

Embryologie cellulaire et moléculaire

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

Le cours de cette année a été divisé en deux parties : la première constituée de six leçons a porté sur le développement du système immunitaire. Ces leçons ont été données au Collège de France.

La seconde partie de mon enseignement a été délivrée à l'Université de Montpellier II. Elle a porté sur certains aspects du développement de la crête neurale.

Cours délivré au Collège de France

La première leçon a été consacrée au rappel de la structure et des fonctions du système immunitaire chez les Vertébrés. C'est en effet chez les Vertébrés et notamment les Mammifères que les mécanismes de défense de l'organisme contre les agents infectieux bactériens et viraux ont été les plus étudiés.

Il est à noter que chez les Vertébrés supérieurs, le modèle aviaire — proche des Mammifères à bien des égards —, a été particulièrement utile dans l'acquisition de nos connaissances sur la structure et le fonctionnement du système immunitaire. Les Oiseaux possèdent en effet un organe spécialisé dans la production des lymphocytes B, la *bourse de Fabricius*. La découverte par Glick en 1956, du rôle joué par la *bourse de Fabricius* dans l'acquisition de l'immunité humorale a été à l'origine de la mise en évidence des deux lignées de lymphocytes, les lymphocytes T responsables de l'immunité à médiation cellulaire dont la différenciation s'effectue dans le thymus et les lymphocytes B qui, chez les Mammifères, sont produits essentiellement dans la moelle osseuse. Cette découverte a permis à l'immunologie de prendre un essor considérable. Le modèle aviaire a aussi été très utile dans l'étude du développement du système immunitaire, comme cela apparaîtra au cours des

leçons qui suivent. Ceci s'applique notamment au problème de l'origine des lymphocytes, qui a été le centre d'un long débat et auquel une réponse définitive a été apportée grâce à la réalisation de chimères interspécifiques chez l'embryon d'Oiseau. Bien que l'étude du système immunitaire ait commencé au 18^e siècle, l'immunologie a été l'un des domaines de la Biologie où les progrès les plus spectaculaires et les plus rapides se sont produits très récemment grâce aux approches modernes de la biochimie, de la génétique, de la biologie cellulaire et de la biologie moléculaire.

Un des acquis essentiels de l'immunologie moderne a été la découverte de la structure des anticorps, des gènes correspondants ainsi que celle des récepteurs aux antigènes des lymphocytes T qui sont maintenant connus au niveau moléculaire. Les mécanismes moléculaires responsables de la genèse du répertoire des récepteurs portés par les lymphocytes B et T ont été exposés.

Il a été rappelé qu'un problème important a, au cours de ces dernières années, été au centre d'une activité de recherche considérable ; il s'agit de la manière dont l'organisme effectue la distinction entre soi et non soi, c'est-à-dire comment le système de défense de l'organisme épargne ses propres cellules lorsqu'elles sont normales tout en ayant acquis la capacité de les tuer lorsqu'elles sont modifiées par exemple par un virus ou par transformation tumorale. Cette capacité qui s'étend aussi aux cellules étrangères introduites dans l'organisme se traduit par le rejet des greffes. Malgré les progrès accomplis récemment dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la reconnaissance du soi et du non soi, le problème reste encore mal compris dans ses aspects globaux au niveau de l'organisme entier. Une des conséquences de cette ignorance se manifeste dans la manière dont la médecine lutte contre le rejet des greffe dans la transplantation d'organes. Bien que des progrès aient été faits dans ce domaine, les méthodes utilisées sont très largement non spécifiques puisqu'elles consistent à abaisser l'efficacité de la réponse immunitaire de l'hôte dans son ensemble.

Dans les cours suivants on a abordé en détail la question de l'origine embryologique des cellules précurseurs des lymphocytes qui se différencient dans le thymus et la bourse de Fabricius. L'utilisation du système de marquage par les cellules de Caille associées à celles du Poulet a permis de montrer que ces précurseurs ont une origine extrinsèque aux organes lymphoïdes primaires. Ceux-ci doivent être colonisés à un stade précis du développement par des cellules souches circulantes dont l'origine est intraembryonnaire. Des îlots sanguins dispersés dans le mésoderme de l'embryon (et localisés surtout au voisinage de l'aorte dorsale) entrent en activité à un stade qui précède de peu celui où les ébauches du thymus, puis de la bourse deviennent réceptifs.

Le rôle du sac vitellin, premier organe hématopoïétique de l'embryon, a été défini. Contrairement à l'opinion qui prévalait auparavant, on a montré que

ce rôle est limité à la production de cellules érythroïdes au cours de la première moitié de l'embryogenèse. Les cellules sanguines du sac vitellin ne participent pas à la colonisation des organes hématopoïétiques de l'embryon qui fonctionneront ensuite pendant toute la vie de l'animal. Il est à souligner que si le rôle du sac vitellin dans l'hématopoïèse a été élucidé chez les Oiseaux, il n'en est pas de même chez les Mammifères. Les questions qui subsistent dans ce groupe ont été envisagées ainsi que les approches expérimentales qui pourraient permettre d'y répondre.

Une caractéristique importante de la biologie des organes lymphoïdes primaires chez les Oiseaux est le fait qu'ils sont colonisés par les cellules hématopoïétiques d'une manière discontinue. Ainsi, la *bourse de Fabricius* reçoit-elle les précurseurs lymphocytaires pendant une période de la vie embryonnaire qui s'étend sur 4 à 6 jours seulement selon l'espèce considérée. Ces cellules sont à l'origine de la totalité des lymphocytes B produits pendant la vie entière de l'animal. La genèse du répertoire de ces cellules s'effectue dans les follicules bursiques pendant la vie embryonnaire et post-natale précoce par un processus moléculaire original qui n'avait pratiquement été décrit auparavant que chez les Protozoaires (notamment certains protozoaires parasites). Il s'agit d'un mécanisme de conversion génique au cours duquel des séquences plus ou moins importantes de l'unique gène variable des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines (Ig) sont remplacées par celles empruntées à des pseudogènes variables présents dans le locus des gènes d'Ig.

La colonisation du thymus s'effectue chez les Oiseaux (Poulet et Caille), d'une manière cyclique. Chez la Caille par exemple, les phases de colonisation durent environ 24 heures et sont séparées par des périodes de 5 jours au cours desquels le thymus n'est pas réceptif vis-à-vis des cellules hématopoïétiques. Trois phases successives ont pu être mises en évidence pendant la vie embryonnaire et post-natale précoce chez le Poulet et la Caille. La dynamique des populations successives de lymphocytes T issues de ces vagues de cellules souches a pu être suivie précisément. On a pu montrer que le réarrangement des gènes du récepteur des cellules T (TCR) produit d'abord les chaînes $\gamma\delta$ (TCR1) qui sont exprimées par la totalité des cellules T de la première vague de lymphocytes jusqu'au stade de 15 jours d'incubation environ chez le Poulet. Des cellules porteuses des chaînes $\alpha\beta$ (TCR2) sont ensuite produites. Des cellules TCR₁+ puis TCR₂+ sont également générées par les lymphocytes issus de la deuxième vague de colonisation thymique. Le même schéma de production des chaînes $\gamma\delta$ et $\alpha\beta$ paraît exister chez les Mammifères : le caractère cyclique de la colonisation du thymus a pu être démontré chez le fœtus de souris.

Les mécanismes responsables de l'invasion subite du thymus par les cellules souches hématopoïétiques posent un problème de biologie du développement particulièrement intéressant en ce qu'il est lié aux phénomènes de migration et

de reconnaissance cellulaires. L'hypothèse chimiotactique de la colonisation thymique que j'avais formulée en 1977 a reçu une confirmation totale grâce à des travaux réalisés en culture *in vitro*. Ceux-ci ont conduit à rechercher la (ou les) substances(s) chimiotactique(s) responsable(s) de l'invasion thymique. Il semble que la $\beta_2\mu$ et d'autres peptides de plus petite taille puissent jouer, au moins *in vitro*, le rôle de chémoattractant vis-à-vis des cellules précurseurs des lymphocytes T. Ces substances chémoattractives sont produites par l'épithélium thymique d'une manière itérative, c'est-à-dire pendant les périodes de réceptivité du thymus vis-à-vis des cellules hématopoïétiques. L'extinction de l'attractivité chimiotactique est due à des interactions cellulaires inhibitrices entre l'épithélium thymique et les cellules souches sanguines.

Le rôle de l'épithélium thymique dans l'établissement de la fonction T est considérable. La production d'anticorps monoclonaux dirigés contre des déterminants de surface des cellules épithéliales thymiques chez la souris a révélé qu'elles sont hétérogènes. Outre le fait que les cellules épithéliales corticales expriment les antigènes de Classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) d'une manière plus générale que les cellules épithéliales médullaires, elles peuvent aussi être distinguées de celles-ci par des molécules distinctes de la membrane cellulaire.

Le problème de la sélection positive et négative sur lesquelles repose la reconnaissance du soi et du non soi par les lymphocytes T a été largement envisagé dans les séminaires présentés dans le cadre du cours et dont la liste est indiquée ci-dessous.

Les deux derniers cours ont porté sur le rôle joué par l'épithélium thymique dans la tolérance vis-à-vis des greffes tissulaires.

La démonstration que, contrairement à l'opinion courante, l'épithélium du thymus joue un rôle essentiel dans la reconnaissance du soi, a pu être apportée grâce à l'identification de la phase pré-réceptive de l'ébauche thymique précoce. Il existe chez les Oiseaux comme chez la Souris une ébauche thymique purement épithéliale dans les poches branchiales (3 et 4 chez les Oiseaux ; 3 chez la souris) qui, lorsqu'elle est transplantée chez un hôte isogénique allogénique ou hétérosécificique, est le siège d'un influx de cellules hématopoïétiques du receveur. Ces dernières subissent dans le thymus greffé une double maturation en cellules dendritiques médullaires et en lymphocytes T qui sont donc « éduqués » dans un environnement hétérogène : celui du donneur en ce qui concerne l'épithélium thymique, celui de l'hôte pour les cellules dendritiques. Ainsi le rôle de l'épithélium thymique sur le maintien de greffes tissulaires de l'haplotype du donneur, peut-il être étudié d'une manière sélective. Dans le modèle Oiseau, de telles greffes sont réalisées chez l'embryon (greffes d'aile ou de *bourse de Fabricius* de Caille sur le Poulet) au stade de 4 jours d'incubation, c'est-à-dire avant que le développement du thymus n'ait commencé. Simultanément, on procède à l'ablation totale ou

partielle de l'ébauche du thymus de l'hôte Poulet et on la remplace par l'équivalent provenant de la Caille donneur de l'aile. Dans ce cas, l'ébauche d'aile (rejetée d'une manière aiguë peu après la naissance en l'absence de greffe thymique) est acceptée définitivement.

Un modèle expérimental proche de celui-ci a été mis au point chez la souris dont l'embryon ne peut être soumis à microchirurgie aux stades de l'organogénèse thymique. On s'est adressé à la Souris *Nude* athymique sur laquelle on greffe une ébauche thymique épithéliale embryonnaire allogénique prélevée sur un embryon de 10 jours. La fonction T dans son ensemble est reconstituée chez ces souris qui peuvent donc être soumises au test de la greffe de peau isogénique ou de l'haplo type du donneur du thymus ou encore appartenant à une troisième partie totalement étrangère. Seule la peau de la troisième partie est rejetée tandis que celles de l'haplo type de l'hôte et du thymus sont acceptées.

Il est important de noter que les tests d'activation lymphocytaire *in vitro* vis-à-vis de cellules stimulatrices du type donneur ne sont pas modifiés par la greffe d'épithélium thymique. Ce dernier n'induit pas d'élimination sélective de clones potentiellement autoréactifs. La sélection clonale n'est donc pas le seul mécanisme assurant la tolérance immunologique et l'intégrité du soi.

Les perspectives offertes par ces phénomènes d'inactivation dans le thymus des clones autoréactifs de lymphocytes T ont été envisagées et les recherches qu'elles suscitent discutées.

Cours à l'Université de Montpellier II

La partie du cours délivrée à l'Université de Montpellier II a porté sur le rôle joué par la crête neurale dans la genèse des structures faciales, des glandes endocrines et du système nerveux périphérique.

SÉMINAIRES DE LA CHAIRE D'EMBRYOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

1990-1991

Octobre

D^r Louis DU PASQUIER, *Basel Institute for Immunology* : Ontogenèse du système immunitaire chez le Xénope.

Novembre

D^r Robson MACDONALD, *Ludwig Institute for Cancer Research* : Mechanisms of tolerance to self superantigens.

D^r Harald BOEHMER, *Basel Institute for Immunology* : Clonal selection in primary and secondary lymphatic organs.

D^r Antonio COUTINHO, *Institut Pasteur* : Détermination génétique et sélection cellulaire dans l'établissement des répertoires lymphocytaires.

D^r Diane MATHIS, *Institut de Chimie Biologique, Strasbourg* : Control of T cell repertoire selection by MHC class I molecules.

Décembre

D^r Philippe KOURILSKY, *Institut Pasteur* : Régulation de l'expression des antigènes d'histocompatibilité de classe I.

Mars

P^r Charles ORDAHL, *Université de Californie, San Francisco* : Transcriptional regulation in early muscle development. I. Skeletal muscle ; II. Cardiac muscle.

Mai

P^r Seymour BENZER, *Institut de Technologie de Californie à Pasadena, USA* : I. Neurogenetics of behavior in *Drosophila*. II. Faire d'une mouche un éléphant.

RÉSUMÉ DE L'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE

NEUROEMBRYOLOGIE

Les principaux progrès accomplis au cours de cette année ont porté :

- 1) sur la caractérisation et la régulation de la protéine SMP spécifique des cellules gliales que nous avons découverte au cours des années précédentes ;
- 2) sur le transfert d'une maladie génétique du système nerveux par greffe d'épithélium neural chez l'embryon ;
- 3) sur les gènes du développement chez les Oiseaux.

1. ÉTUDE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE DE LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES GLIALES PÉRIPHÉRIQUES

La découverte au laboratoire de nouveaux marqueurs spécifiques et précoces des cellules gliales a été à l'origine de plusieurs travaux qui ont permis d'analyser le processus de la différenciation gliale périphérique.

Dans un premier temps nous avons préparé des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes spécifiquement gliaux en immunisant des souris avec des glycoprotéines purifiées de myéline de nerfs de cailles adultes. Nous avons ainsi caractérisé deux antigènes de surface : l'épitope glucidique 4B3 et la glycoprotéine SMP qui apparaissent séquentiellement durant la gliogénèse et présentent des distributions cellulaires différentes de celles des autres marqueurs déjà décrits dans le SNP et le SNC. Nous avons plus particulièrement approfondi la caractérisation moléculaire de la protéine SMP (Schwann cell Myelin Protein) en isolant le cDNA correspondant et en étudiant certaines de ses caractéristiques moléculaires et fonctionnelles.

Grâce à une nouvelle technique de culture permettant la prolifération et la différenciation d'une cellule isolée, nous avons pu identifier les différents précurseurs à potentialité gliale présents dans la crête neurale et dans certaines structures nerveuses embryonnaires. La grande hétérogénéité des précurseurs gliaux identifiés par la technique de clonage cellulaire nous a amenés à nous interroger sur la nature des signaux provenant du microenvironnement tissulaire qui conduisent à la différenciation des 4 types morphologiques de cellules gliales périphériques : les cellules de Schwann myélinisantes et non-myélinisantes des nerfs, les cellules satellites des ganglions et les cellules gliales entériques. La régulation de l'expression du marqueur SMP étudiée dans différentes situations expérimentales a alors révélé l'influence majeure exercée par le microenvironnement sur l'émergence et la stabilité des différents phénotypes gliaux périphériques ainsi que la plasticité et l'interconvertibilité des différents phénotypes gliaux.

1.1. *Identification de deux nouveaux marqueurs des cellules gliales*

a) *Mise en évidence d'un épitope glucidique exprimé précocement par l'ensemble des cellules gliales*

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

L'étude immunocytochimique systématique réalisée *in situ* avec l'anticorps monoclonal anti-4B3 a montré l'expression de cet épitope par l'ensemble de la glie périphérique et centrale à l'exclusion de tout tissu non neural. Dans le SNP les cellules de Schwann des nerfs, les cellules satellites des ganglions et les cellules gliales entériques sont 4B3 positives. Dans le SNC, la substance grise et la substance blanche de la moelle épinière mais également du cerveau sont très immunoréactives suggérant une immunoréactivité des astrocytes et des oligodendrocytes. Les neurones *in vivo* et *in vitro* ne sont jamais reconnus par l'anti-4B3. Les cellules de la crête neurale en début de migration ne portent pas l'épitope 4B3, mais celui-ci apparaît peu de temps après, au 4^e jour d'incubation, au niveau des ganglions rachidiens et des plexus aortiques en cours de formation. Le déterminant 4B3 est donc exprimé par l'ensemble des cellules gliales et à partir de stades très précoces de l'embryo-

genèse avant toute identification possible des précurseurs gliaux par des critères cytologiques. Ceci suggère que l'apparition du phénotype 4B3 correspond à l'une des toutes premières manifestations moléculaires liées à la différenciation gliale.

Nous avons pu caractériser partiellement cet antigène. Il s'agit d'un déterminant glucidique porté par plusieurs molécules distinctes de nature lipidique et protéique. La seule protéine identifiée portant cet épitope est la glycoprotéine SMP exprimée dans les nerfs et identifiée grâce à un deuxième anticorps monoclonal. En Western blot l'anticorps anti-4B3 reconnaît la glycoprotéine immunopurifiée grâce à l'anti-SMP et cette réactivité disparaît après déglycosylation enzymatique.

b) *Analyse d'un nouveau marqueur de différenciation des cellules de Schwann et des oligodendrocytes*

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

Le deuxième antigène caractérisé est la glycoprotéine SMP qui se présente en électrophorèse (PAGE) en conditions non réductrices sous la forme d'un doublet de Mr 75-80 000 dans le SNP et d'un singulet de Mr 80 000 dans le SNC. L'expression de cette protéine gliale présente des caractéristiques intéressantes.

Au sein de la glie périphérique SMP est exprimée de façon spécifique par les cellules de Schwann des nerfs à l'exclusion de tout autre type cellulaire glial. Ainsi des marquages immunocytochimiques sur des préparations de fibres dissociées mécaniquement montrent l'expression de SMP dans la gaine de myéline, biréfringente en lumière polarisée, mais également à la surface des cellules de Schwann entourant les fibres non-myélinisées, non-biréfringentes. Par contre les cellules satellites et les neurones intraganglionnaires apparaissent SMP négatifs alors que les fibres nerveuses pénétrant dans les ganglions sont SMP positives. Au niveau de l'intestin, les fibres nerveuses de l'innervation extrinsèque sont reconnues par l'anticorps anti-SMP. Par contre aucune cellule intra-entérique ne synthétise SMP. L'expression de cette molécule constitue actuellement le seul critère moléculaire permettant de distinguer les cellules de Schwann des nerfs des cellules gliales entériques et des cellules satellites des ganglions.

L'apparition de SMP à E5 chez la caille soit 5 à 6 jours avant le début du processus de myélinisation montre que la synthèse de cette protéine obéit à des mécanismes de régulation différents de ceux identifiés pour les constituants de la myéline. Ceci se confirme *in vitro* puisque SMP est exprimé de façon constitutive sur la membrane des cellules de Schwann même en culture à long terme et en l'absence de neurone. Par ailleurs une sous-population de cellules SMP⁺ apparaît dans des cultures de crête neurale après 8 jours permettant ainsi pour la première fois de visualiser *in vitro* l'émergence de la

lignée Schwann au sein des dérivés de la crête. Cette spécificité précoce pour les cellules à potentialité myélinisante est retrouvée dans le SNC. En effet des expériences de double coloration avec l'anticorps anti-SMP et un antiserum anti-protéine basique de la myéline démontrent que les fibres myélinisées sont SMP⁺. Des expériences similaires réalisés en culture confirment la spécificité de l'expression de SMP par les oligodendrocytes MBP⁺ SMP⁺ et démontrent également la synthèse de cet antigène par des cellules de même morphologie MBP- qu'on peut considérer comme des oligodendrocytes immatures.

1.2. *Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de l'antigène SMP*

C. DULAC, P. CAMERON-CURRY et N. LE DOUARIN, en collaboration avec J. ROSSIER (Lab. de Physiologie Nerveuse du CNRS, Gif-sur-Yvette) et J. RODER (Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto)

L'extrême spécificité de l'expression de SMP et son originalité par rapport aux autres marqueurs gliaux identifiés auparavant nous a poussés à approfondir sa caractérisation moléculaire et à isoler le cDNA correspondant.

a) *Clonage du cDNA codant pour SMP*

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 SNC comme un singulet de Mr 80 000. L'anticorps anti-SMP reconnaît un épitope conformationnel de nature polypeptidique. Nous avons mis au point une technique de purification de SMP par chromatographie d'affinité suivie d'une électroélution. Cette purification a permis de déterminer la séquence en acides aminés N terminale de SMP puis, après coupure protéolytique et séparation des fragments par HPLC, de connaître plusieurs microséquences internes à la protéine. Les deux formes moléculaires trouvées dans le SNP et l'unique forme caractérisée dans le SNC possèdent la même extrémité N terminale. La composition globale en acides aminés de SMP déterminée par la technique PICO.TAG, confirme l'identité entre les formes moléculaires de SMP rencontrées dans le SNP et le SNC. Cette analyse a permis de révéler une forte hydrophobicité de la protéine. D'autre part le traitement de SMP par la glycopeptidase F a montré que 20 % environ de la masse de la molécule était de nature glucidique. Après immuno-purification de SMP nous avons pu en déterminer la séquence en acides aminés NH₂ terminale ainsi que plusieurs microséquences internes de la protéine. Des expériences d'amplification (PCR) réalisées entre des mélanges d'oligonucléotides correspondant à ces microséquences ont fourni 2 sondes non-dégénérées dont l'une de 400 bases correspondant à l'extrémité 5' codante du cDNA. Le criblage d'une banque de cDNA de moëlle épinière de Caille avec cette sonde a permis d'isoler le cDNA complet codant pour SMP qui a une taille de 3 Kb environ. Plusieurs contrôles ont permis de

vérifier rapidement que nous avons isolé le bon gène : des cellules COS de singe transfectées par un vecteur contenant l'insert de 3 Kb expriment l'antigène SMP à leur surface, et les études de Northern blot ou d'hybridation *in situ* confirment l'identité des zones d'expression du transcrite SMP et de la protéine détectée par immunocytochimie. Enfin plusieurs séquences en acides aminés internes ont été retrouvées dans la séquence du clone.

La séquence peptidique du messager codant pour SMP révèle une phase ouverte de lecture de 620 acides aminés contenant 2 séquences hydrophobes correspondant l'une au peptide signal en amont de la séquence NH₂-terminale identifiée précédemment, l'autre à un domaine transmembranaire. La partie extracellulaire de la séquence contient 5 sites de glycosylation ainsi que 15 cystéines et un site RGD.

L'alignement de séquences centrées sur les cystéines démontre d'importantes homologies internes dont la disposition suggère l'existence de 5 domaines globulaires de type immunoglobuline C2. SMP présente de nombreuses homologies de séquences avec d'autres molécules de la superfamille des Ig telle que NCAM et surtout la myelin associated glycoprotein (MAG) clonée chez le rat. La répartition des séquences homologues entre les deux protéines est très hétérogène puisque le 1^e domaine Ig et le domaine transmembranaire sont identiques à plus de 60 % alors que l'identité des séquences cytoplasmiques ne concerne que les 8 acides aminés carboxyterminaux.

b) *Etude fonctionnelle. Cartographie moléculaire*

Des études fonctionnelles réalisées dans l'équipe de John Roder avec des liposomes ont démontré les propriétés adhésives de la MAG sur la membrane des axones. Connaissant l'homologie de séquences entre SMP et MAG, il nous a paru intéressant de savoir si SMP présentait des propriétés adhésives similaires. Nous avons donc, en collaboration avec l'équipe de Toronto, comparé les propriétés adhésives de liposomes contenant les protéines MAG (de rat), SMP (de caille) ou glycophorine (de rat) sur des cultures de ganglions rachidiens de caille. Les liposomes MAG se lient très fortement à la membrane des axones contrairement aux liposomes glycophorine et SMP. L'adhésion des liposomes MAG est bloquée de façon spécifique par l'anticorps monoclonal 513 caractérisé chez M. Schachner mais n'est pas affectée par l'anti-SMP. Nous avons contrôlé que les trois types de liposomes contenaient les mêmes quantités de protéines purifiées selon des protocoles similaires. Enfin nous avons vérifié la structure tridimensionnelle correcte de ces protéines à la surface des liposomes grâce à des anticorps reconnaissant des épitopes conformationnels. Ces expériences suggèrent tout d'abord une bonne conservation des séquences de la MAG et de son récepteur entre les oiseaux et les mammifères et indiquent que contrairement à la MAG, SMP ne semble pas impliquée dans l'adhésion entre les cellules de Schwann et la membrane des axones.

Ainsi, SMP est une entité moléculaire voisine de la MAG mais distincte tant sur le plan de sa distribution *in vivo* et *in vitro* que de ses caractéristiques fonctionnelles qui restent à préciser parmi les événements précoces de la différenciation des cellules de Schwann myélinisantes et non-myélinisantes.

La comparaison entre les séquences de SMP et de MAG est un élément précieux pour disséquer le support moléculaire de certaines fonctions grâce à la construction par génie génétique de molécules chimères. Cette stratégie nous a déjà permis de localiser les sites de fixation des 2 anticorps monoclonaux anti-SMP et 12D11 respectivement sur un épitope conformationnel porté par les deux premiers domaines Ig et sur le domaine intracytoplasmique.

1.3. Rôle du microenvironnement lors du processus de diversification des cellules gliales

a) Mise en évidence d'une plasticité phénotypique entre les cellules de Schwann et la glie entérique

C. DULAC et N.M. LE DOUARIN

Les expériences de clonage cellulaire démontrent que la plupart des cellules de la crête neurale peuvent donner des cellules de Schwann dans leur descendance. Cependant dans la paroi intestinale il n'y a jamais de différenciation de cellules de Schwann mais apparition de cellules gliales entériques de type astrocytaire. Afin d'analyser l'influence du microenvironnement tissulaire sur la différenciation gliale périphérique nous avons réalisé des expériences d'associations cellulaires Caille/Poule dans lesquelles nous avons suivi l'expression du phénotype SMP. Dans un premier temps nous avons associé des cellules de crête neurale de Caille à des fragments de paroi intestinale, de peau ou de muscle d'un embryon de poulet de 6 jours. Après 12 jours de coculture *in vitro* ou en greffe chorioallantoïdienne, des cellules de caille SMP⁺ se différencient dans la peau ou le muscle de poulet mais jamais dans le tissu intestinal. L'absence du phénotype SMP dans la paroi intestinale résulte donc d'une inhibition locale de la différenciation des précurseurs de cellules de Schwann et non d'un défaut de migration de certains précurseurs dans l'intestin. Nous avons précisé les modalités de cette influence inhibitrice en associant des cellules de nerfs de caille exprimant déjà le phénotype SMP à différents microenvironnements de poulet. Dans ces conditions et après 7 jours de coculture le phénotype SMP persiste dans la peau, malgré l'absence de neurones mais disparaît dans l'intestin. Ceci démontre que le microenvironnement entérique peut inhiber l'expression d'un phénotype établi de cellules de Schwann qui adoptent alors un caractère SMP⁻ de cellule entérique. Cette modulation phénotypique est confirmée par des expériences de culture cellulaire. Lorsque des plexus entériques sont disséqués de la paroi intestinale et mis en culture, le phénotype SMP de même que la synthèse de laminine, caractéristiques des cellules de Schwann, apparaissent à la surface de la

majorité des cellules gliales au bout de quelques jours de culture. L'ampleur et la rapidité de l'activation de ces synthèses suggèrent un véritable processus de transdifférenciation et non la différenciation de précurseurs restés quiescents.

Ces résultats démontrent une plasticité phénotypique remarquable entre deux types cellulaires pourtant très différents *in situ* : les cellules de Schwann et la glie entérique. Ceci suggère que les deux types de cellules gliales sont issus d'un même lignage cellulaire et que leur phénotype final est modulé par des interactions cellulaires spécifiques.

2. TRANSFERT À UN POULET SAIN D'UNE ÉPILEPSIE PHOTIQUE CONTRÔLÉE PAR UN GÈNE AUTOSOMIQUE RÉCESSIF PAR GREFFE D'ÉPITHÉLIUM NEURAL

M.A. TEILLET, B. SCHULER, N.M. LE DOUARIN, en collaboration avec le P^r R. NAQUET et le D^r G. LE GAL LA SALLE

(Laboratoire de Physiologie Nerveuse du CNRS, Gif-sur-Yvette)

L'épilepsie est une maladie du système nerveux caractérisée par des phénomènes électrophysiologiques et comportementaux bien définis. Dans certains cas, elle peut être d'origine génétique. Une épilepsie d'origine génétique a été décrite chez le poulet (R. D. Crawford, J. Hered., 61, 185, 1970). Chez les poulets homozygotes pour le gène Epi, les crises se manifestent dès l'éclosion sous l'influence de la lumière intermittente (ILS) ou de n'importe quel stress. Elles affectent ensuite les animaux pendant toute leur vie. Contrairement aux poulets normaux et aux hétérozygotes Epi, l'électroencéphalogramme (EEG) de repos des homozygotes est caractérisé par la présence d'ondes lentes et de pointes ondes (E. Crichlow and R.D. Crawford, Can. J. Physiol. Pharmacol., 52, 424, 1974). Les circuits neuronaux impliqués dans cette épilepsie photique n'étaient pas connus. Profitant de la possibilité d'expérimenter sur l'embryon d'oiseau nous avons entrepris de rechercher les zones cérébrales impliquées dans l'apparition de ce type d'épilepsie en faisant des greffes de vésicules cérébrales d'embryons homozygotes Epi de la souche isolée par Crawford, sur des embryons de poulet d'une souche commerciale testée comme non épileptique (Isa J.A. 57). Les chimères résultant de ces expériences sont soumises à l'ILS dès la naissance. Les résultats obtenus montrent que les territoires nerveux responsables du déclenchement et de la propagation de la crise s'étendent dans le prosencéphale et le mésencéphale puisque la greffe simultanée de ces deux vésicules encéphaliques est nécessaire pour obtenir des chimères présentant les caractères à la fois électroencéphalographiques et comportementaux des poulets épileptiques. Si le prosencéphale Epi est greffé seul, il conserve ses propriétés électroencéphalographiques Epi et cause chez l'animal greffé une certaine sensibilité à la lumière intermittente. Par contre, les chimères portant ce type de greffe ne développent jamais de crises complètes avec convulsions. La greffe du rhombencéphale ou même du

mésencéphale joint au rhombencéphale n'a aucun effet sur le comportement des animaux greffés et les EEG des chimères issues de ce type d'expérience sont semblables à ceux des témoins non épileptiques (hétérozygotes Epi et receveurs).

En conclusion, bien que des caractéristiques électroencéphalo-graphiques Epi existent dans le prosencéphale, une collaboration entre le prosencéphale et le mésencéphale est nécessaire pour le déroulement complet d'une crise d'épilepsie photique chez le poulet.

3. GÈNES DU DÉVELOPPEMENT CHEZ LES OISEAUX

Nous avons entrepris, il y a environ trois ans le clonage de gènes de développement contenant la séquence de 183 paires de base constituant « l'homéobox » chez le poulet et la caille. Le but de cette investigation est double : 1) la possibilité de manipuler les tissus et les cellules des embryons d'Oiseau pendant toute la période du développement permet de rechercher si l'expression de ces gènes répond à une information positionnelle c'est-à-dire dépend de l'environnement cellulaire dans lequel les cellules qui l'expriment sont placées. 2) Le second but s'inscrit dans une perspective évolutive, il consiste dans l'étude comparative de la structure de gènes jouant des rôles équivalents dans la série des Vertébrés et des divers usages faits au cours de l'évolution des formes vivantes de certains motifs moléculaires fonctionnels.

Des résultats ont été obtenus jusqu'à présent pour deux gènes, l'un appelé Quox7 qui a attiré notre attention parce qu'il s'exprime dans l'ectomésenchyme facial dérivé de la crête neurale, l'autre appelé Quox1 à cause de son degré d'homologie avec le gène Hox1-1 de souris.

1. LE GÈNE QUOX7 DE LA CAILLE : CLONAGE DU cDNA EXPRESSION DU GÈNE ET SA RÉGULATION PAR DES INTERACTIONS CELLULAIRES

1.1. *Clonage du cDNA de caille homologue des gènes msh de la drosophile et Hox7 de la souris*

Y. TAKAHASHI et N.M. LE DOUARIN

Un gène contenant un 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. Hox7 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 Hox7 appartiennent donc à une nouvelle famille d'homéogènes. Il a été montré que

chez la souris, *Hox7* est fortement exprimé dans le tube neural, 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 *Hox7* joue un rôle important dans la différenciation du mésenchyme dérivé de la crête neurale.

Un cDNA correspondant à *Hox7* a été cloné chez la caille et appelé *Quox7*. La protéine codée par *Quox7* présente une homologie de 83 % avec celle dérivée de *Hox7* au niveau de la séquence en aminoacides de l'homéodomaine et de 43 % pour les deux régions situées en 5' et 3' de ce dernier. Le reste de la molécule ne présente pas d'homologie significative avec celle de la souris. L'expression de *Quox7* étudiée en hybridation *in situ* chez l'embryon de caille de E2 à E5 est très comparable à celle de *Hox7* chez l'embryon de souris suggérant que les produits de ces deux gènes jouent un rôle semblable dans les deux classes de Vertébrés.

1.2. Régulation du gène *Quox7* dans l'arc mandibulaire par des interactions épithélio-mésenchymales

Y. TAKAHASHI, M. BONTOUX, N.M. LE DOUARIN

Chez les Vertébrés supérieurs, le mésenchyme des arcs branchiaux appelé aussi ectomésenchyme est essentiellement dérivé de la crête neurale céphalique. Dans l'arc mandibulaire, l'ectomésenchyme se différencie en cartilage (Cartilage de Meckel), et en plusieurs os de membrane.

Des travaux réalisés essentiellement par Hall (1981) ont montré que la différenciation des os de membrane de la mandibule dépend d'une induction émanant de l'épithélium ectodermique limitant l'arc mandibulaire. Nous avons observé que l'expression du gène *Quox7* mis en évidence par hybridation *in situ* au cours de l'ontogenèse correspond aux territoires présomptifs des os de membranes. Nous avons donc entrepris une série d'expériences dans laquelle le mésenchyme de l'arc mandibulaire est isolé à E3 de l'ectoderme qui lui est normalement associé, puis cultivé *in vitro*. Vingt-quatre heures après la mise en culture, l'expression du gène *Quox7* disparaît en même temps que la capacité du mésenchyme à produire de l'os de membrane. Si le mésenchyme isolé est réassocié à l'ectoderme homotypique ou à un épithélium provenant du bourgeon de membre ou de la paroi dorsale ou ventrale du corps, il conserve à la fois ses capacités à former de l'os de membrane et l'expression du gène *Quox7*. Nous mettons ainsi en évidence une corrélation rigoureuse entre l'expression de ce gène et la différenciation d'os de membrane à partir de l'ectomésenchyme.

Nous en concluons que les interactions épithélio-mésenchymateuses ont un rôle essentiel dans la régulation du gène *Quox7* dont le produit paraît nécessaire à l'exécution du programme de développement du squelette facial.

2. ÉTUDE DE L'EXPRESSION DE QUOX 1, UN GÈNE À HOMÉOBOÏTE DE CAILLE, AU COURS DU DÉVELOPPEMENT

Z.G. XUE, X. JIN et N.M. LE DOUARIN, en collaboration avec
W.J. GEHRING (Dept. of Cell Biology, Biozentrum, Bâle)

2.1. Isolement et séquençage de l'ADNc et l'ADN génomique de *Quox1*

Une banque d'ADNc a été préparée dans un bactériophage lambda gt10 à partir d'ARNm de la moelle épinière de caille de 5 jours d'incubation. 4 clones ont été isolés par hybridation croisée avec une sonde ADNc contenant l'homéobox d'*Antennapedia* (*Antp.*) de drosophile. L'analyse des séquences indique qu'ils sont identiques et qu'ils présentent l'homéodomaine et la partie C-terminal de *Quox1*. A l'aide d'une sonde oligonucléotique correspondant à la région 5' de *Quox1* dans l'homéobox, nous avons isolé un plus grand clone de *Quox1* (environ 1kb) appelé G11. Ce clone présente la totalité de la région codante de *Quox1*.

La comparaison de la séquence avec les autres homéogènes révèle que *Quox1* est un nouveau membre de la famille *Antp.* (83 % et 98 % d'homologie avec l'homéobox d'*Antp.* pour la séquence d'ADN et de protéine respectivement). La séquence de l'homéobox *Quox1* présente 87 % d'homologie avec celle de *Hox1.1* de souris, 82 % avec celle de *Hox 36* de xénope au niveau des nucléotides, et 100 % d'homologie avec celle de souris et de xénope au niveau des acides aminés (Kessel et al., 1987 ; Condie et Harland, 1987). Cette homologie s'étend hors de l'homéobox à la partie N-terminal des molécules. En revanche, il est très intéressant de constater que, dans la région C-terminal de *Quox1*, en dehors de l'homéobox, aucune homologie significative n'a été observée en comparaison avec toutes les séquences publiées, y compris celle de *Hox 1.1*. Ceci signifie qu'il s'agit probablement d'un nouveau gène de type *Antp.* La comparaison de la séquence des clones génomiques avec celle d'ADNc de *Quox 1* démontre que l'ADN génomique de *Quox1* se compose de 2 exons interrompus par un intron qui mesure environ 1.1 kb. L'homéobox est localisé dans le deuxième exon.

2.2. Etude de l'expression de *Quox1* au cours du développement

Disposant du gène de *Quox1*, nous avons cherché à savoir où et quand ce gène s'exprime et quel rôle il joue au cours de l'embryogenèse. Afin d'atteindre ce but, nous avons utilisé les techniques de Northern blot et d'hybridation *in situ*. Nous avons analysé, par Northern blot, l'ARN extrait à partir des embryons de 4 à 6 jours avec un fragment d'ADNc qui contient la région spécifique C-terminale et la région 3' non traduite de *Quox1*, sans l'homéobox. Les expériences de Northern blot ont montré que ce gène code pour un seul transcrit majeur de 2.0 kb au stade embryonnaire de 4 à 6 jours. Dans un deuxième temps, nous avons étudié en détail le pattern spacial de l'expres-

sion de Quox1 pendant le développement embryonnaire par la technique d'hybridation *in situ* avec les sondes d'ARN antisens sur des coupes à paraffine. Comme contrôle, une sonde « sens » est utilisée. Les embryons de 3 à 6 jours ont été examinés. Au stade de 3 jours, les vésicules de cerveau sont clairement tracées, les transcrits de Quox1 sont principalement détectés dans le système nerveux central (SNC). Chez l'embryon de 5 à 6 jours d'incubation, la portion dorsale des hémisphères a grandi considérablement et les parois du cerveau ont continué à épaissir. L'hybridation reste élevée dans le SNC, notamment dans l'épithélium ventriculaire et la zone sous-ventriculaire. Mais une accumulation importante d'ARNm est observée dans les couches épaisses du manteau du cerveau. Avec l'arrêt de la prolifération des neuroblastes, une diminution de l'expression de Quox1 est observée dans le tube nerveux.

En dehors du SNC, l'expression du gène Quox1 est détecté dans les ganglions sensoriels spinaux (originaires de la crête neurale), dans l'épithélium (dérivé de l'endoderme) de l'œsophage, de la trachée, du foie et des organes digestifs. Les transcrits sont aussi visibles dans le péricondrium des vertèbres et l'épithélium sensoriel de la région olfactive.

La plupart des gènes à homéoboîte décrits chez la souris ont une limite bien définie d'expression, généralement localisée antérieurement dans le rhombencéphale, à l'exception des gènes « engrailed-related » En-1 et En-2, qui s'expriment dans la jonction de mésencéphale et métencéphale. Néanmoins, le Quox1 s'exprime dans une région beaucoup plus rostrale du SNC, y compris le télencéphale. Il est évident que, jusqu'à maintenant, Quox1 est le premier gène à homéoboîte décrit chez les Vertébrés, qui s'exprime dans le SNC entier au cours du développement.

RECHERCHES SUR LE DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

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 rendues tolérantes 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 ?

Notre modèle de greffes embryonnaires est original en ce qu'il permet d'introduire dans l'embryon des tissus étrangers avant que le système immuni-

taire de l'hôte n'ait commencé à se développer. D'autre part, l'embryon d'oiseau étant accessible à l'expérimentation pendant toute la durée de l'embryogenèse, nous avons pu mettre au point des méthodes microchirurgicales permettant de manipuler d'une manière contrôlée les différents types de cellules du système immunitaire ainsi que l'environnement dans lequel elles se développent.

Les résultats obtenus chez les Oiseaux ont été étendus aux Mammifères. Nous avons développé un modèle basé sur l'utilisation de souris nude dont on reconstitue la fonction immunitaire T dépendante en leur greffant à la naissance l'ébauche thymique épithéliale non encore colonisée par des cellules hématopoïétiques contenue dans la 3^e poche branchiale d'embryon de souris à E10.

Seuls les résultats nouveaux obtenus en 1990-1991 sont mentionnés ci-dessous.

1. MISE EN ÉVIDENCE DE MÉCANISMES PÉRIPHÉRIQUES POUR L'INDUCTION DE LA TOLÉRANCE TISSULAIRE CHEZ LES OISEAUX

1.1. Greffe d'aile poulet → poulet à E4

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

Le bourgeon alaire d'un embryon de poulet de souche CC ou CB (haplotype du CMH, B4 ou B12) est greffé *in situ* chez un embryon de poulet issu du croisement F1 entre poulets WB et M (haplotypes B15 et B21). Les opérations sont réalisées à E4.

Contrairement aux résultats obtenus lorsque le bourgeon d'aile de caille est greffé chez le poulet, 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. De plus, ces chimères ont accepté la peau greffée ayant le même haplotype que l'aile greffée, mais ont rejeté la peau d'un haplotype différent. La peau du même haplotype que l'aile tolérée pendant 3 ou 4 mois a été prélevée et greffée chez un F1 naïf et a subi alors un rejet rapide montrant qu'elle n'avait pas perdu son immunogénicité.

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. Des conclusions

similaires ont été récemment tirées d'expériences réalisées chez des souris transgéniques. Les nouveaux modèles expérimentaux constitués par les chimères aviaires et les souris transgéniques amènent à reconsidérer les théories qui ont prévalu jusqu'ici sur les mécanismes de l'induction de la tolérance vis-à-vis du soi.

1.2. *Transplantation du bourgeon d'aile de poulet à la caille à E4*

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

Ces expériences, réalisées à E4 comme précédemment, ont fourni des résultats surprenants.

Douze chimères d'aile poulet → caille ont été ainsi construites. L'aile de poulet se développe normalement chez la caille et dépasse de beaucoup la taille de l'aile contralatérale normale du receveur. L'aile de poulet dans cette situation est fondamentalement tolérée bien que dans certains cas des signes plus ou moins importants d'inflammation cutanée soient visibles d'une manière transitoire sur l'aile greffée. Par conséquent, le résultat de la greffe d'aile poulet → caille diffère totalement de celui de la greffe inverse qui aboutit dans tous les cas à la destruction totale et rapide du greffon.

Une étude immunohistochimique des chimères poulet → caille a été possible grâce au marqueur nucléaire des cellules de caille. Elle a montré que, comme on pouvait s'y attendre, tous les tissus de l'aile greffée dérivent du poulet avec cependant une contribution de l'hôte à l'innervation (nerf et cellules de Schwann) et à la vascularisation (endothélium vasculaire) du membre de poulet.

Dans deux chimères, dont la greffe provenait d'un poulet de CMH connu, la prolifération des lymphocytes T du receveur après stimulation par des cellules sanguines du type du donneur en MLR s'est révélée identique à celle obtenue lorsque les cellules stimulatrices appartiennent à une 3^e souche. Ces chimères ne sont donc pas tolérantes selon les critères basés sur ce test. Cependant, la tolérance tissulaire spécifique a été confirmée par des greffes de peau de poulet de même type que l'aile greffée. Celles-ci sont tolérées d'une manière définitive alors qu'une greffe de peau provenant d'un autre poulet ou d'une autre caille est immédiatement rejetée par les chimères. Ces expériences montrent donc qu'une tolérance tissulaire peut être acquise par la greffe chez l'embryon d'une ébauche autre que celle du thymus, suggérant une fois encore l'existence d'un mécanisme périphérique d'induction de la tolérance.

Afin de comprendre pourquoi l'évolution des greffes xénogéniques est différente dans la combinaison poulet → caille de celle de la combinaison réciproque, nous nous proposons de rechercher si la taille du greffon intervient dans ce phénomène.