous avons poursuivi nos recherches sur la ségrégation des lignées cellulaires à partir de la crête neurale en utilisant une nouvelle technique de culture permettant l'étude de la différenciation *in vitro* de cellules de crête neurale isolées. Ceci nous a permis d'apporter des informations sur les potentialités de différenciation de ces cellules aux stades de la migration. Nous avons pu montrer en particulier que les cellules de la crête neurale mésencéphalique sont à cet égard d'une grande hétérogénéité, certaines étant déjà déterminées à se différencier en un seul type cellulaire alors que d'autres conservent des potentialités de diversification et de prolifération remarquablement étendues.

A la lumière de ces résultats, nous proposons un modèle pour expliquer la différenciation des différents types ganglionnaires du système nerveux périphérique dans lesquels nous faisons intervenir au site de la gangliogenèse des facteurs de croissance agissant spécifiquement sur certaines catégories cellulaires. Nous avons pu mettre en évidence qu'un facteur ayant pour origine le tube neural est nécessaire à la survie et à la différenciation des précurseurs des neurones sensoriels et nous montrons que le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) joue un rôle décisif dans ce processus.

Nos travaux tendent actuellement à rechercher d'autres facteurs, notamment ceux qui pourraient être responsables de la différenciation des neuroblastes sympathiques parmi lesquels l'insuline et les « insulin-like growth factors » (IGF) pourraient jouer un rôle particulier.

La recherche systématique de sondes moléculaires a été entreprise afin d'augmenter notre capacité de reconnaître, dès un stade précoce du développement, la ségrégation des lignées cellulaires qui se différencient à partir de l'épithélium neural. C'est ainsi que le gène d'une protéine de la myéline périphérique (Po) de poulet a été récemment cloné et que le gène de la choline acétyltransférase de poulet est en cours d'étude. Une protéine de la myéline, des cellules de Schwann (SMP) et des oligodendrocytes a été récemment identifiée, purifiée et partiellement séquencée. Le clonage du gène correspondant est en cours.

D'autre part, nous avons poursuivi l'étude de la cartographie du territoire du primordium neural à deux stades précis du développement : tout d'abord au stade de la neurula précoce, avant la fermeture du tube neural, puis au stade des vésicules encéphaliques. Ceci nous permet d'étudier d'une manière dynamique les migrations cellulaires se produisant à l'intérieur même de l'épithélium neural, et responsables de la mise en place des centres nerveux et des connexions qui s'établissent entre eux. Cette approche nous amène aussi à étudier les mouvements morphogénétiques qui assurent la régulation définitive de la forme et de la disposition des structures encéphaliques. Il s'agit d'un travail de longue haleine auquel plusieurs chercheurs se consacrent. Il nous a amenés à poser le problème du transfert éventuel de traits comportementaux de l'espèce caille à l'espèce poulet (et vice-versa), lors des greffes de territoire neural embryonnaire. Des résultats intéressants ont été obtenus en prenant comme modèle le chant induit chez le poussin par des implants de testostérone. Dans le même ordre d'idées, nous avons initié une étude en collaboration avec le D^r R. Naquet, spécialiste de l'épilepsie. Il existe en effet une souche de poulets porteuse d'une épilepsie congénitale dont la transmission génétique autosomique mendélienne a été mise en évidence et qui s'exprime à l'état homozygote. Ces poulets font des crises d'épilepsie lorsqu'ils sont stimulés par une lumière intermittente. Nous avons trouvé que le transfert de certaines régions du cerveau d'un poulet épileptique à un poulet sain est de nature à transférer l'anomalie d'origine cérébrale. Ceci constitue évidemment un préliminaire à des études plus approfondies qui permettront, nous l'espérons, de mieux comprendre quels sont les centres nerveux impliqués dans cette maladie chez le poulet et peut-être quelle est la nature de l'anomalie nerveuse responsable des désordres observés. Il est intéressant à cet égard de souligner qu'une épilepsie comparable à celle provoquée par la lumière intermittente existe congénitalement chez l'Homme.

Une nouvelle ligne de recherches que nous avons développée depuis deux ans consiste à isoler et à caractériser les gènes de caille contenant l'homéodomaine : deux projets ont été entrepris. L'un porte sur l'équivalent du gène *Hox-3-Antennapedia* de la souris et de la drosophile, l'autre sur le gène *Hox-7-msh* de la souris et de la drosophile. Le but de cette étude est de profiter des avantages offerts par l'embryon d'oiseau pour rechercher si l'expression de ces gènes est contrôlée par une information de type positionnel.

A. MARQUEURS DE DIFFÉRENCIATION DU SYSTÈME NERVEUX

DÉCOUVERTE D'UN NOUVEAU MARQUEUR DE DIFFÉRENCIATION PRÉCOCE DES CELLULES DE SCHWANN ET DES OLIGODENDROCYTES

L'antigène SMP : distribution cellulaire

C. DULAC, P. CAMERON-CURRY, C. ZILLER et N.M. LE DOUARIN

Dans le but d'identifier de nouvelles molécules constitutives de la membrane des cellules de Schwann et de la myéline périphérique, nous avons immunisé des souris avec des glycoprotéines de myéline purifiées à partir de nerfs de cailles adultes, et fabriqué des hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux. Grâce à cette stratégie, nous avons pu révéler puis caractériser plusieurs marqueurs glixiaux de spécificités différentes.

L'un de ces marqueurs nommé SMP (Schwann cell Myelin Protein) présente une distribution cellulaire précoce et très spécifique à la fois dans le système nerveux périphérique et le système nerveux central. Une étude immunocytochimique systématique effectuée sur des coupes congelées de tissus embryonnaires et adultes a montré la localisation de l'immunoréactivité anti-SMP dans les nerfs et les fibres nerveuses intraganglionnaires. Le système nerveux entérique ainsi que le perineurium, les corps cellulaires des neurones et les cellules satellites des ganglions périphériques ne sont jamais reconnus par l'anticorps anti-SMP.

Caractérisation moléculaire de l'antigène SMP

C. DULAC et N.M. LE DOUARIN, en collaboration avec D. MARSHAK (Cold Spring Harbor Laboratories, USA) et J. ROSSIER (Laboratoire de Physiologie Nerveuse du CNRS, Gif-sur-Yvette)

La masse moléculaire relative de SMP a été déterminée par la technique de Western blot. En conditions non réductrices, SMP apparaît dans le SNP comme un doublet de Mr 75-80 000 et dans le système nerveux central comme un singulet de Mr 80 000.

Nous avons mis au point une technique de purification de SMP par chromatographie d'affinité suivie d'une électroélution. Cette purification de SMP a permis d'en déterminer la séquence en acides aminés N-terminale puis, après coupure protéolytique et séparation des fragments par HPLC, de connaître 4 séquences internes à la protéine. Les deux formes moléculaires trouvées dans le système nerveux périphérique et l'unique forme caractérisée dans le système nerveux central possèdent la même extrémité N-terminale. Après consultation des banques de données, il s'avère que cette séquence ne présente aucune homologie avec une quelconque séquence protéique déjà connue. Ceci nous assure que nous avons bien isolé une nouvelle molécule. La connaissance de 5 portions de séquence en acides aminés nous permet de synthétiser plusieurs sondes oligonucléotides pour cribler une banque d'ADNc. Une partie importante du cDNA est actuellement clonée.

B. LA CRÊTE NEURALE ET LE SYSTÈME NERVEUX PÉRIPHÉRIQUE

1. ONTOGÈNE DE LA CRÊTE NEURALE

1.1. *Analyse clonale de la différenciation des cellules de la crête neurale in vitro*

E. DUPIN, A. BAROFFIO et N.M. LE DOUARIN

— *Mise en évidence de l'hétérogénéité des cellules de la crête neurale, quant à leur état de détermination*

La crête neurale donnant naissance à de nombreux types cellulaires (neurones et cellules gliales du système nerveux périphérique, mélanocytes, cellules du mésectoderme de la face, cellules endocrines et paraendocrines), le problème se pose de savoir comment et à quel stade de développement sont ségréguées ces différentes lignées cellulaires. Afin d'étudier les potentialités de développement et le degré de détermination des cellules qui composent la crête neurale mésencéphalique, la descendance de cellules individuelles obtenue *in vitro* a été analysée du point de vue phénotypique. Nous avons en effet mis au point des conditions de culture telles qu'une cellule unique puisse proliférer activement et se différencier. Ces conditions font intervenir des cellules nourricières 3T3 traitées par la mitomycine. Les types cellulaires obtenus dans ces clones sont identifiés en immunofluorescence indirecte au moyen d'anticorps reconnaissant des antigènes spécifiques des neurones (anti-protéines des neurofilaments, anti-substance P, anti-vasoactive intestinal polypeptide, VIP), des cellules adrénérgiques (anti-TH), ou spécifiques d'antigènes présents à la surface des cellules gliales (anticorps monoclonaux GIN1, HNK1). Le cartilage est mis en évidence par métachromasie après coloration au bleu de toluidine, et les mélanocytes par la présence de pigment.

La composition des clones permet *a posteriori* de caractériser la cellule de départ. Ainsi les cellules pluripotentes fournissent des clones où coexistent plusieurs types cellulaires ; les cellules déterminées, au contraire, fournissent des cellules filles identiques.

Dans un premier travail, nous avons analysé les clones obtenus après 7 et 10 jours de culture. Leur taille est extrêmement variée ainsi que les types cellulaires qui les composent. Les cellules de crête neurale isolées présentent donc une grande hétérogénéité quant à leur pouvoir prolifératif et leur capacité de différenciation. En particulier, nous démontrons l'existence dans la crête neurale en voie de migration :

- de nombreux précurseurs pluripotents donnant naissance aux mélanocytes, aux neurones et aux cellules gliales périphériques ;
- de précurseurs communs aux neurones et à la glie périphérique ;
- de progéniteurs neuronaux restreints à ce type cellulaire.

Dans les clones hétérogènes, les descendances présentent diverses combinaisons de types cellulaires suggérant qu'il s'agit d'une même famille de précurseurs présentant des filiations entre eux, et dont la capacité de différenciation subit des restrictions progressives au fur et à mesure de leurs divisions.

— *Mise en évidence de précurseurs déterminés vers la ou les lignée(s) gliale(s)*

L'obtention au laboratoire de l'anticorps monoclonal anti-SMP, présentant une spécificité stricte pour la lignée des cellules de Schwann, à l'exclusion des cellules satellites des ganglions, nous a permis d'étudier plus précisément la différenciation de la glie périphérique.

Des cellules SMP positives ont été détectées dans plus de 75 % des clones obtenus après 13 à 16 jours de culture. Ceci permet de caractériser dans la crête neurale mésencéphalique :

- un précurseur commun aux neurones et aux cellules de Schwann ;
- un précurseur bipotent des cellules de Schwann et des cellules satellites des neurones ganglionnaires ;
- un progéniteur restreint des cellules de Schwann, ayant un grand pouvoir de multiplication et pouvant se différencier en l'absence de toute autre cellule nerveuse.

— *La cellule souche multipotente putative de la crête neurale*

La mise en évidence de précurseurs pluripotents dans la crête neurale en migration posait le problème de savoir si un précurseur commun à toutes les lignées cellulaires qui en dérivent, y compris le méséctoderme, existe au stade de la migration. On s'attend à ce que de tels précurseurs multipotents soient rares, ce qui explique qu'ils n'aient pu être identifiés dans les expériences précédentes. Celles-ci ont cependant révélé dans moins de 5 % des clones la présence de cartilage, c'est-à-dire d'un dérivé méséctodermique de la crête neurale céphalique, et de cellules du système nerveux périphérique (cellules non neuronales SMP^- $HNK1^+$ et/ou des cellules de Schwann SMP^+). Ceci suggère qu'à ce stade de la migration, la lignée méséctodermique n'est pas complètement ségréguée de la lignée neurale. L'existence d'un clone rare (1/400) composé de tous les types cellulaires que nous pouvons identifier (neurones, cellules non neuronales, cartilage et mélanocytes) confirme cette hypothèse. Ceci constitue une démonstration directe de l'existence d'une cellule multipotente dans la crête neurale céphalique au stade de la migration. Nous n'avons pas pu déterminer si cette cellule est douée ou non de la capacité de se repliquer tout en gardant son caractère multipotent, donc si elle mérite le qualificatif de cellule souche.

C. INVESTIGATIONS SUR LE DÉVELOPPEMENT DU CERVEAU ET DE LA MOELLE ÉPINIÈRE PAR LA MÉTHODE DES CHIMÈRES CAILLE \Leftrightarrow POULET OU POULET \rightarrow POULET

1. CHIMÈRES CAILLE-POULET : DÉVELOPPEMENT DU CERVEAU ET COMPORTEMENT

E. BALABAN, M.A. TEILLET et N.M. LE DOUARIN

Divers types de chimères de l'encéphale ont été construites dans le but d'étudier les migrations cellulaires au cours du développement du cerveau.

Dans une première série expérimentale, la région dorsale du télencéphale et/ou du diencéphale a été greffée de la caille chez le poulet et inversement et des observations ont été réalisées à divers stades du développement jusqu'à 12 jours après l'éclosion. La reconnaissance des cellules de caille et de poulet par la coloration de Feulgen nous a permis de voir que les migrations cellulaires au sein du neuroépithélium ne s'effectuent pas d'une manière strictement radiale, particulièrement dans les régions du cerveau qui deviennent épaisses. La limite de greffe, toujours visible au niveau de l'épithélium ventriculaire, devient de plus en plus floue dans l'épaisseur du manteau où les cellules neuronales et gliales des deux espèces sont mélangées sur de grandes distances mettant en évidence des migrations tangentielles de grande amplitude s'ajoutant aux migrations radiales déjà connues.

Nous avons recherché si la substitution de régions du cerveau de poulet par leur équivalent provenant de la caille pouvait avoir pour conséquence le transfert de traits comportementaux spécifiques de la caille. Le comportement choisi a été le chant tel qu'on peut l'induire chez le poussin par des implants sous-cutanés de testostérone. Des différences quantifiables et évidentes de la structure du chant existent en effet entre ces deux espèces, notamment le chant du poulet est constitué d'une vocalisation unique alors que celui de la caille est segmenté en 3 parties : 2 notes introductives et une vocalisation plus longue séparée par des silences.

Les chimères écloses de cette série expérimentale, stimulées par la testostérone, ont montré que l'échange de la région dorsale du prosencéphale entre caille et poulet n'a aucune conséquence sur la structure du chant. Les chimères caille sur poule de ce type ont un chant non segmenté comme les poussins normaux, alors que les cailles de même âge stimulées par la testostérone ont un chant caractéristique segmenté en 3 parties.

Dans une deuxième série expérimentale, plusieurs régions entières de l'encéphale ont été échangées entre caille et poulet. Seules des chimères caille sur poule ont éclos.

Les chimères où le prosencéphale entier a été implanté ont toutes eu un chant de type poulet. Parmi les chimères où prosencéphale + mésencéphale ont été greffés, le chant segmenté typique de la caille a été obtenu dans

certains cas, tandis que d'autres ont eu des chants segmentés mais aberrants par rapport au pattern caractéristique de la caille. Les chimères du diencéphale + mésencéphale + rhombencéphale ont également émis des chants segmentés, caractéristiques de la caille, ou légèrement aberrants.

Cette étude démontre la transmissibilité d'un caractère génétique par greffe interspécifique d'épithélium neural au stade précédant la vascularisation de l'ébauche encéphalique.

2. TRANSFERT D'UNE ÉPILEPSIE GÉNÉTIQUE DÉCLENCHÉE PAR LA LUMIÈRE ENTRE POULETS DE SOUCHES DIFFÉRENTES

M.A. TEILLET, B. SCHULER, N.M. LE DOUARIN, en collaboration avec le D^r R. NAQUET (Laboratoire de Physiologie Nerveuse du CNRS, Gif-sur-Yvette)

L'épilepsie induite par la lumière intermittente existe chez l'homme et a été aussi décrite chez certaines espèces telles que le singe et le poulet (réf. Crawford R.D., *J. of Heredity*, 61, 185-188, 1970). Dans ce dernier cas, il s'agit d'une maladie génétique qui s'exprime à l'état homozygote. Les circuits neuronaux impliqués dans les anomalies observées sont mal connus.

Nous avons entrepris une série d'études en collaboration avec le D^r R. Naquet en vue de trouver quelles sont les zones cérébrales impliquées d'une manière décisive dans l'apparition de ce type d'épilepsie chez les mutants. Pour cela nous avons procédé au remplacement du prosencéphale, mésencéphale et métencéphale de poulets normaux par leur équivalent provenant d'un embryon épileptique homozygote. Nous avons obtenu à ce jour six chimères en bonne santé mais chez lesquelles il est possible d'induire des crises d'épilepsie par la lumière intermittente, dont le déroulement est en tout point comparable à celui de la souche porteuse de la mutation. Nous considérons ce résultat comme très encourageant pour l'étude plus précise des zones du cerveau responsables de l'anomalie observée.

3. APPORTS DES CHIMÈRES CAILLE-POULET À L'ÉTUDE DE L'ONTOGÈNESE DU CERVELET

M. HALLONET, M.A. TEILLET et N.M. LE DOUARIN

Le remplacement de régions précises de l'ébauche neurale céphalique, entre embryons de caille et de poulet, permet d'établir la cartographie des territoires présomptifs de l'encéphale, tout en mettant en évidence les mouvements cellulaires s'effectuant pendant l'ontogénèse. Nous avons appliqué cette technique à l'étude du développement du cervelet.

Trois types de greffes orthotopiques ont été réalisées de la caille sur le poulet, et inversement, au stade de 12 paires de somites : remplacement (a) de la vésicule métencéphalique entière, (b) d'une moitié latérale de cette vésicule, (c) des vésicules mésencéphalique et diencéphalique. Les résultats suivants ont été obtenus : (1) Le territoire présomptif de la couche granulaire externe est localisé en totalité dans la vésicule métencéphalique. La mise en

place de cette couche cellulaire transitoire périphérique par migration tangentielle à la surface de l'ébauche cérébelleuse, de même que la migration radiale centripète des cellules issues de cette couche vers la couche granulaire interne, ont pu être visualisées par le marquage cellulaire caille-poule. La vésicule métencéphalique est également à l'origine de la majorité des cellules composant les autres couches du cervelet. (2) Des cellules issues de la vésicule mésencéphalique se localisent dans le cervelet antérieur médian dans toutes les couches cellulaires, à l'exception de la couche granulaire externe. A ce niveau, l'épithélium ventriculaire présente le même marquage cellulaire que certains neurones des noyaux profonds et que les cellules de Purkinje. Ces cellules atteignent donc leur position définitive par des migrations à dominante radiale. (3) Des mouvements morphogénétiques relatifs, au niveau des vésicules myélocéphalique, métencéphalique et mésencéphalique, aboutissent à une dislocation longitudinale des territoires dorsaux, vers l'arrière, et ventraux, vers l'avant. (4) Des échanges cellulaires se produisent de part et d'autre du plan sagittal dans les couches granulaires interne et externe. En conclusion, la mise en place des cellules du cervelet n'est pas exclusivement le fait de migrations radiales. (5) Les foliations propres de la caille et du poulet sont conservées, même dans le cas de greffes unilatérales.

4. IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DE GÈNES CONTENANT UN HOMÉODOMAINE CHEZ LE POULET ET LA CAILLE

Après la découverte par W. Gehring et ses collaborateurs de gènes contenant une région fortement conservée appelée « homeobox » chez la drosophile, plusieurs dizaines de gènes possédant un homéodomaine ont été identifiés chez les mammifères et les amphibiens. On a constaté, notamment chez les mammifères, que l'expression de ces gènes est régulée dans le temps et dans l'espace d'une manière qui laisse supposer que, chez les vertébrés aussi, il jouent un rôle dans la morphogenèse au cours de la mise en place du plan d'organisation corporel. Leur intervention dans l'édification du système nerveux dans lequel certains de ces gènes sont transcrits abondamment mais de façon transitoire nous a amenés à en entreprendre le clonage chez l'embryon d'oiseau. Celui-ci constitue, en effet, un modèle expérimental favorable pour étudier les effets de position sur l'expression de tels gènes.

Deux projets ont été entrepris :

4.1. Clonage d'un gène de caille en utilisant la sonde *Antennapedia* de drosophile et celle de l'homéogène *Hox 3-1* de la souris Z.G. XUE et X. JIN

(Ces sondes ont été fournies respectivement par MM. W. Gehring et P. Brulet).

Nous avons pu isoler plusieurs clones de cADN contenant une séquence homeobox. Trois de ces clones ont été partiellement séquencés. L'analyse des

séquences a révélé une homologie de plus de 80 % avec le produit du gène *Antennapedia* au niveau des acides aminés.

En revanche, l'homologie avec d'autres gènes à homéodomaine est très faible dans les régions situées en dehors de l'homeobox. Il est donc probable qu'il s'agit d'homéogènes non encore décrits.

L'isolement et le séquençage d'un gène complet est maintenant réalisé et une publication est en cours de rédaction sur ce sujet.

4.2 Clonage du gène de caille homologue des gènes *msh* de la drosophile et *Hox-7* de la souris

Y. TAKAHASHI

Un gène contenant une homeobox, *msh*, a récemment été isolé chez la drosophile. Il constitue le gène le plus divergent parmi ceux de la famille des homeobox du type *Antennapedia* ; il présente avec eux une homologie inférieure à 45 %. Le gène *msh* est fortement exprimé dans le système nerveux central, ainsi que dans les muscles striés segmentés de la paroi de l'embryon. *Hox-7* est le gène équivalent isolé chez la souris : il présente plus de 90 % d'homologie avec le gène *msh* de la drosophile ; les deux gènes *msh* et *Hox-7* appartiennent donc à une nouvelle famille d'homéogènes. Il a été montré que chez la souris, *Hox-7* est fortement exprimé dans la crête neurale, les bourgeons de membre, ainsi que dans le mésenchyme de la face qui a pour origine les cellules de la crête neurale céphalique (Robert *et al.*, 1989 ; Hill *et al.*, 1989). Ces résultats suggèrent que le gène *Hox-7* joue un rôle important dans la différenciation du mésenchyme des cellules de la crête neurale céphalique.

Ainsi pour étudier les mécanismes de la différenciation de la crête neurale céphalique, nous avons cherché à obtenir le cDNA homologue de *Hox-7* chez la caille, et à en rechercher la fonction.

Le cDNA est maintenant cloné et ce résultat est en cours de publication.

DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

La plupart des travaux ont été réalisés sur le modèle aviaire. Cependant nous avons entrepris une série d'expériences sur la souris en collaboration avec le laboratoire dirigé par le D^r A. Coutinho à l'Institut Pasteur.

Nos recherches se sont développées selon deux axes principaux.

A. LA CARACTÉRISATION DE MARQUEURS DES CELLULES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

1. CARACTÉRISATION STRUCTURALE ET UTILISATION POUR L'ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME SANGUIN DE L'ANTIGÈNE MB1, MARQUEUR DE LA LIGNÉE CELLULAIRE HÉMANGIOBLASTIQUE

B. PÉAULT, M.C. LABASTIE, M. COLTEY et N.M. LE DOUARIN

L'anticorps anti-MB1 reconnaît un motif glycosidique associé à deux protéines sériques : l'IgM et l' α 2-macroglobuline.

Il présente différentes formes cellulaires :

1. - des formes lymphocytaires de poids moléculaires voisins de 80 kDa, 120 kDa et 200 kDa. En plus de ces bandes communes existent des espèces spécifiques des lymphocytes T et B, de poids moléculaires respectifs 180 kDa et 220-250 kDa ;
2. - des formes endothéliales (plusieurs bandes diffuses à 80, 100, 160 et 200 kDa).

Etude de l'émergence de l'antigène MB1 aux stades précoces du développement du système sanguin

B. PÉAULT, M. COLTEY et N.M. LE DOUARIN

Le système sanguin originel se forme aux dépens de précurseurs multipotentiels mésodermiques, les hémangioblastes, qui génèrent l'endothélium des vaisseaux et les premiers éléments figurés du sang. Considérant la coexpression de MB1 dans ces deux lignées cellulaires, il apparaît intéressant d'examiner l'ontogenèse précoce de ce marqueur.

Le marquage par immunofluorescence directe de coupes de blastodisques a permis de localiser chronologiquement et anatomiquement l'expression précoce de l'antigène MB1. Celui-ci n'est pas exprimé par les éléments des massifs hémangioblastiques indifférenciés identifiables, dès le stade du repli céphalique, dans la région postérieure du blastodisque, entre la lame mésodermique splanchnopleurale et l'endoderme. L'expression précoce du phénotype MB1 apparaît en fait marquer l'engagement d'une sous-population de cellules de ces massifs dans la voie de différenciation endothéliale. Ces éléments présomptifs,

MB1-positifs, de la paroi vasculaire apparaissent d'abord dès le stade d'une paire de somites, à la périphérie des amas hémangioblastiques les plus externes de la région médiane de l'aire opaque. A l'exception de cette monocouche superficielle, la grande majorité des cellules constituant ces massifs, et qui incluent essentiellement des érythroblastes primitifs, n'expriment pas l'antigène MB1. La famille érythrocytaire primitive, ou mégalocytaire, apparaît donc comme la seule lignée hématopoïétique dont aucun élément n'exprime jamais MB1. Les angioblastes de l'aire pellucide apparaissent tôt déterminés à ne se différencier qu'en cellules endothéliales.

Des images de bourgeonnement endothélial sont anatomiquement régionalisées dans l'aire opaque. Elles sont, en revanche, extrêmement rares, sinon absentes, dans les vaisseaux de l'aire pellucide jusqu'au stade de 16 somites.

2. LES RÉCEPTEURS DES CELLULES T CHEZ LE POULET

M. COLTEY, N.M. LE DOUARIN, en collaboration avec le P^r M. COOPER, C.L. CHEN, P. BUCY (University of Alabama, Birmingham, USA)

2.1. *Expression des récepteurs TCR1 ($\gamma\delta$) et TCR2 ($\alpha\beta$) au cours des deux premières vagues de colonisation du thymus*

Les anticorps anti-TCR1 et anti-TCR2, produits dans le laboratoire de M. Cooper, reconnaissent exclusivement les antigènes de poulet. La différenciation et la dynamique d'émigration des cellules portant ces récepteurs vers les sites périphériques ont été suivies sur des thymus chimères. Nous avons observé que les cellules TCR1⁺ et TCR2⁺ se différencient à partir des deux vagues de cellules hématopoïétiques. La première vague cependant produit d'abord les cellules TCR1⁺ et seulement à partir de 16 jours d'incubation les cellules TCR2⁺.

D'autre part, un troisième récepteur appelé TCR3 faisant intervenir des gènes vraisemblablement différents des gènes précédents (ζ et ϵ) met en évidence une troisième population de cellules T ne se différenciant qu'autour de la naissance. L'équivalent de TCR3 n'a pas encore été identifié chez les mammifères.

2.2. *Mise en évidence par le moyen des chimères caille-poulet de cellules exprimant les antigènes CD3 dans le cytoplasme, n'exprimant pas le TCR et se développant en dehors du thymus*

Nous avons observé dans la rate, la bourse de Fabricius et l'intestin de jeunes embryons de poulet la présence de cellules exprimant l'antigène CD3 dans le cytoplasme (cCD3⁺) et ne l'exprimant pas sur la surface cellulaire (sCD3⁻). Ces cellules ne possédant ni TCR1 ni TCR2 ni TCR3 ont été appelées TCR0.

Dans ce travail, nous avons étudié *in vivo* la multiplication, la différenciation et la recirculation de ces cellules par transplantation de fragments de rate

ou de bourse embryonnaires de poulet dans des cailles de 3 jours. Les cellules de type caille n'étant pas reconnues par l'ensemble de nos anticorps monoclonaux, spécifiques des récepteurs des cellules T et des molécules CD3 qui lui sont associées chez le poulet, ces cellules de poulet peuvent être détectées dans les tissus chimériques. Après des greffes de rates de 6 ou 9 jours et de fragments de bourse de 9 jours, on voit apparaître dans les explants des cellules cCD3⁺. 50 % de ces cellules expriment à leur surface CD8 mais n'expriment pas TCR1 (TCR $\gamma\delta$) ou TCR2 (TCR $\alpha\beta$). Le fait qu'une rate de 6 jours contienne des précurseurs des cellules TCR0 montre qu'elles ont une origine extrathymique. Les cellules TCR0 de poulet circulent dans la caille hôte et s'y localisent dans la rate, la bourse et parfois le thymus. Ces cellules TCR0 ne sont pas des prothymocytes mais représentent une lignée indépendante de cellules T.

B. RECHERCHES SUR LES MÉCANISMES DE LA DISTINCTION DU SOI ET DU NON SOI

A l'aide de notre modèle de greffes embryonnaires, nous avons entrepris d'étudier deux aspects du problème majeur posé par le fonctionnement du système immunitaire.

1. - Quel est le rôle de la composante épithéliale du thymus dans l'induction de la tolérance vis-à-vis du soi ?
2. - Comment les cellules T sont-elles tolérisées vis-à-vis des antigènes tissu-spécifiques non représentés dans le thymus. En d'autres termes, existe-t-il une forme périphérique (ou extrathymique) d'induction de tolérance ?

1. RÔLE DE LA COMPOSANTE ÉPITHÉLIALE DU THYMUS DANS L'INDUCTION DE TOLÉRANCE VIS-A-VIS DE GREFFES TISSULAIRES XÉNOGÉNIQUES

1.1. *Greffes de bourgeons d'aile à 4 jours d'incubation*

H. OHKI, C. MARTIN, C. CORBEL, M. COLTEY et N.M. LE DOUARIN

Des greffes d'ébauches de membres de la caille sur le poulet ont été effectuées au stade de 4 jours d'incubation (E4), c'est-à-dire lorsque le bourgeon de membre est constitué d'un mésenchyme encore indifférencié et d'ectoderme superficiel. Les animaux chimères peuvent éclore et présentent alors une aile appartenant au receveur et une aile appartenant au donneur. Sur 30 animaux ainsi opérés, un rejet aigü se produit entre 2 et 15 jours après la naissance.

Si l'épithélium thymique provenant de la caille donneur est greffé pendant la vie embryonnaire, une tolérance complète vis-à-vis de l'aile est conférée aux chimères ainsi construites. Dans le thymus des chimères, les cellules

hématopoïétiques thymiques dérivent de l'hôte. Dans les chimères tolérantes, certains lobes thymiques ne contiennent que des cellules épithéliales de caille alors que d'autres contiennent des cellules épithéliales de poulet ou encore un mélange de cellules épithéliales de caille et de poulet. Si les chimères contiennent des cellules épithéliales de caille dans un tiers au moins de leurs lobes thymiques, une tolérance permanente pour l'aile greffée est induite. La greffe de thymus confère également la tolérance vis-à-vis d'une greffe de bourse de Fabricius.

2. RECHERCHES SUR LE RÔLE DE L'ÉPITHÉLIUM THYMIQUE DANS L'INDUCTION DE TOLÉRANCE CHEZ LA SOURIS

J. SALAÜN, F. CALMAN, M. COLTEY, I. KHAZAAL et N.M. LE DOUARIN

2.1. Greffe d'épithélium thymic allogénique chez l'embryon de souris normale in utero

J. Salaün a développé depuis quelques années au laboratoire des méthodes microchirurgicales applicables aux fœtus de mammifères. Il est ainsi possible d'implanter dans la cavité coelomique de foetus de souris des ébauches contenant l'épithélium thymique. A partir du greffon se développe un thymus chimère, dont l'épithélium appartient au donneur et les lymphocytes ainsi que les cellules dendritiques et macrophagiques dérivent de l'hôte. Les lymphocytes qui se développent dans ces thymus présentent les mêmes marqueurs que les lymphocytes qui se développent dans le thymus de la souris hôte. Les thymus chimères sont acceptés de façon définitive : les greffes de peau de l'haplo type de l'épithélium thymique greffé sont cependant rejetées comme chez les témoins. Au vu de ce résultat, nous nous sommes tournés vers le système des souris athymiques nude (*nu/nu*).

2.2. Reconstitution de la fonction immunitaire de souris athymiques nude par la greffe syngénique d'ébauche thymique épithéliale

I. KHAZAAL, J. SALAÜN, M. COLTEY, F. CALMAN et N.M. LE DOUARIN

Chez la souris, l'ébauche du thymus se développe à partir de l'endoderme pharyngien de la 3^e poche branchiale. Les cellules lymphoïdes ne commencent à coloniser l'ébauche thymique qu'à partir du 11^e jour de la gestation. La 3^e poche branchiale d'embryons de 10 jours contient un rudiment thymique constitué d'un épithélium dépourvu de toute cellule hémopoïétique. Cette ébauche épithéliale peut être greffée à des souris nude nouveau-nées. En situation syngénique (BALB/c → BALB/c), la reconstitution complète de la fonction immunitaire a pu être démontrée à la fois *in vivo* (rejet de greffe de peau allogénique) et *in vitro* (MLR). La différenciation des cellules T chez ces souris restaurées ainsi que, pour ce qu'on peut en juger, l'étendue du répertoire que présente leur TCR est identique à celle de souris BALB/c témoins.

2.3. *Restauration de souris nude par la greffe allogénique d'épithélium thymique : induction d'une tolérance tissulaire*

J. SALAÛN, I. KHAZAAL, M. COLTEY, F. CALMAN et N.M. LE DOUARIN, en collaboration avec A. BANDEIRA et A. COUTINHO (Département d'Immunologie de l'Institut Pasteur)

La greffe de la 3^e poche branchiale d'embryons de souris C3H (H-2^k) à des receveurs *nu/nu* BALB/c (H-2^d) a été pratiquée à la naissance dans les mêmes conditions que précédemment. La restauration de la fonction T chez ces animaux a été obtenue comme dans le cas où les souris sont greffées par des ébauches thymiques épithéliales autologues. L'induction de la tolérance *in vivo* vis-à-vis de la greffe de peau du même haplotype que le donneur du rudiment thymique est obtenue chez tous les animaux reconstitués. La peau de l'haplotype H-2^d est également tolérée mais celle d'une 3^e partie (C57BL/6, H-2^b) est rapidement rejetée. En MLR et en test de cytotoxicité *in vitro* la réponse des cellules des souris *nu/nu* greffées est variable.

3. MISE EN ÉVIDENCE DE MÉCANISMES PÉRIPHÉRIQUES POUR L'INDUCTION DE LA TOLÉRANCE TISSULAIRE

3.1. *Greffe d'aile poulet (haplotype du CMH, B4 ou B12) → poulet (FI B15 B21 à E4)*

C. CORBEL, C. MARTIN, H. OHKI, M. COLTEY et N.M. LE DOUARIN, en collaboration avec Dr. I. HLOZANEK (Institut d'Immunogénétique de l'Académie des Sciences de Prague, Tchécoslovaquie)

Contrairement aux résultats obtenus lorsque le bourgeon d'aile de caille est greffé chez le poulet, dans cette situation allogénique, l'aile greffée est tolérée pendant toute la vie de l'animal. Cette tolérance cependant n'est pas parfaite. Dans tous les cas, les chimères ont montré des signes de rejet plus ou moins sévères selon les cas mais toujours réversibles. Les chimères acceptent la peau greffée ayant le même haplotype que l'aile greffée, mais ont rejeté la peau d'un haplotype différent. La réponse proliférative des lymphocytes T du sang des chimères, testée en MLR, est similaire à celle de poulets normaux. La tolérance tissulaire (*in vivo*) et la réponse proliférative des lymphocytes T (*in vitro*) apparaissent donc comme des phénomènes dissociables. Ces expériences plaident en faveur de l'existence de mécanismes périphériques, extrathymiques d'induction de la tolérance au soi.