

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 la segmentation chez les Vertébrés. Ces leçons ont été données au Collège de France.

La seconde partie de mon enseignement a été délivrée à la Villa de Vélazquez à Madrid. Elle a porté sur la signification des chimères embryonnaires dans les recherches sur le développement du système nerveux et du système immunitaire.

LA SEGMENTATION CHEZ LES VERTÉBRÉS

« The phenomenon of repetition of parts, generally occurring in such a way as to form Symmetry or Pattern, comes near to being a universal character of the bodies of living things. »

Williams Bateson

« Segmentation.....reaches its highest development in the Vertebrates, the Annelides and the Arthropods. It appears as.....a repetition of elements belonging to most of the chief systems of organs along an axis which corresponds to the long axis of the body »

Williams Bateson

in Materials for the study of variation, 1894

Aperçu historique :

Choisir pour sujet d'un cours au Collège de France, la segmentation chez les Vertébrés, il y a seulement six ou sept ans, aurait paru surprenant. On sait que les Vertébrés ont des structures segmentaires, les os qui, presque sembla-

bles entre eux, se répètent le long de la colonne vertébrale et les ganglions spinaux et sympathiques situés de part et d'autre de la moelle épinière, mais cela a été établi depuis bien longtemps. Certes les mécanismes de la segmentation primitive du mésoderme paraxial en somites (ou provertèbres) chez l'embryon demeurent mal compris bien que des recherches actives aient été menées, pendant les années 50, pour tenter d'élucider comment se forment les somites et comment ils évoluent ensuite pour fournir le cartilage vertébral et les muscles associés au squelette axial (e.g. : Fraser, Spratt, Strudel et d'autres). Mais on peut dire que le problème de la segmentation n'était certainement pas au centre des préoccupations des Embryologistes. Ceux-ci étaient beaucoup plus intéressés pendant les décennies 60, 70 et 80 par les problèmes de la différenciation cellulaire et du rôle que les communications entre les cellules jouent dans ce processus. Ces questions continuent à faire l'objet de recherches actives certes, mais on a assisté au cours de ces six-sept dernières années à une extraordinaire résurgence de l'intérêt des chercheurs pour les mécanismes de la morphogenèse et notamment pour celui de la segmentation.

Ceci tient à la découverte des gènes de développement chez la *Drosophile* et à leurs équivalents chez les Vertébrés. Nous assistons en fait à une troisième période d'intérêt vis-à-vis du problème de l'organisation métamérique en unités répétitives des métazoaires. Avant le XIX^e siècle, la reconnaissance des segments chez les animaux était superficielle et basée sur les appendices qu'ils portent. Ainsi on classait les insectes d'après le nombre de paires d'ailes et de pattes qu'ils possèdent.

Les structures segmentaires (vertèbres ou côtes) des Vertébrés bien que reconnues et représentées graphiquement étaient considérées au même titre que d'autres organes sans que leur caractère répétitif soit considéré comme significatif en soi.

C'est au XIX^e siècle, pendant l'époque de la Nature Philosophie en Allemagne et de l'Anatomie Philosophique en France, que la reconnaissance de l'organisation segmentaire du corps a été réalisée pour la première fois. Au début du XIX^e siècle (1810), Goethe introduisait le terme de morphologie et proposait (1791), un peu avant Oken (1807), la « Théorie vertébrale du crâne » selon laquelle le crâne des Vertébrés est en fait une vertèbre géante transformée. Cette idée était formulée comme suit par Oken : « Le squelette est simplement une vertèbre répétée plusieurs fois ». Oken souligne que, si on exclut les os de la face et ceux qui n'ont pas de rapport avec la base du crâne comme le frontal, le pariétal, l'éthmoïde et le temporal, il reste une colonne osseuse où on peut reconnaître le corps de trois vertèbres avec leurs apophyses. »

La théorie vertébrale du crâne a été contestée vigoureusement par Huxley (1858). Mais la même tendance unificatrice conduisait l'anatomiste français

Audouin à proposer une théorie semblable pour les Insectes où la tête de l'Insecte correspond selon lui à trois segments du corps modifiés.

A partir du milieu du XIX^e siècle, c'est-à-dire au début de l'époque moderne, les conceptions changent. On s'interroge sur les mécanismes de la morphogenèse et des fonctions physiologiques plus qu'aux débats sur la Philosophie Anatomique.

La deuxième période d'intérêt pour la métamérisation des organismes correspond à la fin du XIX^e siècle. Les meilleurs représentants de ce mouvement sont les Méristes anglais.

Deux ouvrages fondamentaux sont parus vers la fin du XIX^e siècle : William Bateson « *Materials for the study of variation* » (1894) and E.R. Lankester « *The structure and classification of Arthropoda* » (1904).

En 1916, le sujet était suffisamment important pour constituer une partie essentielle du livre de Russell « *Form and Function* » consacré à l'histoire de la morphologie animale.

Ces travaux où le raisonnement *a priori* est remplacé par l'analyse de développement des structures ont une importance décisive dans l'évolution de la discipline. C'est le début de l'Embryologie avec von Baer, puis Vogt, Rathke et beaucoup d'autres, tel Owen qui propose un archétype des Vertébrés dans lequel on peut voir que le crâne est constitué de trois vertèbres.

En fait, la théorie vertébrale du crâne n'était pas totalement dénuée de fondement. On sait aujourd'hui que, si une grande partie du crâne n'a rien à voir avec les vertèbres puisqu'elle s'est développée, non pas à partir du mésoderme paraxial, mais à partir de la crête neurale, il n'en reste pas moins que la base du crâne est formée par la coalescence de plusieurs somites et donc de vertèbres modifiées et fusionnées. On peut provoquer par transgénose chez les souris des mutations par « gain de fonction » qui font apparaître une vertèbre antérieure surnuméraire (proatlas) qui en quelque sorte se détache du crâne.

Le mésoderme paraxial qui est dans le tronc à l'origine des somites existe aussi au niveau de la tête mais n'est pas segmenté d'une manière aussi évidente que dans la région troncale. Cependant, certains ont voulu y voir une segmentation. C'est le cas de Balfour qui, en 1877, a décrit une segmentation du mésoderme céphalique chez les Poissons. Cette notion a été reprise récemment par Meier (1970) qui a décrit les « somitomères » chez les Vertébrés supérieurs.

C'est à la fin du XIX^e siècle que Orr (1887) décrit la segmentation du cerveau postérieur. Ceci amènera Goodrich (1930) à proposer que le cerveau et la moelle épinière sont divisés en neuromères correspondant exactement aux somites (au niveau de la tête il s'agit de somites putatifs) et aux arcs

branchiaux. Les nerfs et ganglions périphériques et crâniens distribués métamériquement étaient considérés comme faisant partie d'un segment. On considérait que dans la tête les métamères primitifs étaient transformés par un processus de céphalisation des segments antérieurs.

Les études de génétique moléculaire du développement chez la *Drosophile*, qui caractérisent le mieux la résurgence de l'intérêt actuel porté à la segmentation, dérivent d'une tradition étroitement associée aux travaux des Méristes anglais, ce qui n'est pas étranger au développement très brillant de ces recherches en Angleterre.

Le problème des Biologistes du Développement aujourd'hui concerne essentiellement les processus génétiques et moléculaires qui sous-tendent le phénomène de segmentation. Il est intéressant de constater que certains des biologistes du tournant du siècle possédaient déjà une vision profonde des problèmes fondamentaux de la biologie. La révélation récente que les mêmes principes de base et qui plus est dans certains cas les mêmes gènes (ou des gènes de structures voisines) contrôlent la segmentation chez les Arthropodes et les Vertébrés justifient les considérations évolutives établies à partir d'observations essentiellement morphologiques et selon lesquelles Arthropodes et Vertébrés dérivent d'une forme commune alors que les animaux non segmentés correspondent à une divergence évolutive plus ancienne.

Bases moléculaires de la segmentation chez la mouche Drosophile :

Les recherches actuelles sur la segmentation chez les Vertébrés doivent leur impetus aux découvertes réalisées chez la *Drosophile*. Il convenait donc de rappeler l'ovogenèse chez les Insectes à œufs méroïstiques et l'accumulation dans l'ovocyte de l'information génétique d'origine maternelle produite sous la forme d'ARNm par les cellules nourricières de l'ovaire. Les phases de la segmentation de l'œuf en blastomères, de la gastrulation puis de la formation des segments chez la *Drosophile* ont été décrites. On peut apporter la preuve qu'aucun plan d'organisation métamérique n'est préformé au moment de la fécondation. La segmentation résulte de l'utilisation de déterminants maternels déposés aux deux pôles de l'œuf au cours de l'ovogenèse. La mise en évidence par C. Nüsslein-Volhart de deux gradients inverses le long de l'axe antéropostérieur des produits des gènes déterminant l'extrémité antérieure (gène *bicoid*) et l'extrémité postérieure (e.g. gène *oskar*) revêt une importance d'autant plus grande qu'elle est la première démonstration expérimentale de l'hypothèse des gradients morphogénétiques formulée par Child il y a plusieurs décennies.

La découverte par Nüsslein-Volhart et Weischaus (1980) de trois classes de gènes gouvernant la division du corps de l'Insecte en segments : gènes *gap*, gènes de « règles paires », gènes de *polarité segmentaire* et ses répercussions

sur l'essor de la Biologie du Développement au cours des années 1980 a été analysée en détail.

Ainsi, la mise en place des différents segments de la mouche, leur polarité antéropostérieure et dorsoventrale ainsi que leur identité (e.g. segments thoraciques 1-2-3 ou abdominaux) sont définies par les produits de gènes du développement activés en cascade selon une séquence spatiotemporelle bien définie.

Un apport fondamental aux recherches sur la génétique moléculaire du développement provient des travaux d'Edward Lewis sur les mutations homéotiques chez la *Drosophile*. Ces mutations font intervenir les gènes régulateurs agissant sur la transcription d'autres gènes au sein des complexes Antennapedia (AntpC) et Bithorax (Bx-C). L'existence d'une séquence de 183 nucléotides commune à tous les gènes homéotiques appelée *homeobox* puis à d'autres gènes régulateurs du développement a ensuite été démontrée (W. Gehring et M. Scott).

De la Drosophile aux Vertébrés :

L'isolement du premier gène à *homeobox* de Vertébré, par homologie de séquence avec l'homéobox du gène Antennapedia de *Drosophile* réalisée par De Robertis, McGinnis et W. Gehring (1983), a été à l'origine de la découverte d'un grand nombre de gènes régulateurs dont le rôle dans le développement est maintenant à l'étude dans de nombreux laboratoires.

Les gènes à *homeobox* des Vertébrés sont pour la plupart distribués en quatre groupes portés par des chromosomes différents. Ainsi chez la souris, les gènes des complexes Hox1, Hox2, Hox3, Hox4 sont portés respectivement par les chromosomes 6, 11, 15 et 2.

A l'intérieur d'un même groupe, ces gènes divergent d'une manière croissante du gène Antp. On suppose qu'au cours de l'évolution des Vertébrés des duplications d'un gène Hox ancestral ont abouti à la multiplication des copies de ce gène. Par tétraploïdisations successives, on a obtenu quatre groupes distincts portés actuellement par quatre chromosomes différents tels qu'on les trouve chez la souris et chez l'homme (Boncinelli). Des comparaisons de séquence indiquent que dans chaque groupe certains gènes sont identiques à ceux d'un autre groupe : ex : Hox 1-1 et Hox 2-3 codent pour des protéines presque semblables. Ces protéines semblables appartenant aux quatre groupes constituent des sous-familles de gènes paralogues. De plus, les deux complexes géniques AntpC et BxC de *Drosophile* peuvent être alignés avec les gènes des groupes Hox en fonction de leurs analogies de séquence.

Comme dans les complexes AntpC et BxC de la *Drosophile*, les différents gènes d'un groupe chez les Vertébrés sont activés au cours du développement selon une séquence spatio-temporelle définie le long de l'axe antéropostérieur

de l'embryon. Les gènes situés en position 3' (amont) sont exprimés d'abord et dans les territoires les plus antérieurs. L'activation successive des gènes en direction 3' → 5' correspond à leur expression dans des territoires de plus en plus postérieurs de l'embryon. Une telle colinéarité permet de penser que les gènes situés en amont conditionnent le fonctionnement de ceux qui sont situés en aval selon un réseau d'interactions complexes qu'on commence à déchiffrer.

La segmentation dans le système nerveux de Vertébrés :

Le fait que le système nerveux des Vertébrés soit segmenté a été proposé par de nombreux anatomistes et embryologistes. Cette segmentation se manifeste par la présence de nerfs et de ganglions distribués par paires le long de la moelle épinière et dont le nombre correspond à celui des somites primitifs. Au niveau de la tête, bien que la métamérisation indiquée par les nerfs crâniens soit moins régulière, elle existe cependant.

On a proposé que la succession des nerfs et des ganglions périphériques correspond à une véritable segmentation du tube neural en neuromères. Chaque neuromère correspond à un somite à partir duquel se forment les muscles (myotomes) qu'il innerve au niveau du tronc et à un arc branchial au niveau céphalique (Cette conception est représentée par le modèle Goodrich).

Dans l'encéphale, Orr (1887) puis Vaage (1969) ont décrit une segmentation surtout visible au niveau du rhombencéphale divisé en rhombomères.

Malgré plusieurs descriptions des neuromères, leur statut comme entité métamérique de développement n'a de loin pas été admise par tout le monde. On a considéré ces constriction comme contingentes en quelque sorte et dues à des phénomènes de pression de la part des tissus avoisinants tels que les somites, ou à une croissance temporairement plus importante dans certaines régions du tube neural.

En fait, on ne peut considérer qu'on a affaire à un vrai métamère que s'il existe des relations de lignage cellulaire entre les cellules qui le composent et notamment si les séparations entre les métamères correspondent à des cloisons à travers lesquelles les cellules ne circulent pas.

Seuls les segments observés dans l'encéphale postérieur au niveau des rhombomères répondent à ces critères (cf. les travaux de Lumsden et de Keynes). Il n'en est rien des neuromères observés sur la future moelle épinière qui ne sont que le résultat des pressions exercées par les tissus avoisinants. De plus, la segmentation du cerveau postérieur a connu un regain d'intérêt lorsqu'on a montré que les limites antérieures d'expression des gènes régulateurs chez la souris correspondent à celles définies par les rhombomères. Tel est le cas du gène *Krox20* (P. Charnay, 1988) et de plusieurs gènes des

groupes Hox1 et Hox2 notamment. La crête neurale, issue du rhombencéphale, présente des zones d'expression des gènes Hox correspondant à leur origine transversale à partir des différents rhombomères suggérant l'existence d'un « code-Hox » susceptible de jouer un rôle dans la spécification de leurs dérivés. Les expériences de mutations provoquées des gènes Hox1-5 et Hox1-6 sont en accord avec une telle interprétation.

La segmentation du mésoderme :

La segmentation du mésoderme paraxial en somites s'effectue nettement dans toute la partie post-otique du corps des Vertébrés. La segmentation du mésoderme paraxial céphalique, au contraire, est peu nette et l'objet de controverses.

La segmentation somitique obéit à des mécanismes mal connus. Les somites se forment à l'extrémité rostrale de la plaque segmentaire selon un gradient rostrocaudal. Le somite se forme d'abord comme une sphère épithéliale. Ensuite il se ségrège en une partie ventromédiane mésenchymateuse, le sclérotome et une partie dorsolatérale, le dermomiotome, dont sont originaires le derme troncal et tous les muscles striés du corps.

Le mésoderme paraxial n'a pas besoin d'être continu pour se segmenter : la formation des somites peut sauter des ablations chirurgicales et se faire au même moment du côté opéré et contralatéral. Donc la « décision » de se segmenter se produit plus tôt et ne nécessite pas de communication cellulaire avec les somites déjà formés.

Les somites sont en fait eux-mêmes l'objet d'une resegmentation selon la fissure de von Ebner qui définit une moitié rostrale et une moitié caudale. Chaque vertèbre est en fait dérivée des moitiés caudale et rostrale de deux somites consécutifs.

La nature du mésenchyme somitique situé de part et d'autre de la fissure de von Ebner est différente. Seule la moitié rostrale du somite permet la croissance des fibres nerveuses issues de la moelle épinière et la migration des cellules des crêtes neurales (Keynes, Stern entre autres). La démonstration selon laquelle la segmentation du système nerveux périphérique et des nerfs spinaux est secondaire à celle du mésoderme somitique a été définitivement apportée dans notre laboratoire par des expériences de greffes entre embryons de caille et de poulet (Teillet, Kalcheim et Le Douarin).

L'intervention de gènes de développement à homeobox dans la spécification des différentes régions de la colonne vertébrale a été discutée en détail. Les résultats obtenus par Kessel et Gruss (1991) sur la modification du « code Hox » par l'acide rétinoïque sont particulièrement significatifs à cet égard et ont été étudiés et discutés. Les mutations par perte de fonction des gènes

Hox1.5 et Hox1-6 provoquées par recombinaisons homologues chez les souris produisent des anomalies au niveau du cerveau postérieur et des dérivés correspondants de la crête neurale. Ces données plaident aussi en faveur d'un rôle essentiel de ces gènes dans la mise en place du plan d'organisation du corps chez les Vertébrés et de sa segmentation primitive.

La deuxième partie de mon enseignement délivré à la Villa de Vélazquez à Madrid a porté sur l'utilisation des chimères embryonnaires aviaires et mammaliennes dans l'étude du développement de la crête neurale, du système nerveux central et du système immunitaire. Elle a comporté trois cours et trois séminaires. On a insisté essentiellement sur les travaux récents sur la tolérance immunologique et le développement du cerveau.

N. L. D.

SEMINAIRES DE LA CHAIRE

1991-1992

A) *Différenciation précoce des lymphocytes B*

P^r Klaus RAJEWSKI de l'Université de Cologne, Genetic analysis of B cell Development.

D^r Michael RETH de l'Université de Fribourg, Antigen receptors on B lymphocyte.»

P^r Antonio COUTINHO (Institut Pasteur), Genetic control of antibody repertory expression and selection.

P^r Fritz MELCHERS du Basel Institute of Immunology, B lymphocyte lineage committed stem cells in the mouse.

D^r Claude-Agnès REYNAUD du Basel Institute of Immunology, Rôle de la bourse de Fabricius dans la formation du répertoire des cellules B.

D^r Jean-Claude WEILL du Basel Institute of Immunology, Un modèle d'équivalent bursique chez les Mammifères.

B) De plus deux professeurs étrangers ont été invités à donner un enseignement au cours de cette année :

Le P^r Lewis WOLPERT, de l'Université de Londres a donné quatre leçons dans le cadre d'une chaire d'Etat :

- Pattern formation in development.
- The evolution of development.

- The unnatural nature of science.
- The social obligation of scientists.

Le P^r Peter GRUSS, de l'Université de Gottingen (Max Planck Institute of Biophysical Chemistry) Allemagne a donné deux leçons sur le thème :

- Molecular mechanisms of axis specification during mammalian embryogenesis.

RÉSUMÉ DE L'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE

NEUROEMBRYOLOGIE

Les résultats nouveaux acquis cette année concernent

- 1) l'étude des potentialités individuelles de différenciation des cellules de crête neurale et de leurs dérivés ;
- 2) la caractérisation moléculaire de la glycoprotéine SMP, marqueur spécifique des cellules de Schwann et son utilisation pour étudier le processus d'individualisation des différents lignages gliaux périphériques ;
- 3) la mise en évidence et l'étude d'une nouvelle glycoprotéine membranaire commune aux systèmes nerveux et immunitaire : BEN ;
- 4) l'étude du développement du cerveau et de la tête grâce la construction de chimères embryonnaires. Etude d'un modèle d'épilepsie photique génétique chez le poulet ;
- 5) la caractérisation de gènes de développement chez les oiseaux et leur utilisation dans l'analyse de l'embryogénèse précoce.

1. ÉTUDE DE LA SÉGRÉGATION DES LIGNÉES CELLULAIRES ISSUES DE LA CRÊTE NEURALE

(E. DUPIN, F. SEXTIER, C. ZILLER et N. M. LE DOUARIN)

Nous avons poursuivi nos travaux sur la ségrégation des lignées cellulaires issues de la crête neurale. Ce travail a été essentiellement réalisé *in vitro* grâce à la mise au point d'une méthode de culture clonale des cellules de la crête neurale alors qu'elles effectuent leur migration et lorsqu'elles se sont agrégées pour former les ganglions du système nerveux périphérique (SNP). La mise au point d'un système de culture utilisant des fibroblastes de souris 3T3 traités par la mitomycine comme couche de cellules nourricières a permis de faire des progrès considérables.

Nous avons ainsi pu démontrer, d'abord sur la crête céphalique puis sur la crête troncale, qu'au cours de la migration la crête neurale est composée de cellules diversement déterminées, certaines n'étant capables de fournir qu'un seul type de dérivé alors que d'autres donnent naissance à des colonies où plusieurs types cellulaires sont présents. Les cellules pluripotentes se sont révélées plus nombreuses que celles qui sont déjà déterminées. Ainsi des précurseurs communs à la glie, aux neurones, aux mélanocytes et même aux dérivés conjonctifs (méssectoderme, pour la crête céphalique uniquement) ont été trouvés. Les cellules capables de fournir des colonies contenant l'ensemble de ces principaux dérivés de la crête neurale peuvent être considérées comme des cellules souches totipotentes analogues à celles dont sont issues les différentes lignées de cellules sanguines. Comme ces dernières, elles sont très rares, la crête neurale en cours de migration étant essentiellement constituée de précurseurs intermédiaires pluripotentiels. Le répertoire des potentialités présentes dans chacun de ces précurseurs est étonnamment varié. Une étude statistique réalisée sur plus de quatre cent colonies amène à considérer que la ségrégation des différentes lignées cellulaires (c'est-à-dire la restriction progressive des capacités de différenciation des cellules issues de la cellule souche totipotente), obéit à un processus aléatoire plutôt qu'elle ne s'effectue selon une séquence définie.

La taille des colonies obtenues, reflétant le pouvoir de prolifération des cellules issues du précurseur mis en culture, est aussi très variable. Certains clones purement neuronaux peuvent être réduits à une ou deux cellules. Au contraire, les clones contenant des cellules gliales, soit seules soit associées à d'autres phénotypes (e.g. neurones, mélanocytes et/ou méssectoderme), sont généralement de grande taille et révèlent ainsi un énorme pouvoir de prolifération des précurseurs correspondants.

Nous avons étendu cette exploration aux cellules de crête neurale ayant déjà atteint leur cible, i.e. l'intestin ou le mésenchyme somitique au sein desquels elles s'agrègent pour former des ganglions du SNP. Les cellules dérivées de la crête neurale et n'exprimant pas le phénotype neuronal ont été ensemencées isolément et se sont révélées capables, dans un nombre de cas significatifs, de former des colonies. Celles-ci cependant sont de plus faible taille que précédemment et les phénotypes qu'elles contiennent moins diversifiés.

2. ÉTUDE DE LA GLIOGÉNÈSE PRÉCOCE : APPROCHES CELLULAIRES, MOLÉCULAIRES ET GÉNIQUES

La découverte au laboratoire de nouveaux marqueurs spécifiques et précoces des cellules gliales, a été à l'origine de plusieurs travaux. Grâce à l'emploi conjoint des techniques de la biologie moléculaire et à l'utilisation du

modèle aviaire, particulièrement approprié pour des études de biologie du développement, ces travaux ont permis la mise en évidence de processus moléculaires et cellulaires intervenant dans la différenciation gliale précoce.

Dans un premier temps, l'immunisation de souris avec des glycoprotéines purifiées de nerfs de caillies adultes a permis de préparer des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes spécifiquement gliaux. Nous avons ainsi caractérisé deux antigènes de surface : l'épitope glucidique 4B3 et la glycoprotéine SMP qui apparaissent précocément et 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 particulièrement approfondi la caractérisation moléculaire de la protéine Schwann cell Myelin Protein (SMP) en isolant le cDNA correspondant et en étudiant certaines de ses caractéristiques moléculaires et fonctionnelles.

L'identification des différents précurseurs à potentialité gliale, présents dans la crête neurale et dans les structures nerveuses embryonnaires, ainsi que l'analyse de la régulation de phénotypes gliaux grâce à des interactions spécifiques avec le microenvironnement nous a conduit à proposer un modèle d'ensemble de la gliogénèse périphérique.

2.1. Identification d'un épitope glucidique caractérisant l'ensemble des glioblastes et des cellules gliales matures

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'embryogénèse 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.

2.2. 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 puisqu'il s'agit du seul critère moléculaire identifié jusqu'à présent permettant de distinguer, dans le système nerveux périphérique, les cellules de Schwann myélinisantes et non-myélinisantes des nerfs des cellules gliales entériques et des cellules satellites des ganglions et ceci depuis un stade très précoce de la gliogénèse périphérique.

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) Caractérisation moléculaire 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)

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 moelle 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 messenger 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 (planche 1).

L'alignement de séquences centrées sur les cystéines démontre d'importantes homologies internes dont la disposition suggère l'existence de 4 domaines globulaires de type immunoglobuline C2 et d'un domaine NH₂-terminal de type immunoglobuline V. 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 carboxy terminaux.

La séquence de la protéine SMP présente plusieurs traits originaux au niveau des domaines cytoplasmique et extracellulaire. Ceux-ci pourraient représenter de nouveaux motifs structuraux dont l'importance fonctionnelle reste à préciser. En effet ils sont présents également dans la séquence de certains autres membres de la superfamille des immunoglobulines, la glycoprotéine MAG mais également les deux antigènes myéloïdes humains CD22 et CD33 qui pourraient ainsi former un sous-groupe structural au sein de la superfamille des Ig.

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.

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.

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, 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.

b) *Etude in vitro de la transdifférenciation des cellules gliales satellites*

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

Le marqueur SMP présente *in vivo* une spécificité remarquable pour l'ensemble des cellules de Schwann à l'exclusion de tout autre type cellulaire glial périphérique et en particulier des cellules gliales satellites qui forment une capsule cellulaire gliale autour du corps cellulaire des neurones ganglionnaires. Cependant lorsque des cellules de ganglions rachidiens sont mises en culture, une très forte sous-population cellulaire est SMP positive après quelques jours. Afin de savoir si ce phénomène était dû à une intense prolifération des cellules de Schwann SMP+ dans nos conditions de culture ou bien à l'apparition du phénotype SMP sur des cellules précédemment SMP- nous avons réalisé une série d'expériences *in vitro* en utilisant les techniques de clonage cellulaire et de microscopie confocale.

Tout d'abord nous avons isolé des doublets de cellules dissociées comprenant un neurone et une cellule satellite enveloppant le corps cellulaire neuro-

nal afin de les mettre en culture sur couche de cellules nourricières 3T3. Aucune des deux cellules gliale ou neuronale mises en culture n'exprime de SMP au temps zéro de la culture. Cependant au bout de quelques jours la totalité des cellules non-neuronales sont SMP positives et se disposent le long des prolongements neuronaux.

En collaboration avec Antoine Triller de l'Institut Pasteur nous avons pu étudier ce phénomène en laissant les cellules de ganglion en culture pendant des temps très brefs avant d'analyser les caractéristiques tridimensionnelles de l'association neurogliale par microscopie confocale. Ceci nous a permis de visualiser l'apparition du phénotype SMP à la surface des cellules satellites alors que celles-ci sont encore en contact étroit avec le corps cellulaire du neurone qu'elles enveloppent de nombreux voiles et prolongements membranaires. Nous avons eu la surprise de constater que la molécule SMP apparaît simultanément sur les surfaces ad- et ab-neuronales de la cellule gliale. Ces résultats suggèrent que la synthèse de la molécule SMP est inhibée dans l'environnement ganglionnaire et que le signal inhibiteur n'est pas synthétisé directement par le corps cellulaire du neurone.

L'ensemble des données obtenues suggère un modèle possible du lignage des cellules gliales périphériques. Nous avons démontré que la crête neurale était un ensemble cellulaire globalement pluripotent constitué de précurseurs à différents stades de leur processus de détermination. Nous pensons qu'une restriction progressive des potentialités et en particulier que la ségrégation neuro-gliale s'établissent partiellement en cours de migration. En début de gangliogénèse certaines cellules issues de la crête neurale expriment le phénotype glial 4B3. Par la suite le processus de diversification gliale résulte pour une part importante de l'action de facteurs instructifs locaux. Nous avons vu que le mésenchyme intestinal synthétise l'un de ces facteurs dont le support moléculaire reste à identifier. La différenciation des cellules satellites SMP- au niveau du corps cellulaire du neurone alors que les cellules de Schwann le long des axones sont SMP+ illustre le caractère très localisé de la synthèse des facteurs contrôlant la différenciation gliale.

3. IDENTIFICATION D'UNE NOUVELLE GLYCOPROTÉINE (BEN) LIÉE À L'ÉTABLISSEMENT DES SYNAPSES NEUROMUSCULAIRES

Nous avons identifié une nouvelle protéine dont l'expression est liée à la mise en place du réseau neuronal périphérique et qui est notamment portée de manière transitoire par les motoneurones. Elle semble jouer un rôle dans l'établissement de la jonction neuromusculaire. Cette protéine dont nous venons d'achever le clonage appartient à la superfamille des immunoglobulines.

3.1 *Mise en évidence et distribution de l'antigène BEN*

a) *Fabrication d'anticorps monoclonaux*

O. POURQUIÉ, M. COLTEY et N.M. LE DOUARIN

Afin de tenter d'identifier des protéines impliquées dans la différenciation des lymphocytes B dans la bourse de Fabricius de l'oiseau, nous avons fabriqué des anticorps monoclonaux en immunisant des souris Balb/C par greffe intrasplénique d'épithélium bursique. L'un des anticorps ainsi obtenu reconnaît un déterminant présent à la surface de l'épithélium de la bourse de Fabricius ainsi que sur certaines sous-populations de neurones. Cet épitope apparaît en Western blot être porté par une protéine de 95-100 kd commune au système nerveux et au système immunitaire que nous avons appelée BEN (Bursal Epithelium Nerves).

b) *Etude immunohistochimique : BEN est exprimé par les neurones projetant en périphérie et par des sous-populations de cellules hématopoïétiques*

O. POURQUIÉ, M. HALLONET, C. CORBEL, P. VAIGOT, M. COLTEY et N.M. LE DOUARIN

Nous avons conduit une étude ontogénétique par immunocytochimie de la distribution de cet antigène. Il ressort de cette étude que l'anticorps BEN reconnaît quatre catégories de cellules : neuronales, hématopoïétiques, épithéliales et préchondrogéniques. Il ressort de plus que cet épitope n'est porté que par certaines sous-populations de ces cellules et n'est exprimé qu'au cours des phases précoces de leur développement. Nous avons entrepris d'étudier plus précisément la distribution de cet antigène au cours du développement du système nerveux et du système hématopoïétique de l'embryon de poulet.

Expression de BEN sur les neurones projetant en périphérie au cours du développement :

Cette étude a été conduite sur des embryons jusqu'à E10. Il en ressort que BEN est présent de manière transitoire sur les motoneurones, sur les neurones sensoriels des ganglions spinaux et crâniens et les ganglions sympathiques et entériques. L'expression est associée à la phase d'axonogénèse de ces neurones. La protéine BEN disparaît du corps cellulaire et de l'axone en même temps que s'effectue la synaptogénèse. Elle se maintient cependant au niveau de la synapse neuromusculaire.

Dans le cervelet : BEN est spécifique des fibres grimpantes :

Nous avons étudié plus particulièrement l'expression de cet antigène au niveau du cervelet. Il apparaît que dans cet organe, les cellules du cortex et des noyaux profonds sont négatives alors qu'une population de fibres est immunoréactive. Nous avons utilisé un système de greffe isotopique et iso-

chronique de mésencéphale et de métencéphale antérieur de caille sur du poulet afin de construire un cervelet entièrement composé de cellules de caille alors que l'olive inférieure, source des fibres grimpantes est composée de neurones de poulet. En utilisant un système de double marquage, faisant intervenir l'anticorps monoclonal anti-BEN ainsi qu'un anticorps spécifique des fibres nerveuses de poulet, nous avons pu démontrer l'origine extrinsèque des fibres exprimant la protéine BEN, ainsi que leur pénétration extrêmement précoce dans le cervelet. D'autre part, la spécificité du marquage immunocytochimique observé au cours de l'ontogénèse du cervelet semble indiquer que cette protéine est portée de manière très spécifique par les fibres grimpantes. Comme pour les neurones projetant en périphérie, cette protéine n'est exprimée que pendant la phase de colonisation du cervelet par les axones de ces neurones.

BEN est exprimé dans le système immunitaire par des progéniteurs hématopoïétiques ainsi que par les cellules de la lignée T immature ou après activation :

Nous avons démontré qu'au cours du développement du système immunitaire, BEN était présent à la surface des cellules de la lignée T immatures ou après activation ainsi que par certains progéniteurs hématopoïétiques (Corbel *et al.*, 1991). Par contre aucune expression n'a été détectée au niveau des cellules B et des lymphocytes matures. Dans le système hématopoïétique, des expériences de tri cellulaire suivies de cultures clonales ont permis de montrer que BEN est exprimé à la surface de progéniteurs myéloïdes et érythroïdes dans la moelle osseuse. Par contre aucune expression n'a pu être mise en évidence sur les progéniteurs les plus immatures de la région aortique. Par conséquent, comme dans le système nerveux, BEN est exprimé pendant une phase de la différenciation de certaines sous-populations hématopoïétiques.

2.2. Caractérisation moléculaire de l'antigène BEN

Une analyse biochimique par Western blot a permis de montrer que l'anticorps reconnaît une forme de 95 kd dans le système nerveux et une forme de 100-110 kd sur l'épithélium de la bourse de Fabricius. L'épitope reconnu par l'antigène disparaît en conditions réductrices d'électrophorèse indiquant que l'épitope reconnu est vraisemblablement de nature conformationnelle. Nous avons entrepris de développer une stratégie de purification de cette protéine afin d'en élucider la structure. La protéine purifiée a été caractérisée avec différentes approches.

a) Données structurales :

Les données obtenues à partir de protéine purifiée à partir de différents tissus montrent que :

— Le taux de glycosilation est d'environ 25 %.

— La protéine glycosylée est reconnue par l'anticorps BEN, ce qui confirme la nature protéique de l'épitope reconnu.

— L'hétérogénéité des formes moléculaires observées entre différents organes semble être attribuable à une glycosylation différentielle.

— La protéine extraite du système nerveux embryonnaire ainsi que du thymus porte l'épitope HNK-1 caractéristique des molécules d'adhésion.

b) *Clonage du gène codant pour la protéine BEN*

Trois clones d'ADN complémentaire ont été isolés d'une banque de bourse de Fabricius de 16 jours embryonnaires. L'analyse de la séquence du plus grand de ces clones (3,5 kilobases) montre qu'il contient une phase de lecture ouverte codant pour une protéine de 600 acides aminés ainsi qu'une extrémité polyA. L'analyse de la structure de la protéine codée par ce cDNA révèle que BEN est une molécule de la superfamille des immunoglobulines originale possédant une structure typique de protéine membranaire dotée d'une séquence signal hydrophobe, de 5 domaines de type immunoglobulinique dont deux domaines de type variable suivis de trois domaines de type constant, d'une région transmembranaire très hydrophobe ainsi que d'une région intracytoplasmique.

4. ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT DU CERVEAU ET DE LA MOELLE ÉPINIÈRE PAR LA MÉTHODE DES CHIMÈRES EMBRYONNAIRES HOMO- ET HÉTÉRO-SPÉCIFIQUES

Nous avons entrepris une étude systématique de la neurogénèse et plus largement de la céphalogénèse basée sur la construction de chimères. Un de nos projets majeurs est de suivre l'évolution spatiotemporelle des différents territoires de l'ébauche neurale depuis le stade de la neurulation (stade du prolongement céphalique) jusqu'à la réalisation du cerveau de l'adulte. L'ontogénèse du cervelet a été déjà bien étudiée notamment chez les mammifères. La méthode des chimères a cependant permis d'apporter des données nouvelles quant au territoire présomptif dont il dérive dans l'ébauche neurale primitive.

Nous avons également poursuivi nos recherches sur les transferts de caractères comportementaux et en particulier nous avons entrepris d'étudier la localisation cérébrale d'une maladie génétique du système nerveux : l'épilepsie photique du poulet.

Des résultats ont aussi été obtenus concernant la carte des territoires présomptifs de l'encéphale, la participation de la crête neurale et du mésoderme préchordal et para-axial à la construction de la tête des Vertébrés supérieurs dont notre ambition est de fournir une vue globale. Celle-ci est destinée à documenter un domaine de l'Embryologie qui est resté très incom-

plet et dont l'intérêt pour la médecine est évident. De plus, elle pourra être utile à l'interprétation des résultats essentiels qui ne manqueront pas d'être obtenus grâce à l'étude moléculaire et génétique des mécanismes du développement entreprise dans de nombreux laboratoires.

4.1. *Destinée des cellules neuroépithéliales des plaques alaires mes- et métencéphaliques pendant l'ontogénèse du cervelet*

M. HALLONET et N.M. LE DOUARIN

Nous avons utilisé le système de marquage cellulaire caille-poule pour étudier l'origine des différents types de cellules neuronales du cortex cérébelleux au niveau des vésicules embryonnaires mésencéphaliques et métencéphaliques, entre les stades de 11 à 14 paires de somites. Nous avons ainsi pu démontrer que le territoire présomptif du cervelet s'étend, selon l'axe longitudinal, entre la moitié caudale de la vésicule mésencéphalique et la moitié rostrale de la vésicule métencéphalique. Selon l'axe dorsoventral, l'ébauche cérébelleuse provient exclusivement des plaques alaires, c'est-à-dire, les parties latérales du neuroépithélium entre 25 et 120 degrés du plan sagittal.

Cette partie du neuroépithélium engendre aussi d'autres structures cérébrales, par exemple les toits optiques au niveau du mésencéphale. Au niveau étudié et au stade précoce de la neurogénèse choisi pour effectuer nos expériences la ségrégation des cellules participant à la formation de différents réseaux neuronaux n'est donc pas encore établie.

Comme nous l'avons déjà rapporté, la participation mésencéphalique à la formation du cervelet est restreinte à une région en forme de V pénétrant au niveau dorsal médian dans la vésicule métencéphalique entre les stades de E2 et E14. Dans cette région, comme dans le reste du cervelet, la couche granulaire externe et la couche granulaire interne sont d'origine métencéphalique. Les cellules de Purkinje, les neurones de Golgi, les interneurons de la couche moléculaire et les petites cellules associées aux cellules de Purkinje migrent de façon centrifuge depuis l'épithélium ventriculaire. Ainsi, la région rostromédiane du cervelet est bordée par deux couches cellulaires germinatives d'origines différentes : la couche granulaire externe d'origine métencéphalique et l'épithélium ventriculaire d'origine mésencéphalique. Nous avons ainsi pu démontrer que les cellules de Purkinje migrent radialement vers la périphérie de l'ébauche cérébelleuse tandis que les autres types cellulaires neuronaux suivent des migrations à petites composantes tangentielles, i.e. longitudinales et transversales. Cependant, les cellules de la couche granulaire externe suivent d'importantes migrations tangentielles qui ont pu être étudiées avec précision : les cellules d'origine ventrale dans les plaques alaires métencéphaliques se localisent finalement dans la couche granulaire externe latérale et la plus antérieure.

Nos observations selon lesquelles le cervelet dérive des plaques alaires de

deux vésicules embryonnaires consécutives pose le problème de la segmentation du tube nerveux embryonnaire. Le modèle de l'ontogénèse du cervelet utilisé en corrélation avec l'étude de la répartition de l'expression de gènes pendant le développement devrait maintenant permettre d'analyser les mécanismes génétiques régulant la régionalisation précoce du tube nerveux embryonnaire.

4.2. *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.

5. 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.

5.1. Le gène *Quox 7* de la caille : clonage du cDNA expression du gène et sa régulation par des interactions cellulaires

a) 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.

b) *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'ontogénèse 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.

c) *Rôle de Quox7-8 dans l'établissement de la polarité dorso-ventrale de l'embryon de Vertébré*

Y. TAKAHASHI, A.H. MONSORO-BURQ, M. BONTOUX et N.M. LE DOUARIN

L'établissement du plan du corps nécessite la détermination des axes antéro-postérieur et dorso-ventral autour desquels les différents tissus et organes du

corps vont s'organiser durant le développement. Chez les Vertébrés, l'organisation dorso-ventrale du tube neural dépend en grande partie de l'activité polarisatrice de la notochorde et elle se manifeste par l'activité de certains gènes particuliers au cours de l'embryogénèse précoce.

Nous avons démontré que, chez l'embryon d'oiseau de 2 à 6 jours, l'expression de Quox7-8 dans la partie dorsale du tube neural dépend de l'orientation normale du primordium neural et d'interactions entre le tube neural et l'ectoderme. Par ailleurs Quox 8 est exprimé dans le mésenchyme dorsal situé entre le tube neural et l'ectoderme superficiel, région qui donne naissance à l'apophyse épineuse de la vertèbre. L'inhibition expérimentale de l'expression de Quox 8 dans cette zone du mésenchyme dorsal empêche sa différenciation en cartilage vertébral. Nous en concluons que Quox 8 joue un rôle dans le processus de formation des structures vertébrales grâce à une cascade d'interactions cellulaires impliquant le tube neural dorsal et l'ectoderme sus-jacent.

5.2 *Étude de l'expression de Quox 1, un gène à homéoboîte de caille, au cours du développement*

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

a) *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 homéobox, nous avons isolé un plus grand clone de Quox 1 (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 Quox1 démontre que l'ADN génomique de Quox1 compose 2 exons interrompus par un intron qui mesure environ 1.1 kb. L'homéobox est localisé dans le deuxième exon.

b) *Étude 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'embryogénèse. 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 spatial de l'expression 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 détectée 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 périchondrium 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.

IMMUNOLOGIE

Recherches sur les mécanismes de la distinction du soi et du non soi

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 immunitaire 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'embryogénèse, 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.

1. INDUCTION DE LA TOLÉRANCE PAR GREFFE DE TISSU EXTRA-THYMIQUE DE POULET CHEZ LA CAILLE

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

Au cours d'expériences préliminaires nous avons démontré que des ébauches d'ailes transplantées au 4^e jour de la vie embryonnaire entre souches de poulet d'haplotypes différents sont tolérées pendant toute la vie de l'animal suggérant l'existence de mécanismes périphériques extrathymiques d'induction de la tolérance au soi. Si la même expérience est réalisée en utilisant la caille comme donneur et le poulet comme receveur de l'ébauche d'aile, la greffe est rejetée dans les deux semaines suivant l'éclosion. Ainsi l'induction périphérique de la tolérance semblait n'être obtenue qu'en situation allogénique et non xénogénique. Des constructions de chimères d'aile poulet → caille, réalisées à E4 ont fourni des résultats surprenants.

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.

2. TOLÉRANCE ET CHIMÈRES EMBRYONNAIRES CHEZ LES MAMMIFÈRES. ÉTUDE DU RÔLE ÉVENTUEL DE L'ÉPITHÉLIUM THYMIQUE DANS LA TOLÉRANCE AUX ANTIGÈNES DU MLS

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

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.

On sait que l'expression de l'antigène Mls1^a entraîne l'élimination de certains clones de lymphocytes T : ceux exprimant les segments variables V β 6 et

V β 8.1 des gènes du TCR. Notre système offre la possibilité d'étudier l'implication de l'épithélium thymique dans ce phénomène.

Nous avons ainsi reconstitué des souris BALB/c (H-2^d, Mls1^b) par la greffe d'ébauches thymiques de souche DBA2 (H-2^d, Mls 1^a). L'analyse du répertoire des lymphocytes T de ces animaux montre qu'il n'y a pas d'élimination des clones TVb6 et 8.1. De plus, la réactivité anti Mls 1a étudiée *in vivo* et *in vitro*, n'est pas abolie.

L'épithélium thymique n'intervient donc pas dans l'élimination des clones réactifs aux antigènes du Mls. Il induit cependant une tolérance définitive des greffes tissulaires en situation totalement allogénique.

L'ORIGINE EMBRYONNAIRE DE LA LIGNÉE GERMINALE DES OISEAUX : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE CHEZ L'EMBRYON DE POULET

D. CUMINGE et R. DUBOIS

Cette question fait encore l'objet de controverses liées à l'existence de phénomènes de régulation des déficiences qui se produisent lorsque le développement de très jeunes blastoderms est perturbé par de sévères agressions expérimentales. La thèse classique postule l'origine des Initiales Germinales (IG) dans le feuillet inférieur du germe diblastique (origine extra-embryonnaire) ; des conceptions plus récentes localisent les IG dans le feuillet supérieur (épiblaste à potentialités embryonnaires) au même stade.

Dans notre étude nous mettons en œuvre une technique qui permet d'exclure la production de phénomènes de régulation. Dans ces conditions l'exploitation des données recueillies dans un échantillon de 117 blastoderms a permis de déterminer les équations de régression qui décrivent les variations, en fonction du temps d'incubation, du nombre d'IG identifiées dans le feuillet supérieur (= IG_s) et dans le feuillet inférieur (= IG_i). On a établi :

$$IG_s + 2,25 t - 74 = 0$$

$$IG_i + 3\,027 t + 21 = 0, \text{ avec } t \text{ en heures}$$

Dans le contexte statistique défini par notre matériel d'étude ces équations sont en bon accord quantitatif, cinétique et chronologique avec l'existence d'une relation causale qui désigne les IG_s comme précurseurs exclusifs et directs des IG_i. Nos observations et mesures confirment donc à quelques nuances près et en levant certaines objections, la validité des résultats publiés par M. Ginsburg et H. Eyal-Giladi (1986). Toutefois l'analyse des données invite à adopter une interprétation sensiblement différente de celle proposée par ces auteurs.

Les descriptions faites chez le Poulet ne permettent pas d'apporter une réponse univoque au problème de l'origine embryonnaire ou extra-embryonnaire des IG. Cela tient au fait que le feuillet supérieur, abusivement qualifié d'épiblaste, représente en réalité l'équivalent embryogène de l'unique feuillet originel et qu'il recèle, — exprimées ou cachées —, les composantes embryonnaires, extra-embryonnaires et la lignée germinale elle-même.

Le cadre embryologique dans lequel nos résultats ont été obtenus conduit à développer des arguments en faveur d'une thèse qui attribue aux lignées germinale et extra-embryonnaire une communauté d'origine avec, comme conséquence, une étroite association de leurs comportements et de leurs destins au cours des premières étapes de la gastrulation. La situation décrite chez les Oiseaux est donc fondamentalement différente de celle rencontrée chez les tortues (Cistude d'Europe) où la totalité des IG est localisée, au stade de la jeune gastrula, dans le territoire ectoblastique d'un feuillet supérieur à potentialités exclusivement embryonnaires (cf. Cuminge et Dubois, 1986-1990).

ACTIVITÉS DIVERSES

Nicole LE DOUARIN

Activités d'Enseignement à l'extérieur du Collège de France

Cours dans le cadre du DEA d'Immunologie « *Bases génétiques et moléculaire du système immunitaire normal et pathologique* ». Invitation des P^{rs} Boitard et Bach, Hôpital Necker, 8 novembre.

Cours dans le cadre du DEA dirigé par J.C. Boucaut, 29 novembre 1992.

Cours dans le cadre du DEA « *Physiologie du développement* » université Paris VII, 13 janvier 1992. Invitation du P^r Axel Kahn.

Organisation d'un Symposium :

4-6 décembre, Maison de la Chimie, Paris, Table Ronde « Roussel Uclaf, Institut Scientifique Roussel : « *Cell traffic in Embryology and Immunology* », en collaboration avec D^r Nakache, Inserm Paris, et P^r Weissman, Stanford, Californie.

Distinguished Lectures

1991

— Lecture plénière au Congrès Européen de Biologie du Développement (EDBC), Jérusalem, Israël, 11-16 août.

— Troisième Conférence Jacques Benoît au XX^e Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Genève, septembre.

— Conférence à l'Instituto Gulbenkian de Sciences à Lisbonne, Portugal : « *Trends in Biology at the Dawn of Year 2000* », septembre.

— Conférence au Zoltan Ovary Symposium, New York University of Medicine, New York, novembre.

1992

— « The 16th Lecture Aharon Katzir-Katchalsky on Biological Foundations and Human Behavior », The Weizmann Institute of Science, Rehovot, janvier.

— Plenary Lecture, 97th Annual Meeting of Japanese Association of Anatomists, avril, Japon.

— Lecture « *New insights into the development of the nervous system on the avian model* » dans le cadre des « *Incontri di Biologie Molecolare* » Institut des Sciences, Université de Milan, mai 1992.

— Lecture Plénière, International Society for Developmental Neuroscience, La Grande Motte, juin 1992.

Conférences sur invitation à des colloques, symposiums, congrès

1991

— Chairperson, 15th International Congress of Biochemistry, Jerusalem, 4-8 août.

— Colloque « Médecine et Recherche de la Fondation Ipsen, Paris, septembre.

— Workshop on Cellular and Molecular Cues in Neural Development, International Institute of Genetics and Biophysics, CNR, Capri, septembre.

— Exposé à la 71^e Table Ronde Roussel Uclaf « *Cell Traffic in embryology and immunology* », Décembre.

1992

— Spinal cord plasticity, organisé par l'Association pour la Neuro Psycho Pharmacologie, Paris, mars.

— International Society for Developmental Neuroscience La Grande Motte : « *The use of chimeras in development of the nervous system* », juin.

— Lecture au Aharon Katzir-Katchalsky on Biological Foundations and Human Behavior The Weizmann Institute of Science, Rehovot, 30 janvier.

— Chairperson : 72^e Table Ronde Roussel Uclaf « *transcriptional control of gene expression during development* », mai.

Séminaires

1991

— Séminaire à l'Istituto Internazionale di Genetica e Biofisica, Naples, Invitation du P^r Umberto di Porsio and P^r Defez, octobre.

— Séminaire au Département de Zoologie de l'Université d'Oxford dans le cadre du cours « *Modern techniques in Developmental Biology* ». Invitation des P^r Claudio Stern et Peter Holland

1992

— Séminaire à l'Université de Strasbourg (Laboratoire de Génétique Moléculaire des Eucaryotes. Invitation du Pr. Pierre Chambon, 4 février.

— Séminaire à l'Université de Kyoto, Invitation P^r Takeichi, Japon, 6 avril.

— Séminaire à l'Université de Nagoya, Invitation P^r Kondoh, 7 avril.

— Séminaire à l'Université de Tokyo, Invitation du P^r Tada, 8 avril.

— Séminaire donné à la Clinique de Recherches Histologiques, CSIC de Madrid, Invitation du D^r Flora de Pablo, mai.

— Séminaire au Basel Institute for Immunology, Bâle, Invitation du P^r F. Melchers, 16 juin.

Direction de thèses

— « *Caractérisation d'une nouvelle glycoprotéine d'adhérence de la superfamille des immunoglobulines (BEN) exprimée au cours du développement du système nerveux et du système hématopoïétique* »

Olivier POURQUIÉ : Thèse de doctorat de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon soutenue le 27 avril 1992.

— « *Rôle de l'épithélium thymique dans la restauration de la fonction immunitaire T de la Souris athymique Nude et dans l'induction de la tolérance vis-à-vis du soi* ». Ibrahim KHAZAAL, Thèse de doctorat de l'Université Paris XIII soutenue le 26 juin 1992.

ACTIVITÉS DIVERSES

Catherine DULAC

*Participation à des congrès**Communications orales*

1991

— Journée de Gastroentérologie organisée par l'association française contre les myopathies (AFM), mars.

— FASEB Summer Research Conferences (Copper Mountain Colorado) on GASTROINTESTINAL TRACT, août.

— Journées Nationales de Dermatologie. Interface cliniciens-chercheurs organisée par l'INSERM, novembre.

1992

— Elba International Neuroscience Program. 1992 Workshop and Summer School. Ile d'Elbe, juin.

Présentation de posters

1992

— Société des Neurosciences, 1^{er} Colloque. Strasbourg, mai.

— International Society for Developmental Neuroscience. La Grande Motte, juin.

Auditeur

1991

— Fourth IIGB Meeting on Cellular and Molecular Cues in Neural Development, Capri, septembre.

— Colloque « Médecine et Recherche » de la Fondation IPSEN, Paris, septembre.

— 71^e Table Ronde Roussel Uclaf « cell traffic in embryology and immunology », décembre.

*Séminaires**1991*

- Collège de France, avril, invitation Y. Netter.
- Montreal General Hospital, Canada, invitation prof., juillet.
- Mount-Sinaï Hospital, Toronto, Canada, invitation professeur J. Roder, juillet.
- Stanford University, Californie, invitation prof. Helen Blau, août
- Salk Institute San Diego, Californie, invitation G. Lemke, août.
- University of California, Irvine, invitation Marianne Bronner-Fraser, août.
- Hôpital Kremlin-Bicêtre, invitation prof. Baulieu, septembre.
- Hôpital Cochin, invitation Prof. Axel Kahn, octobre

1992

- Hôpital Cochin, invitation professeur Guere, février.

Stages de recherche, collaborations :

- Juillet 1991 : collaboration avec le P^r Roder, Mount-Sinaï Hospital (Toronto, Canada).

Encadrement de recherche

- Depuis septembre 1990 : encadrement d'une étudiante de thèse, Anne Grapin.
- Mai 1992 : encadrement d'une stagiaire du Magistère de Biologie : Estelle Ersinger.

*Activités d'enseignement**1991*

- Enseignement à la préparation à l'agrégation de Sciences Naturelles de l'Ecole Normale Supérieure.
- Enseignement à la préparation à l'agrégation de Biochimie Génie Biologique de l'Ecole Normale Supérieure Technique de Cachan.
- Travaux dirigés de Physiologie « développement du système nerveux » (P^r P. Ascher)

1992

— Organisation d'une journée « Neurogénèse » et cours au DEA « physiologie du développement ». Université de Paris 7, invitation Axel Kahn, janvier.

— Enseignement à la préparation à l'agrégation de Sciences Naturelles de l'Ecole Normale Supérieure.

— Enseignement à la préparation à l'agrégation de Biochimie Génie Biologique de l'Ecole Normale Supérieure Technique de Cachan.

Travaux dirigés de Physiologie « développement du système nerveux » (P^r P. Ascher).

— Elba International Neuroscience Program. 1992 Workshop and Summer School. Ile d'Elbe, juin.

LISTE DES PUBLICATIONS

Développement du système nerveux

1991

AYER-LE LIÈVRE C., STÄHLBOM P.A. and SARA V.R. (1991), Expression of IGF-I and II-mRNA in the brain and craniofacial region of the rat fetus. *Development*, 111, 105-115.

BARAFFIO A., DUPIN E. and LE DOUARIN N.M. (1991), Common precursors for neural and mesectodermal derivatives in the cephalic neural crest. *Development*, 112, 301-305.

CAMERON-CURRY P., DULAC C. and LE DOUARIN N.M. (1991), A monoclonal antibody defining a carbohydrate epitope restricted to glial cells. *European J. of Neuroscience*, 3, 126-139.

DULAC, C., CAMERON-CURRY P., POURQUIÉ O. and LE DOUARIN N.M. (1991), New molecular insights on the development of the peripheral nervous system. (Third Conference of the Institute of Developmental Neurosciences and Aging on plasticity and regeneration of the nervous system, Turin, April 1990). In « Plasticity and Regeneration of the Nervous System », P.S. Timiras *et al.*, Eds., *Plenum Press*, 1991, 1-11.

DULAC C. and LE DOUARIN N.M. (1991), Phenotypic plasticity of Schwann cells and enteric glial cells in response to the microenvironment. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 88, 14, 6358-6362.

LE DOUARIN N.M., DULAC C., DUPIN E. and CAMERON-CURRY P. (1991), Glial cell lineages in the neural crest. *Glia*, 4, 175-184.

LE DOUARIN N.M. and FONTAINE-PÉRUS J. (1991), Embryonic origin of polypeptide hormone producing cells. In « Markers for neural and endocrine cells », M. Gratzl and K. Langley eds., VCH Weinheim, pp. 3-22.

MARTIN-Partido G., CUADROS M.A., MARTIN C., COILTEY P., and NAVASCUES J. (1991), Macrophage-like cells invading the subotic necrotic centres of the avian embryo diencephalon originate from haemopoietic precursors. *J. of Neurocytology*, 20, 962-968.

TAKAHASHI Y., BONTOUX M. and LE DOUARIN N.M. (1991), Epithelio-mesenchymal interactions are critical for Quox-7 expression and membrane bone differentiation in the neural crest derived mandibular mesenchyme. *EMBO J.*, 10, 9, 2387-2393.

TAN K. and LE DOUARIN N.M. (1991), Development of the nuclei and cell migration in the medulla oblongata. *Anat. Embryol.*, 183, 321-343.

TEILLET M.A., NAQUET R., LE GAL LA SALLE G., MERAT P., SCHULER B. and LE DOUARIN N.M. (1991), Transfer of genetic epilepsy by embryonic brain grafts in the chicken. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 88, 6966-6970.

XUE Z.G., GEHRING W.J. and LE DOUARIN N.M. (1991), Quox 1, a quail homeobox gene, expressed in the embryonic central nervous system including the forebrain. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 88, 2427-2431

1992

COULY G., COLTEY P. and LE DOUARIN N.M. (1992), The developmental fate of cephalic mesoderm in quail-chick chimeras. *Development*, 14, 1-15.

DULAC C., TROPAK, M.B., CAMERON-CURRY P., ROSSIER J., MARSHAK D.R., RODER, J. and LE DOUARIN (1992), Molecular characterization of the schwann cell myelin protein, SMP; structural similarities within the immunoglobulin superfamily. *Neuron*, 8, 323-334.

ORDAHL C.P. and LE DOUARIN (1992), Two myogenic lineages within the developing somite. *Development*, 114, 339-353.

POURQUIÉ O., HALLONAT M.E.R. and LE DOUARIN (1992), Ben glycoprotein expression is associated to climbing fibers axonogenesis in the avian cerebellum. *J. Neuroscience*, 12, 1548-1557.

SEXTIER-SAINTE-CLAIRE-DEVILLE, ZILLER C. and LE DOUARIN (1992), Developmental potentialities of cells derived from the truncal neural crest in the clonal cultures. *Dev. Brain Res.*, 66, 1-10.

Soumis ou sous presse

CAMERON-CURRY P., DULAC C. and LE DOUARIN N.M. (1992), *In vitro* phenotypic conversion of ganglionic satellite glial cells as evidenced by expression of the Schwann cell myelin protein (SMP). *EMBO J.* (soumis en août 1992).

CUADROS M.A., MARTIN C., COLTEY P., ALMENDTOS A. and NAVASCUÉS J., First appearance, distribution and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system (mai 92).

DIETERLEN-LIÈVRE F. and LE DOUARIN, N.M. (1992), The use of avian chimeras in developmental biology. In « Manipulation of the avian embryo », edited by Robert Etches and Ann M. Verrinder Gibbins, CRC Press (manuscrit envoyé le 13 novembre 1991).

DIETERLEN-LIÈVRE F. and LE DOUARIN N.M., Quail/chick chimeras : contributions to developmental biology. *Arch. de Biologie* (soumis été 1991).

DIETERLEN-LIÈVRE F. and LE DOUARIN N.M., La morphogenèse (nouvelle version le 17 mai 1991).

LE DOUARIN, N.M., CAMERON-CURRY P. and DULAC C. (1992), Cellular interactions during the ontogeny of neural crest derivatives. *C.R. Acad. Sci.*, 314, série III, n° 9 suppl., 55-58. (Résumé Colloque Acad. Sci./Royal Soc. « Reconnaissance et interactions cellulaires »).

LE DOUARIN N.M. and DULAC C. (1992), Influence of the environment on the development of the enteric nervous system from the neural crest (chapitre à paraître dans livre congrès de Munich, manuscrit envoyé en mai 1992).

LE DOUARIN N.M., DUPIN E., BARAFFIO A. and DULAC C. (1992), New insights into the development of neural crest derivatives. *Int. Rev. Cytol.*, 138, sous presse.

LE DOUARIN N.M. and DUPIN E. (1992), Cell lineage analysis in neural crest ontogeny. *J. Neurobiol.*, sous presse (15 avril 1992).

LE DOUARIN N.M., KALCHEIM C. and TEILLET M.A. (1992), The cellular and molecular basis of early sensory ganglion development. In « Sensory Neurons : Diversity, Development and Plasticity », S.A. Scott Ed., Oxford University Press., pp.

NATAF V. and MONIER S., Effect of insulin-like growth factor-1 on the expression of the catecholaminergic phenotype by neural crest cells. *Dev. Brain Res.* (sous presse).

POURQUIÉ O., CORBEL C., LE CAER J.-P., ROSSIER J. and LE DOUARIN N.M. (1992), BEN, a surface molecule of the immunoglobulin superfamily expressed in a variety of developing systems. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 89, 5261-5265.

PRADOS J., PENA-MELIAN A., RONG P.M. and PUERTA J., Heart parasympathic innervation in the developing chick embryo using a monoclonal antibody HNK-1 like (15H5) and silver staining. *Anat. and Embryol.* (soumis).

RONG P.M., TEILLET M.A., ZILLER C. and LE DOUARIN N.M. (1992), The neural tube/notochord complex is necessary for vertebral but not limb and body wall striated muscle differentiation. *Development*, 115, 667-672.

SMITH J., Neural crest migration and differentiation. In : « Neurofibromatosis », R.A.C. Hughes, ed., Chapman and Hall (sous presse).

TAKAHASHI Y., MONSORO-BURO A.-H., BOUTOUX M. and LE DOUARIN N.M., A role for QUOX 8 in the establishment of the dorsoventral pattern during vertebrate development. *Cell* (soumis le 19 février 1992).

XUE Zhi-Gang, XUE Xiao Jin, FAUQUET M., SMITH J. and LE DOUARIN N.M., Expression of the gene encoding tyrosine hydroxylase in a subpopulation of quail dorsal root ganglion cells cultured in the presence of insulin or chick embryo extract. *Developm. Brain Res.* (soumis le 3 février 1992).

Développement du système immunitaire

1991

CUADROS M.A., MARTIN C., RIOS A., MARTIN-PARTIDO G., and NAVASCUES J. (1991), Macrophages of hemangioblastic lineage invade the lens vesicle-ectoderm interspace during closure and detachment of the avian embryonic lens. *Cell Tiss. Res.*, 266, 117-127.

FEDECKA-BRUNER B., VAIGOT P., DESVEAUX-CHABROL J., GENDREAU M., KROEMER G. and DIETERLEN-LIÈVRE F. (1991), T-lymphocyte subsets in the embryonic spleen undergoing a graft-versus-host reaction. *Developm. Immunol.*, 1, 163-168.

FEDECKA-BRUNER B., VAIGOT P., GENDREAU M. and KROEMER G. (1991), Splenic T-lymphocyte subsets in chicken embryos undergoing graft-versus-host reaction. In « Lymphatic Tissues and in vivo Immune Responses », edited by B A. Imhof, S Berrih-Aknin and S Ezine, Marcel Dekker, Inc., N.Y., Basel, Hong-Kong, pp. 215-219.

FEDECKA-BRUNER B., PENNINGERS J., VAIGOT P., LEHMANN A., MARTINEZ C. and KROEMER G. (1991), Expression of II-2-receptor light chain (CD25) in the chicken embryo. *Developm. Immunol.*, 1, 237-242.

LE DOUARIN N.M. (1991), Studies on the ontogeny of the immune function in birds. In « Mechanisms of lymphocyte activation and immune regulation. III : Developmental biology of lymphocytes ». S. Gupta, W. Paul, M. Cooper and E. Rothenberg Eds., Plenum Press, New York, 1990, pp. 19-30.

MARTIN C., OHKI-HAMAZAKI H., CORBEL C., COLTEY M. and LE DOUARIN N.M. (1991), Successful xenogeneic transplantation in embryos : Induction of tolerance by extrathymic chick tissue grafted into quail. *Developm. Immunol.*, 1, 265-277.

MARTIN-PARTIDO G., CUADROS M.A., MARTIN C., COLTEY P., and NAVASCUES J. (1991), Macrophage-like cells invading the subotic necrotic centres of the avian embryo diencephalon originate from haemopoietic precursors. *J. of Neurocytology*, 20, 962-968.

TUTOIS S., SALAÜN J., MATTEI M.-G. and GUÉNET J.-L. (1991), Tg (9HSA-MYC), a homozygous lethal insertion in the mouse. *Mammalian Genome*, 1, 184-190.

1992

BANDEIRA A., COUTINHO A., BURLLEN-DEFRANOUX O., KHAZAAL I., COLTEY M., JACQUEMART F., LE DOUARIN N.M. and SALAÜN J. (1992), Thymic epithelium induces neither clonal deletion nor anergy to Mls 1a antigens. *Europ. J. Immunol.*, 22, 1397-1404.

CORBEL C., BLUESTEIN H.G., POURQUIÉ O., VAIGOT P. and LE DOUARIN N.M. (1992), An antigen expressed by avian neuronal cells is also expressed by activated T cells. *Cell. Immunol.*, 141, 99-110.

Sous presse ou soumis

CORBEL C., CORMIER F., POURQUIÉ O., BLUESTEIN H. (1992), BEN, a novel surface molecule of the immunoglobulin superfamily on avian hemopoietic progenitor cells shared with neural cells. *Exp. Cell Res.*, (soumis).

CUADROS M.A., MARTIN C., COLTEY P., ALMENDROS A. and NAVASCUÉS J., First appearance, distribution and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system (mai 92).

CUADROS M.A., GARCIA-MARTIN M., MARTIN C. and RIOS A., Hemopoietic phagocytes in the early differentiating avian retina. *J. of Anatomy* (in press).

CUADROS M.A., COLTEY P., NIETO M.C. and MARTIN C. (1992), A phagocytic cell system of hemopoietic lineage and yolk sac origin appears in the avian embryo during morphogenesis. *Development* (sous presse).

DIETERLEN-LIÈVRE F. and LE DOUARIN N.M. (1992), The use of avian chimeras in developmental biology. In « Manipulation of the avian embryo », edited by Robert Etches and Ann M. Verrinder Gibbins, CRC Press (manuscrit envoyé le 13 novembre 1991).

KHAZAAL I., COLTEY M., LE DOUARIN and SALAÜN J., Major histocompatibility complex class II molecules expression in murine thymuses. (En préparation pour *Dev. Immunol.*).

POURQUIÉ O., CORBEL C., LE CAER, J.-P., ROSSIER J. and LE DOUARIN N.M. (1992), BEN, a surface molecule of the immunoglobulin superfamily expressed in a variety of developing systems. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 89, 5261-5265.

SALAÜN J., BANDEIRA A., KHAZAAL I., BURLLEN-DEFRANOUX O., COLTEY M., LE DOUARIN N.M. and COUTINHO A. Thymic epithelium tolerizes to

histocompatibility antigens in the absence of clonal deletion or anergy. (En préparation).

THOMAS-VASLIN V., GAJDOS B., SALAÜN J., LE DOUARIN N.M., COUTINHO A. and BANDEIRA A., Tolerance to allogeneic grafts is tissue-specific. (En préparation).

Cellules germinales

1991

CHRÉTIEN F.C. et DUBOIS R. (1991), Effect of Nomegestrol acetate on spinability, ferning and mesh dimension of midcycle cervical mucus. *Contraception*, 43, 1, 55-65.

1992

DUBOIS R. et CUMINGE D., L'origine embryologique de la lignée germinale des Oiseaux : étude expérimentale chez le Poulet. *Arch. de Biol.* (soumis).