

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 comporte six leçons données au Collège de France sur le sujet suivant « Induction primaire, induction neurale : nouvelles perspectives à propos d'un ancien problème ».

La seconde a été délivrée au University College à Londres dans le département de Biologie du Développement et a comporté trois leçons sur « The Neural Crest - Developmental and Evolutionary Aspects ».

INDUCTION PRIMAIRE, INDUCTION NEURALE : NOUVELLES PERSPECTIVES À PROPOS D'UN ANCIEN PROBLÈME

Le cours de cette année a eu pour but de faire une mise au point de nos connaissances sur l'induction neurale et l'induction primaire c'est-à-dire sur la mise en place du plan d'organisation du corps au cours du développement chez les Vertébrés. Il s'agit d'un problème central en biologie du développement et d'un problème chargé d'histoire qui a suscité un grand enthousiasme suivi d'une période marquée de désaffection et de critiques. Il connaît de nos jours un regain d'intérêt qui s'explique par la mise en œuvre de nouvelles méthodologies.

Le choix de ce thème pour un cours au Collège de France s'imposait en 1992 car on a assisté pendant les cinq dernières années à une explosion de découvertes dans ce domaine. Les vieux travaux des pionniers de l'Embryologie expérimentale ont été exhumés, analysés à nouveau. Ils se révèlent être une source extrêmement féconde d'informations qui sont maintenant soumises à une réinterprétation à la lumière des résultats de la biologie cellulaire et

moléculaire moderne. Il en est ainsi des travaux fameux de Spemann qui lui valurent le Prix Nobel en 1935 et qui aboutirent à la découverte de l'« *organisateur* » mais aussi de ceux de Nieuwkoop qui se présentent comme le point de départ d'une ligne de recherche particulièrement importante : le rôle des facteurs de croissance protéiques (PGF, Proteic Growth Factor) dans l'induction du mésoderme. Une lettre de noblesse est maintenant attribuée aux travaux de Nieuwkoop car, comme on parle de l'« *organisateur de Spemann* », on parle aussi du « *centre de Nieuwkoop* ».

Une partie du premier cours a été consacrée aux travaux anciens, qui ont constitué la base des recherches faites aujourd'hui afin que soit envisagée la naissance du concept d'induction et son évolution au cours du temps.

A la suite des travaux remarquables de von Baer (1796-1876) qui a jeté les bases de l'embryologie moderne en découvrant les feuilletts embryonnaires et en en déterminant le caractère général à travers le monde animal, les débuts de l'étude expérimentale du développement embryonnaire se situent vers la fin du XIX^e siècle et le début du XX^e siècle avec les travaux de Wilhem Roux (1850-1924) sur l'*Entwicklungsmechanik* ou « Mécanique du Développement ». Avec ses expériences sur le développement de blastomères isolés, il a réellement montré la voie d'une approche physiologique et causale des phénomènes qui caractérisent le développement embryonnaire. A partir de là, l'Embryologie cessait d'être un appoint aux recherches sur l'évolution comme à l'époque de Haeckel mais devenait un sujet d'étude en soi, une science indépendante. En cela il fut un continuateur des idées du grand embryologiste Allemand Wilhem His qui contestait les interprétations de Haeckel sur le développement. Le succès de Wilhem Roux est cependant basé essentiellement sur deux idées originales. La première est qu'il a considéré que l'analyse de la causalité d'un phénomène donné nécessite la mise en œuvre d'une expérimentation (Roux, 1885). Il a choisi pour ce faire l'embryon d'Amphibien comme matériel expérimental et fut un des premiers à réaliser des expériences sur l'embryon. La seconde innovation de W. Roux était de nature conceptuelle. Il introduisit les termes d'« auto différenciation » et de « différenciation dépendante » d'une information extérieure.

Ces notions doivent être replacées dans le contexte historique de l'époque. Depuis l'antiquité, deux conceptions opposées du développement s'affrontaient, celles de la préformation et de l'épigenèse. Selon la première, l'organisme futur est préformé dans l'œuf et le développement n'est que le déploiement et la croissance des structures qui y sont déjà présentes. Pour la seconde, l'œuf est largement inorganisé, en tout cas indifférencié avec au plus, dans certains cas, un axe de polarité déjà établi. La forme et les structures complexes de l'individu en gestation s'ébauchent progressivement par le jeu d'interactions entre les différentes parties de l'embryon en développement. Roux réalisa que cette ancienne antithèse pouvait être reformulée comme

suit : la différenciation **autonome** ou **autodifférenciation** est définie comme la capacité des cellules de l'embryon de poursuivre leur développement normal sans qu'une information extrinsèque ne leur soit apportée. La différenciation **dépendante** est celle qui dépend de stimuli extérieurs émanant d'autres régions de l'embryon. Ces deux caractéristiques pouvaient être testées expérimentalement en isolant des régions de l'embryon et en les transplantant dans des sites ectopiques.

Roux lui-même considérait que la différenciation autonome constituait le cas le plus général. Pour tester son hypothèse, il détruisit l'un des blastomères au stade 2 de l'œuf de grenouille et obtint le développement d'un héli-embryon à partir du blastomère restant. Donc, pensa-t-il, l'embryon d'Amphibien est dès le stade 2 une mosaïque de territoires déjà déterminés.

C'est alors que Hans Driesch réussit à séparer les blastomères de l'œuf d'oursin et à montrer que jusqu'au stade 4 chaque cellule issue de la division de l'œuf possède la capacité de fournir une larve entière normalement constituée.

Ainsi les interactions entre les blastomères apparaissent comme inhibitrices puisqu'elles réduisent l'expression des capacités de développement contenues dans chaque cellule. De plus la présence des cellules issues de la division de chacun des blastomères initiaux assigne à chacune d'entre elles un rôle précis dans l'organisation du futur organisme. Tout se passe donc comme si chaque blastomère était informé de sa position au sein du germe et par là même savait quel devait être son devenir. Le contact entre ces différentes cellules est donc pour chacune d'entre elles une source d'information. D'autre part, ces travaux mettaient en évidence la capacité de régulation et de plasticité présente dans la plupart des embryons.

Dans le cas où l'un des blastomères de l'œuf d'oursin est isolé une régulation de ses capacités se produit et il s'organise en un embryon entier. De toute évidence, c'était la présence de la membrane du blastomère détruit qui, dans l'expérience de Roux, empêchait la réorganisation spatiale du matériel cytoplasmique nécessaire à l'initiation du développement normal.

Les expériences de Roux et Driesch (1867-1941) ont donc eu une importance conceptuelle très grande. Elles étaient cependant rudimentaires sur le plan technique et les progrès dans ce domaine dépendaient autant du raffinement des techniques expérimentales que de la capacité de poser les bonnes questions.

Deux embryologistes de la même génération que Driesch (1867-1941), Hans Spemann en Allemagne (1869-1941) et Ross Harrison aux Etats-Unis (1870-1959) ont été à la fois des expérimentateurs de talent et des esprits remarquablement perspicaces. Ils ont été les principaux chefs de file de cette nouvelle science au début de ce siècle. Ils ont chacun, à sa manière, orienté l'embryo-

logie expérimentale dans des voies distinctes : Spemann a développé des recherches sur la détermination précoce des organes au sein de l'organisme en développement et Harrison a créé le domaine de la neurogenèse expérimentale et la méthode de culture de tissus.

On ne peut commencer un cours sur l'induction sans évoquer longuement Hans Spemann et son œuvre puisqu'il a non seulement créé ce domaine de recherche mais aussi jeté les bases des travaux et des progrès considérables qui sont réalisés aujourd'hui.

Spemann emprunta à Hertwig, un autre grand embryologiste de cette époque, le choix d'un autre matériel, l'œuf de salamandre qui est plus favorable à l'expérimentation que l'œuf de grenouille utilisé auparavant et essaya de séparer totalement les 2 premiers blastomères. Dans la majorité des cas, le premier plan de clivage de l'œuf de salamandre correspond au plan frontal et sépare donc le futur embryon en une moitié dorsale et une moitié ventrale. La constriction de l'œuf permet le développement d'un embryon à partir de la seule moitié dorsale et d'une vésicule (belly piece) à partir de la moitié ventrale dans laquelle l'examen histologique montre du sang et parfois des tubules rénaux. Lorsque le premier plan de clivage est perpendiculaire au plan frontal, deux embryons normaux se développent et l'œuf d'Amphibien se comporte alors comme celui de l'oursin.

Ces expériences montrent donc, qu'à ce stade, chaque blastomère a encore la capacité de former un embryon entier mais que l'axe antéropostérieur (AP) et le plan de symétrie bilatérale de l'embryon futur sont déjà fixés. Ceci fut confirmé par des expériences de constriction partielle (réalisées de 1901 à 1904 par Spemann) qui génèrent des tritons à deux têtes.

La détermination de l'axe de polarité AP est en fait établie au cours de l'ovogenèse. Le premier signe en est l'aggrégation des mitochondries dans une zone qui sera celle du dépôt du plasma germinatif. L'axe AP sera celui qui passe par l'aggrégat mitochondrial et le noyau de l'ovocyte. Le plan de symétrie bilatérale est déterminé au moment de la fécondation. Lorsque la pénétration du spermatozoïde a lieu le cytoplasme cortical se concentre au point d'entrée du spermatozoïde. Dans certaines espèces comme *Rana*, une partie du cytoplasme couverte de pigments se trouve privée de pigments à 180° du point d'entrée du spermatozoïde. Ceci entraîne la formation du « croissant gris » décrit par Roux en 1887 puis par AnceI et Vintenberger en 1948. Chez le Xénope, bien qu'il n'y ait pas de croissant gris, la réorganisation du cytoplasme cortical se produit de la même manière. Celle-ci dépend de l'activité de microtubules orientés parallèlement à la direction de la rotation corticale c'est-à-dire selon l'axe AP.

L'« induction » du cristallin :

Parallèlement à ces expériences, Spemann, de 1901 à 1912, a repris le problème posé par Roux de l'autodifférenciation et de la différenciation dépendante d'un stimulus extérieur, dans une série d'expériences sur l'œil et le cristallin.

Le développement normal de l'œil était bien connu à cette époque ; on savait qu'il se forme comme une expansion du cerveau antérieur qui vient au contact de l'épithélium ectodermique à partir duquel se forme le cristallin. On peut donc enlever l'ébauche de l'œil sans léser les cellules qui forment le cristallin.

Spemann détruisit *in situ* la cupule optique à l'aide d'une aiguille chauffée. Il en résulta l'absence de cristallin et la démonstration qu'un stimulus émanant de la cupule optique est responsable de la formation de celui-ci.

De plus, Spemann et, indépendamment l'embryologiste américain Warren Lewis, montraient en 1904 que des cristallins typiques se différencient à partir d'ectoderme de flanc placé au contact de la cupule optique.

Ces expériences ont constitué une étape essentielle vers celle qui a abouti à la découverte de l'organisateur. Bien que le terme d'induction ait déjà été utilisé par Driesch dans un traité théorique en 1894, mais d'une manière vague et mal définie, ni Spemann ni Lewis ne l'ont repris à propos de cette expérience. Il n'est apparu que plus tard dans les années 20 après qu'on lui ait attribué une définition claire : « une activité qui détermine le devenir cytologique des cellules réactives » (Holtfreter et Hamburger, 1955).

La détermination progressive des territoires de l'embryon :

De 1914 à 1919, Spemann entreprit une série importante d'expériences sur la détermination progressive des organes chez l'embryon.

Il décida de transplanter au stade de la gastrula primitive des petits territoires embryonnaires dans différentes régions d'un autre embryon au même stade réalisant ainsi des greffes ortho- ou hétérotopiques. Pour reconnaître le greffon de l'hôte, il mit à profit les différences de pigmentation qui existent dans l'œuf de salamandre *Triturus taeniatus* et qui s'échelonnent du clair au foncé. Ces différences de couleur cependant ne sont pas constantes et ne fournissent qu'un marquage imparfait. Une amélioration a été apportée à cette technique lorsque Spemann a réalisé des transplantations entre deux espèces, l'une pigmentée (*T. taeniatus*), l'autre non pigmentée (*T. cristatus*).

En faisant ces expériences au début de la gastrulation puis plus tard chez la neurula il parvint à la notion de détermination progressive. Avant et après les

premiers stades de la gastrulation, la différenciation du territoire dépend du site de la transplantation. Dans la gastrula âgée, chaque territoire se développe selon son destin normal quel que soit l'endroit où on le place chez l'embryon receveur. Par exemple, la détermination de l'ectoderme dorsal vers un devenir neural devient irréversible quand la plaque neurale fait son apparition.

Ces expériences l'ont amené à greffer la lèvre blastoporale dorsale (LBD) dans la région ventrale d'un autre embryon au même stade. Les expériences de 1919 ont été faites à une petite échelle et trois cas seulement ont été décrits qui montrent la formation d'un tube nerveux et d'une notocorde sur la face ventrale de l'embryon hôte. Faute de pouvoir analyser la contribution du donneur et de l'hôte par manque de marqueur, Spemann considéra que dans la gastrula précoce la LBD est l'endroit à partir duquel commence la détermination de la plaque neurale. La détermination progresse ensuite de l'arrière vers l'avant. Il qualifia alors la LBD de « *centre différenciateur* » et interpréta la progression de la détermination comme un processus transmis d'une cellule ectodermique à l'autre par induction assimilatrice. Le fait que la LBD au début de la gastrulation ne soit en fait pas constituée par de l'ectoderme présomptif mais par du mésoderme lui échappa totalement à cette époque.

Le progrès décisif qui a suivi est dû à l'introduction des greffes hétérospécifiques (1917-1921). Le titre de la lecture inaugurale qu'il a donnée en 1919 : « Production de chimères animales par transplantations embryonnaires entre *Triturus cristatus* et *Triturus taeniatus* » a donc marqué une étape importante dans ses travaux.

L'expérience sur l'organisateur :

L'expérience a été réalisée en 1924 par Spemann et Hilde Mangold qui préparait alors une thèse sous sa direction. Elle représente l'aboutissement de la recherche entreprise par Spemann pendant les 10 ou 15 années qui ont précédé pour comprendre la mise en place des organes axiaux chez l'embryon.

Elle a consisté dans la transplantation hétérotopique et hétérospécifique de la LBD de *T. cristatus* sur la face ventrale de *T. taeniatus*. Le résultat de l'expérience est la formation d'un axe secondaire avec un mélange de tissus de l'hôte et du greffon dont on a pu pour la première fois analyser la contribution respective. Il s'est révélé que la part du greffon de LBD dans les structures de l'embryon secondaire est relativement modeste.

On a alors attribué au transplant de LBD le qualificatif d'« *organisateur* ». En effet, l'explant s'est invaginé complètement dans le blastopore nouvellement formé, une seconde plaque neurale est apparue et lorsque l'hôte a atteint le stade neurula, un deuxième axe embryonnaire complet (avec cependant une tête réduite) existe sur la face initialement ventrale de l'embryon

hôte. Il était clair à l'histologie que la plus grande part de l'embryon néoformé dérivait de l'hôte et que par conséquent la présence du greffon avait modifié le devenir des cellules de l'hôte. L'ectoderme superficiel ventral était devenu un tube neveux. Le mésoderme destiné à devenir du sang avait formé de la notocorde et des somites.

A la suite de cette expérience, Spemann et Otto Mangold imaginèrent une autre méthode pour tester le pouvoir organisateur de la LBD de *T. cristatus* dans le blastocèle de *T. taeniatus* (Einsteck-method). Le greffon introduit dans la cavité blastocélienne vient au contact de la surface interne de l'ectoderme ventral au cours de la gastrulation de l'hôte et induit la formation d'un blastopore et d'un axe secondaire.

L'induction d'un nouvel axe embryonnaire par la LBD a alors été désignée comme étant l'« induction primaire ». Cette notion est importante sur le plan historique car elle implique que le premier événement faisant intervenir des interactions entre cellules embryonnaires capables d'organiser le développement de l'embryon consiste dans l'induction de la plaque neurale à partir du mésoderme contenu dans la lèvre blastoporale dorsale.

L'induction par la « Einsteck method » indiquait que l'induction de la plaque neurale n'était pas assimilatrice (en *cis*) mais s'effectuait par contact (en *trans*) amenant ainsi Spemann à reconsidérer l'interprétation qu'il avait attribuée à ce phénomène au cours de ses premières expériences.

Un peu plus tard, un élève de Spemann, Holtfreter, montra qu'une jeune gastrula soumise à une solution hypertonique n'effectue pas une gastrulation normale : l'endomésoderme ne s'invagine pas dans le blastocèle ; l'ectoderme reste indifférencié faute d'avoir été au contact du mésoderme.

A partir de là, un progrès conceptuel important est acquis : l'organisateur est responsable de l'**induction primaire** qui entraîne la formation de la plaque neurale. Ensuite des inductions **secondaires** apparaissent comme par exemple celles qu'exercent les vésicules optiques sur l'ectoderme et qui sont responsables de la formation du cristallin. Par conséquent la construction de l'organisme s'effectue par une série de réactions en chaîne dans laquelle chaque étape du développement résulte d'un événement antérieur tout en étant nécessaire à l'accomplissement de l'étape suivante. Selon Spemann la première réaction de la chaîne résulte de l'activité de la LBD, c'est-à-dire de la partie médiane du croissant gris : **l'organisateur primaire**.

Pour expliquer les différences régionales existant dans la plaque neurale, Spemann dès cette époque a postulé une structure régionalisée de l'organisateur. Il imagine que les parties de l'organisateur qui s'invaginent d'abord sont inductrices de la tête et ensuite de régions de plus en plus caudales du système nerveux. D'où la notion d'organisateur céphalique et troncal.

Il a testé cette hypothèse en montrant que la LBD d'une jeune gastrula induit des structures neurales antérieures alors que la LBD d'une gastrula plus âgée induit la moelle épinière (recherches réalisées de 1927 à 1928 et publiées en 1931).

La carte des territoires présomptifs de la gastrula :

En 1932, un autre acteur important entre en scène, Walter Vogt. En établissant la carte des territoires présomptifs de la jeune blastula, il éclaire les expériences de Spemann et permet de les interpréter d'une manière plus précise. Vogt applique ponctuellement des colorants vitaux à la surface de la blastula et suit le devenir des blastomères marqués dans l'embryon.

La carte ainsi construite ne donne aucun renseignement sur l'état de détermination des territoires identifiés et délimités. Mais l'observation du déplacement des marques colorées a permis à Vogt de donner la première description du processus de gastrulation et de montrer la convergence des territoires latéraux vers la ligne médiane pour constituer les organes axiaux. Ce faisant, Vogt a élevé les mouvements morphogénétiques au statut de phénomènes importants à étudier en soi. Leur importance dans la morphogénèse est en effet primordiale. Les mécanismes qui les sous-tendent sont encore très incomplètement compris et font l'objet de recherches actives.

Découverte de la nature chimique des inducteurs :

Jusqu'à 1932 la nature de l'effet inducteur a été une énigme. A partir de 1931, un élève de Spemann, Holtfreter a marqué le début d'une approche nouvelle de ce problème. Holtfreter mit au point un milieu de culture permettant d'isoler des fragments d'embryon et d'étudier d'une manière non équivoque leurs capacités de différenciation. On lui doit la fameuse méthode de culture de l'ectoderme et de l'inducteur dite en « *sandwich* » qui a subsisté jusqu'à nos jours et est employée par les chercheurs qui travaillent sur la nature chimique des inducteurs.

A cette époque Bautzmann, Holtfreter et Spemann (1932) montrent que l'organisateur même tué par la chaleur, l'alcool, l'éther, le chloroforme... est capable d'induire une plaque neurale s'il est placé au contact de l'ectoderme. Il est donc de **nature chimique**.

La méthode « *Einsteck* » et celle du sandwich ont permis de tester les capacités inductrices de toutes sortes de tissus ou d'extraits. On découvre alors que des tissus non inducteurs de la gastrula le deviennent lorsqu'ils sont tués ; tel est le cas de l'endoderme et de l'ectoderme. Des tissus de salamandres adultes (cerveau, rétine) traités par l'acétone induisent des plaques neurales. J. Needham et D. Needham à Cambridge ainsi que Waddington obtiennent

des inductions avec des extraits acellulaires de neurula de salamandre (Waddington et al., 1933).

L'induction neurale est généralisée à l'ensemble des vertébrés ; ainsi, chez le Poulet, la ligne primitive coagulée par la chaleur placée sous l'aire opaque induit un axe supplémentaire (Waddington).

Holtfreter teste le pouvoir inducteur de tissus d'animaux provenant de tout le règne animal. Des tissus variés provenant de Cestodes, d'Annélides, d'Insectes, de Poissons, de Reptiles, de Mammifères se révèlent capables d'induire des structures neurales dans l'ectoderme d'Amphibien.

Certains de ces tissus tués produisaient des inductions complexes. Par exemple le foie et le rein de souris ainsi que de l'extrait d'embryon de poulet se révélèrent des inducteurs non pas de tissus nerveux mais de structures mésodermiques (notocorde, muscle, rein, sang) (Holtfreter, 1933).

Ces expériences furent à l'origine d'une ère nouvelle où la biochimie et l'embryologie s'unirent pour découvrir la nature chimique de l'inducteur.

Après la deuxième guerre mondiale, l'embryologie biochimique, située directement dans l'héritage de Spemann, se développa dans différentes parties du monde : notamment en Finlande avec S. Toivonen et L. Saxen à Helsinki, au Japon avec T. Yamada et en Allemagne avec H. Tiedeman pour ne citer que les principaux. Holtfreter continua à être très actif dans ce domaine après avoir émigré aux Etats-Unis.

Il faut souligner que ce qu'on cherchait était un facteur unique, la substance responsable de l'induction primaire, celle qui confère au centre organisateur sa capacité d'induire la formation d'un embryon tout entier. L'activité de recherche a été très intense mais la découverte d'inducteurs hétérogènes a été finalement une déception. On ne voyait aucun dénominateur commun entre les nombreux tissus vivants ou morts ou les extraits acellulaires qui se révélèrent doués d'un pouvoir neuralisant sur l'ectoderme indifférencié et qu'on qualifiait d'évocateurs.

Un coup fatal fut porté à cette voie de recherche lorsqu'en 1936, Waddington, Needham et Brachet montrèrent que l'induction de tissu neural dans l'ectoderme ventral de la gastrula d'Amphibien pouvait être obtenue par du bleu de méthylène, une substance qui n'est pas un constituant naturel de l'embryon et qu'on ne peut considérer comme chimiquement voisine de l'« évocateur » naturel.

Ces chercheurs en arrivèrent alors à penser que cette voie de recherche se heurtait à une impasse technologique et qu'à cette époque aucun progrès décisif ne pouvait être fait dans la découverte de la substance inductrice.

Inducteurs hétérogènes (Holtfreter (1933-1934) :

Ce sont cependant les expériences sur les inducteurs hétérogènes qui ont permis, à plus long terme, de dégager une notion importante et nouvelle. Holtfreter montra que la région postérieure de la plaque neurale qui induit normalement une moelle épinière, du muscle et des structures caudales dans l'expérience du « sandwich » induit du cerveau et des yeux, c'est-à-dire des structures céphaliques, lorsqu'elle est tuée par la chaleur. Il mit ainsi en évidence deux substances, l'une thermolabile, inductrice des structures troncales et caudales, l'autre thermostable, inductrice de structures céphaliques. Avec de l'ectoderme tué il obtint aussi des inductions purement mésodermiques révélant ainsi l'existence d'un inducteur du mésoderme. Il remarqua ensuite que certains tissus tués perdent leur capacité d'induire du mésoderme alors que celle d'induire du tissu neural subsiste. Donc les inductions neurale et mésodermique font intervenir des substances différentes (Holtfreter, 1934).

S. Toivonen testa les capacités inductrices de plus de 40 tissus provenant d'espèces très variées après qu'ils aient été tués par l'alcool. Il s'en dégagait à nouveau la notion que l'induction de structures antérieures (archencéphaliques) et postérieures résulte de l'activité de substances différentes. De plus, Toivonen émit l'idée que l'induction de la moelle épinière et de la queue (spinocaudale) implique l'induction préalable de mésoderme. La notion d'un inducteur du mésoderme était née mais il ne s'agissait encore que d'un inducteur hétérologue et qui n'induisait pas uniquement du mésoderme. Après la guerre, Toivonen a poursuivi ses travaux et trouvé un inducteur purement mésodermisant, la moelle osseuse de cobaye. Celle-ci, tuée par la chaleur puis testée par la méthode du sandwich induit du mésoderme. En 1953, il publia que l'inducteur du mésoderme est indépendant de celui du tube neural. Yamada au Japon confirma les résultats de Toivonen.

La théorie du double gradient (1950-1968) :

Toivonen et Saxen en 1955 ont cherché à démontrer que toutes les structures distribuées le long de l'axe céphalocaudal pouvaient être obtenues en combinant en proportions variables un inducteur archencéphalique, en l'occurrence le foie de cobaye, avec un inducteur mésodermisant la moelle osseuse de cobaye. Par la « Einsteck method » ou par celle des sandwiches, ils montrèrent que l'action combinée des deux inducteurs provoque l'apparition de toutes les structures de l'embryon alors que celle de l'un ou l'autre entraîne la formation exclusive de cerveau antérieur pour le foie de cobaye et de mésoderme pour la moelle osseuse. Ils découvrirent ensuite que la lignée tumorale de cellules Hela, non traitées par la chaleur, est un inducteur spinocaudal qui devient archencéphalique après traitement par la chaleur.

Les cellules de chaque sorte sont alors combinées en proportions variables, introduites dans une gastrula ou associées à l'ectoderme par la méthode du

sandwich (Saxen et Toivonen, 1961). Le spectre des tissus induits par les deux composants est différent de celui qu'induit chacun d'entre eux. La proportion de structures céphaliques et caudales dans le tissu réactionnel évolue parallèlement à celle des cellules chauffées et non chauffées. Ceci les amena à formuler la théorie du double gradient selon laquelle la mise en place des structures suivant les axes AP et DV obéit à un double gradient établi par deux substances, l'une responsable de l'induction de structures céphaliques et dorsales, l'autre de structures troncales et ventrales.

Cette expérience a un intérêt historique car elle marque la transition entre l'approche qualitative classique et une étude quantitative qui annonce les recherches modernes.

Dans la même ligne, Tiedemann, poursuivant ses recherches sur l'induction, a utilisé de l'extrait d'embryon de poulet de 9 jours comme source de substance inductrice et en a extrait deux facteurs, l'un neuralisant, l'autre mésodermisant. Le mélange des deux en proportions variables fournit des résultats comparables à ceux de Saxen et Toivonen.

Peter Nieuwkoop et la démonstration qu'avant l'induction neurale (induction primaire de Spemann) il existe au cours du développement de l'œuf une induction du mésoderme :

Comme nous l'avons vu, la découverte de l'« organisateur » par Spemann et Mangold avait eu pour résultat de centrer l'attention des embryologistes sur la LBD qui a la propriété de s'autodifférencier et d'induire le développement du système nerveux central à partir de l'ectoderme superficiel de la gastrula. L'expérience et son interprétation donnaient l'impression que les processus importants de morphogenèse commençaient à la gastrulation, le passage de l'œuf fécondé à la blastula étant caractérisé seulement par la segmentation de l'œuf et la formation du blastocèle.

Nieuwkoop revient à l'embryon après cette longue période au cours de laquelle on s'est intéressé aux inducteurs hétérologues et on a cherché à découvrir la nature chimique de l'inducteur. A la suite de la découverte que certains inducteurs hétérologues ont la propriété d'induire exclusivement des structures mésodermiques, il s'est livré à une étude systématique de la différenciation du mésoderme chez l'embryon en s'inspirant des travaux d'Hörstadius sur l'œuf d'oursin.

Il partage la blastula en quatre fragments selon l'axe AP et les cultive indépendamment. Si on se réfère à la carte des territoires présomptifs de la blastula établie par Keller (1976) sur le Xénope, les zones I et II correspondent à de l'ectoderme présomptif (ectoderme superficiel et système nerveux), la zone III est essentiellement mésodermique et contient aussi du territoire endodermique. La zone IV est purement endodermique.

Il découvre que les zones I et II correspondant à l'ectoderme présomptif du futur embryon fournissent un ectoderme atypique lorsqu'elles sont isolées. La zone III fournit des structures allongées qui sont donc le site d'une véritable morphogenèse. Elles sont recouvertes d'un épithélium, contiennent une notocorde, des somites du pronéphros et du sang. La zone IV fournit un épithélium de type endodermique conformément à sa destinée présomptive.

Si on associe les zones I et II le résultat est le même que si elles sont isolées. Mais la coopération des zones III et IV permet l'obtention d'une structure embryonnaire contenant du mésoderme et de l'endoderme. Les zones II, III et IV associées suffisent à la formation d'un embryon normal. Les zones I-II-IV donnent une structure qui ressemble à une exogastrula, c'est-à-dire faite d'ectoderme, de notocorde (et autres structures mésodermiques) et d'endoderme mais dépourvue de système nerveux.

Nieuwkoop en tire la conclusion que l'endoderme induit la formation du mésoderme. Ceci est en fait un événement inducteur essentiel qui précède l'induction neurale. Celle-ci ne peut donc plus être qualifiée d'induction primaire. La LBD constituée de mésoderme présomptif est induite par le centre de Nieuwkoop situé dans l'endoderme du côté dorsal de la blastula. Ce n'est qu'après cette induction qu'elle acquiert elle-même la capacité d'induire la plaque neurale dans le territoire ectodermique.

Il apparaît alors que la cavité du blastocèle joue un rôle morphogène négatif en réduisant les interactions entre endoderme et ectoderme à la région périphérique de l'œuf.

Les travaux de Nieuwkoop ont eu une influence considérable sur les recherches modernes dans le domaine de l'induction qui sont centrées pour l'instant essentiellement sur l'induction primaire, celle du mésoderme.

L'ère moderne : la recherche de la nature chimique de l'inducteur du mésoderme :

Le premier travail important dans cette nouvelle série est celui de Dale et Slack qui reprend le même paradigme que Nieuwkoop mais d'une manière plus raffinée et à un stade plus précoce du développement.

Il développe l'hypothèse du triple signal inducteur aboutissant à la formation du mésoderme et à sa régionalisation en structures dorsales telles que la notocorde, intermédiaires comme les muscles, le rein et les gonades et enfin ventrales, comme le sang et le mésothélium. Il propose l'existence d'un inducteur mésodermique **dorsal** émanant de l'endoderme et responsable de l'induction de la notocorde et d'un inducteur **ventral**, incapable de provoquer la formation de structures dorsales mais induisant le sang. On retrouve le gradient dorsoventral de Yamada (1940). Des structures intermédiaires telles

que les muscles et les reins résulteraient selon Dale et Slack de la dorsalisation de cellules initialement induites par le signal ventral. Celle-ci progresserait au sein de la couche mésodermique et émanerait de cellules touchées par le signal dorsal.

Quoiqu'il en soit, l'événement inducteur essentiel pour le déclenchement du développement de l'embryon est l'induction de la lèvre blastoporale dorsale, c'est-à-dire du mésoderme qui lui-même deviendra inducteur du système nerveux. Cette induction résulte de l'activité du centre de Nieuwkoop dont la mise en place remonte à la rotation du cytoplasme cortical au moment de la fécondation. Par un mécanisme inconnu, cette rotation corticale précoce établit des différences entre les cellules de la moitié ventrale et celles de la moitié dorsale. Ces différences se traduisent ensuite par le fait que la capacité d'induire un axe dorsal existe exclusivement dans les blastomères végétatifs dorsaux. Les cellules qui constituent la lèvre blastoporale ventrale forment du mésenchyme, du mésothélium et du sang.

Il existe des agents inhibiteurs de la rotation corticale qui agissent en perturbant la formation des microtubules sans empêcher l'œuf de se diviser ; tels sont les rayons ultraviolets, le froid ou une pression élevée.

Dans ce cas, les embryons forment autant de mésoderme que les embryons normaux mais il est entièrement de type ventral et ne comporte ni notocorde ni système nerveux (Cooke and Smith, 1987). Les UV provoquent donc une hyperventralisation de l'œuf et la rotation cytoplasmique qui se produit à la fécondation résulte dans la formation d'une zone cytoplasmique enrichie en déterminants dorsaux. Il existe aussi des agents hyperdorsalisants tels que les ions lithium et le D₂O (Backström, 1954 ; Kao et al., 1986 ; Kao and Elinson, 1989).

Les œufs traités par de tels agents dorsalisants avant la rotation corticale, génèrent des embryons munis d'un excès de structures antérieures et dorsales comme les yeux, la glande frontale et un déficit en structures postérieures et ventrales. Ce phénotype est dû à la dorsalisation de la zone marginale qui acquiert dans son entier une activité organisatrice.

Avant que ne soit envisagé le cheminement qui a conduit de 1987 à 1992 à la découverte de deux substances susceptibles d'être responsables de l'induction de structures mésodermiques dans l'embryon (une substance responsable du signal ventralisant l'autre du signal dorsalisant), le travail de J. Gurdon et de ses collaborateurs paru en 1984 et 1985 a été évoqué car il a eu un impact méthodologique important sur les recherches qui ont suivi. Ces auteurs ont étudié l'activation des gènes d'actine dans les cellules de la cape animale (Zones I et II de Nieuwkoop) par les cellules du pôle végétatif. La mise en activité du gène d' α -actine, le premier des gènes d'actine activé d'une manière transitoire dans les muscles somitiques, révélait en effet la mise en

route du programme de différenciation mésodermique dans les cellules de l'ectoderme sous l'influence du stimulus inducteur.

Les cellules musculaires peuvent être mises en évidence par un anticorps ou, d'une manière plus quantitative, par un test portant sur l'ARN messager de l' α -actine après protection contre la destruction par les ribonucléases d'ARN synthétisé grâce à son hybridation à une sonde antisens radioactive (test de Rnase-protection).

Ils mettent en évidence que le temps minimum de contact au stade blastula entre la calotte apicale et l'endoderme dans le test du sandwich est de 1h1/2 à 2h1/2. La synthèse d'ARN messager précède de 5 à 6 heures l'apparition de la protéine et constitue un test sensible et spécifique de l'induction mésodermique.

Les facteurs de croissance protéiques et l'induction du mésoderme :

En 1987 deux articles ont ouvert la voie aux recherches modernes sur les facteurs qui pourraient être impliqués dans l'induction du mésoderme. Slack et ses collaborateurs émettent l'hypothèse que des facteurs de croissance peptidiques « PGF » pourraient avoir un rôle dans l'induction du mésoderme. Ils soumettent systématiquement la cape apicale de la blastula de Xénope (Zone I et II de Nieuwkoop) à une série de facteurs connus : EGF, PDGF, insuline, gonadotrophine chorionique, IL1 α et β , IL3, Interferon α et γ , TNF, TGF β , G-CSF, GM-CSF, etc... et ne trouvent aucune activité. Par contre le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) provoque une élongation des explants qui contiennent du mésoderme de type ventral : mésothélium, sang, quelques cellules musculaires. Une augmentation de la concentration du bFGF dans le milieu de culture permet la différenciation de muscle en plus grande quantité. Il est connu que le bFGF se lie à l'héparine. Si on inclut de l'héparine dans le milieu de culture on diminue ou on annule totalement l'effet inducteur selon la concentration d'héparine utilisée. Slack apporte un argument de poids en faveur de l'intervention du bFGF dans l'induction *in vivo* en montrant que l'inducteur naturel, l'endoderme, perd son pouvoir inducteur en présence d'héparine. Ceci était la première démonstration qu'un facteur de croissance activant la prolifération cellulaire chez l'adulte agit comme morphogène chez l'embryon.

Le second travail important de cette époque est celui de J. Smith qui découvre qu'un facteur inducteur du mésoderme est contenu dans un milieu conditionné par la culture d'une lignée de cellules de têtard de Xénope. La lignée XTC, établie en 1973 par Pudney et al., se révèle, par le même test de la cape apicale (immergée cette fois dans un milieu conditionné (CM) par la culture de cellule XTC), contenir une activité PGF.

Si on chauffe à 95 °C pendant 5 minutes le milieu conditionné, son activité mésodermisante est multipliée par 10.

Les types cellulaires induits par XTC-CM sont essentiellement le muscle et la notocorde ainsi que du mésenchyme et du mésothélium alors que le rein et le sang ne sont pas représentés dans les explants. On observe aussi une induction secondaire de structures neurales et de mélanocytes.

La purification partielle du produit actif désigné sous le sigle de XTC-MIF (Mesoderm Inducing Factor) révèle qu'il s'agit d'un composé distinct du b-FGF.

L'étape suivante a consisté à rechercher quelle est la nature du XTC-MIF et si des molécules identiques à ces facteurs sont présentes dans l'œuf.

La présence de FGFs dans l'œuf de Xénope :

En 1988, Kirshner et ses collaborateurs démontrent la présence de FGF dans l'œuf de Xénope en utilisant une sonde ADNc de FGF humain. Ils mettent en évidence un transcrite de 4,2 kb dans l'ovocyte qui code pour une protéine de 155 aminoacides présentant 84 % d'homologie avec le bFGF humain. De plus, le bFGF recombinant de Xénope exprimé dans E. Coli induit du mésoderme dans la cape apicale. Cette activité disparaît lors d'addition d'héparine. Comme les protéines humaine et bovine, celle du Xénope est dépourvue de séquence signal et donc n'est pas sécrétée. On montre aussi que le bFGF est présent dans l'œuf au stade blastula en quantité suffisante pour induire le mésoderme.

Le FGF de Xénope recombinant a une activité mitogène sur des cultures de cellules endothéliales bovines du cortex surrénalien au même titre que le FGF humain et bovin.

Gillepsie et al. (1989) puis Kirshner et al. (1990) rapportent la synthèse par l'ovocyte de Xénope du récepteur au FGF (FGFR). En fait il existe un transcrite du FGFR depuis l'ovocyte jusqu'au stade de la neurula.

On peut noter que la compétence des capes apicales à répondre au bFGF se situe entre les stades de 64 et de 1024 cellules qui correspond à la période où on trouve le maximum de bFGFR fixé à la membrane plasmique. Curieusement l'ARNm du FGFR subsiste après que la compétence à répondre au FGF ait disparu.

En 1991 le groupe de Kirshner réalise une expérience très importante. Après avoir démontré l'existence de l'ARNm du FGFR dans l'embryon il met au point un test physiologique (la libération de Ca^{2+} sous l'influence de bFGF) permettant de juger si ce récepteur est ou non fonctionnel à un stade donné.

Il introduit dans l'œuf l'ARNm d'un FGFR tronqué qui formera avec le récepteur normal des dimères non fonctionnels. Le récepteur hybride empêchera l'action du FGF endogène de l'œuf. Si le bFGF, ou une autre forme de FGF, joue un rôle dans l'induction du mésoderme cette expérience provoquera des anomalies du développement.

Ils observent que les embryons injectés présentent des déficiences importantes de la région caudale et troncale. Par contre, ces anomalies ne se produisent pas si l'injection comporte un excès d'ARNm de FGFR normal.

Finalement en 1992 Isaacs, Tannahill et Slack découvrent une nouvelle forme de FGF dans l'œuf de Xénope qui pourrait être un meilleur candidat que le bFGF comme facteur inducteur du mésoderme.

De toutes ces expériences il ressort que le FGF exogène de Mammifère induit la cape apicale à former des structures mésodermiques ventrales : sang, mésenchyme, mésothélium mais peu de muscle, pas de reins, ni de notocorde ; de plus, aucune différenciation de structures neurales ne se produit dans le test de la cape apicale en présence de FGF.

Par contre, nous savons que des structures dorsales et neurales peuvent être obtenues avec du milieu conditionné par des cellules endodermiques de têtard de la lignée XTC. Il restait à déterminer la nature de cet inducteur mésodermique dorsal.

La première indication qu'un membre de la famille des TGF β peut être impliqué dans l'induction mésodermique revient à Melton (1987).

Weeks et Melton (1987) montrent qu'il existe dans l'hémisphère végétatif de l'œuf de Xénope un ARNm qui code pour un facteur de croissance de la famille du TGF β .

Au lieu de rechercher comme certains de leurs prédécesseurs quel peut être l'effet de facteurs de croissance mammaliens connus sur l'induction du mésoderme par le test de la cape apicale ces auteurs utilisent une stratégie différente. Ils partent de l'idée que certains ARNm présents dans le pôle animal ou végétatif de l'œuf peuvent jouer un rôle dans la détermination des différents types cellulaires.

Ils préparent des ADNc à partir d'ARNm issus de l'hémisphère animal et de l'hémisphère végétatif de la blastula. Par hybridation différentielle ils isolent des ADNc présents seulement dans la moitié végétative de l'œuf. A l'aide de ceux-ci ils découvrent une espèce moléculaire (appelée Vg1) qui code pour une protéine de 41 kd et qui présente une homologie de 38 % avec le TGF β 1 de Mammifère et avec le produit du gène *décapentaplegic* (dpp) de *Drosophile*.

Cette protéine est présente dans l'ovocyte sous la forme d'une mince couche

corticale dans l'hémisphère végétatif. Dans l'œuf non fécondé, le signal est plus largement distribué dans le cytoplasme de la moitié végétative de l'œuf et devient présent dans tout l'hémisphère végétatif pendant les premiers clivages. Les cellules équatoriales qui forment le mésoderme sont donc au contact de celles qui contiennent Vg1.

En utilisant le test quantitatif sensible de la production d'ARNm d' α -actine, Kimelman et Kirshner (1987) montrent qu'on peut établir une courbe dose-réponse de l'effet du FGF sur la production d' α -actine. Ils sont aussi en mesure de démontrer que l'effet du FGF peut être multiplié par 12 si on ajoute les TGF β 1 et 2 à une concentration convenable.

En utilisant le test de l'induction d' α -actine dans la cape apicale ils montrent que le TGF β 2 de Mammifère (et pas le TGF β 1) est capable d'une induction de muscle dans la cape animale. L'addition de FGF a un certain effet synergique. Ils entreprennent alors de voir si l'activité du XTC-MIF est assimilable à celle du TGF β 2. A l'aide de divers tests fonctionnels ils arrivent à la conclusion qu'au moins un des composants des facteurs mésodermisants contenus dans le XTC-MIF correspond à une activité TGF β -like.

En 1990, J.C. Smith découvre que le facteur qui présente l'activité maximale sur l'induction mésodermique dans le CM de XTC est un homologue de l'activine A des Mammifères.

Les activines ont été primitivement caractérisées comme des facteurs stimulant la sécrétion de l'hormone folliculostimulante (FSH) de l'adénohypophyse. Ensuite on a réalisé que l'activine A est identique à un facteur dénommé EDF pour Erythroid Differentiation Factor découvert en 1988 (Eto et al., Murata et al.). De plus Schubert et al. en 1990 montrent que l'activine A est capable de promouvoir la survie neuronale *in vitro*. En définitive il s'agit d'un facteur peptidique doué de fonctions multiples. Du point de vue structural l'activine est un dimère constitué de deux chaînes polypeptidiques qui sont le résultat de la digestion de précurseurs plus grands. L'activine se présente sous la forme d'homodimères constitués de 2 chaînes β a (Activine A) ou d'une chaîne β a et β b pour l'activine AB.

Smith et ses collaborateurs entreprennent alors de poursuivre la purification de l'activité inductrice présente dans XTC-MIF par HPLC. Ils obtiennent un pic actif qui induit l' α -actine dans la cape apicale à une concentration beaucoup plus faible que le TGF β 2.

La séquence en aminoacides de ce produit révèle une forte homologie de séquence N-terminale avec l'activine A bovine et pas d'homologie avec la séquence N terminale de l'inhibine α , du TGF β , de Vg1 ou dpp de Drosophile.

L'activine A donc est différente du TGF β 2.

La démonstration que l'activine est exprimée chez le Xénope aux stades de la gastrulation a été définitivement apportée par le groupe de Melton qui a cloné l'ADNc d'activine de Xénope par PCR en utilisant des oligonucléotides dégénérés correspondant aux séquences conservées des activines de Mammifères.

La séquence totale de la chaîne de Xénope ($X\beta_a$) présente 85 % d'homologie avec la chaîne β_a de Souris.

Les chaînes $X\beta_{b1}$ et 2 ont respectivement 94 et 96 % d'homologie avec l'Act β_b de Mammifère.

Expression du gène d'Activine pendant le Développement chez le Xénope

Dans la blastula, on n'observe pas de synthèse d'activine mais une activité d'origine maternelle est déjà présente dans l'ovocyte.

Le gène de la chaîne $X\beta_a$ est actif depuis le stade gastrula jusqu'au stade têtard. Celui de l'activine $X\beta_b$ est transcrit depuis le stade blastula à un niveau de base qui augmente considérablement chez le têtard.

On évalue à environ 2 000 et 10 000 molécules de $X\beta_a$ et $X\beta_b$ d'ARNm contenues dans un embryon ; ce qui suffit pour produire des concentrations picomolaires d'activine nécessaires à l'induction.

L'activine est donc un bon candidat pour rendre compte de l'induction des structures mésodermiques dorsales dans le développement. Il constitue un des facteurs inducteurs principaux du centre de Nieuwkoop.

Il faut noter que Mitrani (1990) a montré que l'activine induit la formation d'un axe embryonnaire chez le Poulet et que l'activine β_b est transcrite dans l'embryon au stade où la ligne primitive est induite.

Il restait à démontrer que le récepteur de l'activine (AR) est présent dans l'œuf et l'embryon. Ceci a été réalisé chez le Xénope par Mathews, Vale et Kintner en 1992. Ils ont recherché le gène correspondant dans une banque d'ADNc de jeune neurula de Xénope en utilisant une sonde de Souris.

Ils ont trouvé un ADNc de 4,5 kb codant pour une protéine de 510 acides aminés qui présente 69 % d'identité avec la protéine de Souris. Le récepteur de l'activine possède un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et une partie cytoplasmique dotée d'une activité sérine-thréonine kinase. La molécule de Xénope est proche du récepteur de Poulet ARII.

L'expérience cruciale qui consiste à démontrer que si on rend inactifs les récepteurs endogènes de l'embryon on annule les effets inducteurs de l'activine qu'elle soit endogène ou exogène a été réalisée par le groupe de Melton

(1992). Ces chercheurs ont cloné deux récepteurs de l'activine de Xénope XAR1 et XAR2 et construit un récepteur tronqué sans partie cytoplasmique (XAR1 \rightarrow Δ DXAR1). L'injection au stade 2 cellules dans les deux blastomères de l'ARN messager de Δ XAR1 empêche l'induction de la cape apicale par l'activine tout en laissant intactes ses capacités à être induite par le FGF.

En conclusion : une notion claire se dégage de ces travaux. Il existe dans l'œuf au stade blastula et jusqu'au stade neurula, c'est-à-dire lorsque l'induction mésodermique a lieu, deux groupes de substances appartenant au PGFs. Ces substances ont un effet inducteur qualitativement différent sur les cellules de la zone marginale. L'un induit des structures mésodermiques ventrales (sang-mésenchyme, mésothélium) et l'autre des structures mésodermiques dorsales (notocorde, muscle). Il s'agit de facteurs de la famille du FGF pour le premier et de la famille des TGF β pour le second. Dans ce dernier cas, l'activine B paraît être le candidat le plus vraisemblable pour ce qui est de la substance réellement active *in vivo* chez l'embryon puisqu'au stade blastula les chaînes β de l'activine sont synthétisées.

Les arguments les plus probants en faveur de la nature des facteurs inducteurs naturels sont en effet la présence d'un gène et de transcrits de ce gène au bon stade du développement et aussi l'existence d'un récepteur *ad hoc* dont l'inactivation par manipulations moléculaires produit les malformations attendues.

Le problème restant à résoudre est celui de l'induction de structures intermédiaires entre les dérivés dorsaux et ventraux du mésoderme (reins-muscles) c'est-à-dire celui de l'organisation dorso-ventrale du mésoderme et également de son organisation antéropostérieure, qui comme nous le savons depuis Spemann et depuis l'expérience d'Otto Mangold est responsable de la régionalisation de la plaque neurale. Les mécanismes moléculaires responsables de l'organisation des structures selon les axes AP et DV sont encore mal connus chez les Vertébrés.

Les gènes Wnt et la régionalisation du mésoderme :

Des recherches réalisées sur les produits des gènes *Wnt* ont apporté quelques données intéressantes sur les mécanismes possibles présidant à la régionalisation du mésoderme et les recherches actives poursuivies dans ce domaine sont prometteuses.

Les premiers membres découverts de la famille *Wnt* sont des protéines codées par le proto-oncogène *intl* découvert chez la Souris comme un oncogène activé dans les tumeurs mammaires par l'insertion d'un provirus (Nusse et Warmus, 1982). L'expression inappropriée de ce gène induit un phénotype transformé dans les cellules de l'épithélium mammaire comme on l'a montré en culture de tissu et chez des souris transgéniques.

En 1987 on découvre chez la *Drosophile* qu'un gène de polarité segmentaire *Wingless* appartient à la même famille. *Int1* est exprimé transitoirement chez le Xénope et chez la Souris et le Poulet pendant la neurulation. Chez la Souris, l'expression de *int1* est localisée dans la moelle épinière et dans le cerveau. La mutation ciblée de ce gène chez la Souris provoque l'absence de cervelet. La première indication qu'*int1* joue un rôle dans les phases précoces de l'embryogenèse chez le Xénope vient des expériences de McMahon et Moon (1989). Ces auteurs ont injecté dans l'œuf fécondé de l'ARNm synthétique de *int1* et ont obtenu des duplications de l'axe embryonnaire. Depuis, la dénomination du gène a changé pour *Wnt1* et d'autres membres de cette même famille ont été identifiés chez les Mammifères comme chez le Xénope. Chez le Xénope 5 gènes ont été clonés (*Xwnt1*, 3, 5, 4 et 8) présentant une homologie de 35 à 50 % entre eux selon les cas.

Chacun de ces gènes est exprimé selon un plan spatio-temporel propre pendant l'embryogenèse, ce qui suggère qu'ils pourraient jouer un rôle spécifique au cours du développement.

L'ARNm de *XWnt8* injecté dans un blastomère ventral induit un embryon secondaire parfait (comme *XWnt1*). Le produit du gène *Xwnt8* paraît avoir un pouvoir dorsalisant sur les cellules de la zone marginale.

De plus l'injection simultanée d'ARNm de *Wnt8* et d'activine dans un blastomère ventral induit un organisateur de Spemann. Par conséquent, certains gènes de la famille *Wnt* ont la propriété normalement présente dans le centre de Nieuwkoop d'induire un organisateur de Spemann. L'activine en effet, n'a pas toutes les propriétés de l'inducteur dorsal du centre de Nieuwkoop car elle induit essentiellement des embryons sans tête.

Cependant il est très important de noter que ni *XWnt1* ni *XWnt8* ne sont exprimés quand l'induction commence. *XWnt1* ne l'est qu'au stade neurula et *XWnt8* l'est au stade midblastula mais ses transcrits se trouvent exclusivement sur la face ventrale du germe. Les produits de ces deux gènes pourraient mimer ceux d'un autre membre de la famille qui constituerait un agent dorsalisant et antérieurisant présent dans le centre de Nieuwkoop lui conférant ainsi la capacité d'induire des structures céphaliques.

Les protéines produites par les gènes *Wnt* sont secrétées et on suppose que leur ligand naturel pourrait se trouver sur des cellules de la face dorsale de l'embryon.

L'injection d'ARN de *Wnt8* dans les cellules du pôle animal d'un embryon traité aux UV ne rétablit pas la formation d'un axe embryonnaire montrant que l'assimilation au centre de Nieuwkoop est justifiée.

L'activité dorsalisante de *Wnt8* a été mise en évidence par le groupe de Melton et par Smith et Harland (1992). Ces derniers ont au cours de cette

recherche découvert un autre clone codant pour un nouveau polypeptide de 222 AA probablement secrété qu'ils ont appelé Noggin.

L'ARNm de Noggin injecté dans un blastomère au stade 4 cellules d'un embryon traité aux UV restaure la formation d'un axe embryonnaire comme l'injection d'ARNm de *XWnt8*. Comme dans le cas des embryons traités par *XWnt8* les blastomères végétatifs injectés ne se retrouvent pas dans les organes axiaux mais dans l'endoderme comme c'est le cas des cellules constituant le centre de Nieuwkoop.

Contrairement à *XWnt8*, les transcrits de Noggin sont présents dans l'ovocyte et localisés dans la zone marginale dorsale de l'embryon.

Conclusion générale : état présent de la question :

La formation des différentes structures mésodermiques peut être obtenue par la modulation des doses disponibles chez l'embryon de facteurs ventralisants (FGF-like) et dorsalisants (Activin-like) qui pourraient être distribués selon deux gradients opposés. Une autre alternative serait l'intervention de facteurs dorsalisants qui viennent se surajouter au PGFs. Celle-ci peut être médiée par des protéines sécrétées telles que les produits des gènes *Wnts* et du gène de noggin par exemple.

L'induction neurale, c'est-à-dire l'activité du centre organisateur de Spemann reste encore largement incomprise au niveau moléculaire. La découverte du gène Goosecoid par Ed. de Robertis présente à cet égard un grand intérêt. Ces travaux ont été exposés par le Pr. de Robertis lui-même dans quatre leçons données au Collège de France en janvier 1993. C'est-à-dire à la suite du cours résumé ci-dessus.

La deuxième partie du cours délivrée à University College à Londres a porté sur la crête neurale. Après avoir envisagé la pluripotentialité remarquable de cette structure, les capacités migratoires de ces cellules et les mécanismes moléculaires qui contrôlent ces migrations, on a traité plus longuement de la signification évolutive de la crête neurale. Elle est en effet apparue, dans le groupe des Cordés, chez les Vertébrés et a contribué considérablement à l'évolution observée des Protocordés aux Vertébrés. Des données récemment acquises dans mon laboratoire éclairent d'un jour nouveau ce domaine de l'embryogenèse et de la phylogenèse des Cordés.

N.L.D.

SÉMINAIRES

Les séminaires de la Chaire d'Embryologie Cellulaire et Moléculaire et de la Chaire de Biochimie Cellulaire ont été groupés.

Le thème choisi a été le suivant « *Les mécanismes de la différenciation cellulaire : somitogénèse et myogénèse* ».

Les séminaires se sont déroulés pendant trois jours consécutifs, les 10-11 et 12 Mars 1993. La formule adoptée a obtenu un vif succès et les séminaires ont attiré un public nombreux et assidu de chercheurs et d'étudiants de Paris, de la région parisienne et même de province.

Les exposés ont porté plus précisément sur les sujets suivants :

La segmentation somitique

P^r Claudio STERN de l'Université d'Oxford, Grande Bretagne :
« Segmentation du mésoderme somitique ».

P^r Roger KEYNES de l'Université de Cambridge, Grande Bretagne :
« Segmentation du mésoderme et organisation du système nerveux ».

P^r Chaya KALCHEIM de l'Université de Jérusalem, Israël :
« Influence des caractéristiques du mésoderme somitique sur le développement des dérivés de la crête neurale et la morphogénèse de la vertèbre ».

La polarisation du somite et la détermination de ses trois dérivés : dermatome, myotome, sclérotome

P^r Charles ORDAHL de l'Université de San Francisco, Etats-Unis :
« Le lignage myogénique et la détermination des cellules somitiques ».

D^r Catherine ZILLER et D^r Marie-Aimée TEILLET de l'Institut d'Embryologie cellulaire et moléculaire, Nogent-sur-Marne :
« Etude *in vivo* et *in vitro* de l'influence du tube neural et de la corde dorsale sur la survie et la différenciation des cellules somitiques ».

D^r Olivier POURQUIE de l'Institut d'Embryologie cellulaire et moléculaire, Nogent-sur-Marne :
« Interactions tissulaires et cellulaires intervenant dans la détermination des cellules du somite ».

Anne-Hélène MONSORO-BURO, de l'Institut d'Embryologie cellulaire et moléculaire, Nogent-sur-Marne :
« Gènes de la famille *Hox7/msh* et polarisation dorsoventrale des organes axiaux ».

P^r Bodo CHRIST de l'Albert-Ludwigs Universität Freiburg, Allemagne :
« Formation des compartiments somitiques ».

Le mésoderme céphalique et les somites céphalocervicaux

P^r Gérard COULY, de l'Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris et Institut d'Embryologie cellulaire et moléculaire, Nogent-sur-Marne :
« Mésoderme, crête neurale et formation de la tête chez les Vertébrés »

D^r Rudi BALLING du Max Planck Institut, Freiburg, Allemagne :
« Souris à queue ondulée. Une analyse génétique et moléculaire du développement du squelette ».

D^r Michael KESSEL du Max Planck Institut, Göttingen, Allemagne :
« Spécification antéro-postérieure du mésoderme somitique par les Hox codes »

Etapes générales de la myogenèse (du mésoderme au muscle adulte)

D^r Frédéric ROSA de l'Ecole Normale Supérieure, Paris :
« Rôle des activines dans la formation du mésoderme chez les vertébrés ».

D^r Giulio COSSU de l'Université de Rome « La Sapienza », Italie :
« Les lignages myogéniques et leur rôle possible dans le développement musculaire ».

D^r Monique LAZAR du Collège de France, Paris :
« Régulation de l'expression du gène de la β -énolase au cours de la myogenèse chez la Souris ».

D^r Patrick LEMAIRE du Wellcome/CRC Institute, Cambridge, Grande Bretagne :
« Mise en place du plan d'organisation du mésoderme chez le Xénope ».

Les facteurs myogéniques et leurs mécanismes d'action

D^r Margaret BUCKINGHAM de l'Institut Pasteur, Paris :
« Régulation des gènes musculaires pendant la myogenèse chez la Souris ».

P^r E. OLSON de l'Université de Houston, Texas, Etats-Unis :
« Interactions régulatrices entre protéines à homéodomaine et à HLH au cours du développement des membres et de la somitogenèse ».

D^r Christian PINSET et D^r Didier MONTARRAS de l'Institut Pasteur, Paris :
« Contrôles de la myogenèse, somatomédines et facteurs de la famille MyoD ».

D^r Tio MOHUN du N.IMR, Londres, Grande Bretagne :
« Myogenèse au cours du développement précoce chez le Xénope ».

*Etapes terminales de la myogenèse
Familles de gènes, régulation transcriptionnelle et par épissage*

D^r Marc FISZMAN de l'Institut Pasteur, Paris :
« Contrôle des gènes de tropomyosines »

D^r Robert WHALEN de l'Institut Pasteur, Paris :
« Aspects physiologiques et moléculaires de la régulation de l'expression des gènes de la myosine chez les mammifères ».

D^r David YAFFE de l'Institut Weizmann, Rehovot, Israël :
« Le gène géant de la dystrophie musculaire de Duchenne : structure et expression durant le développement précoce ».

Le P^r Eddy de ROBERTIS, de l'Université de Californie à Los Angeles a donné quatre leçons dans le cadre d'une invitation sur une chaire d'Etat sur le sujet suivant :

Molecular Embryology : The Control of Head and Tail Development in the Vertebrates :

- The Rosetta Stone : Hox-genes and the « *homunculus* » within our DNA,
- Ross Harrison's fields : a tale of gradients, limbs and tails,
- Spemann's organizer : the genetics of gastrulation in Amphibians,
- Geoffroy Saint-Hilaire's victory : universal molecular mechanisms in the evolution of body form in metazoans.

RÉSUMÉ DE L'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE

NEUROEMBRYOLOGIE

Les travaux de 1992-1993 se sont déroulés dans la continuité de ceux de l'année précédente avec une orientation plus nette vers :

1. l'étude des mécanismes moléculaires du développement du système nerveux et des organes axiaux,
2. l'étude de l'ontogenèse du cerveau par le moyen des chimères embryonnaires.

1. LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES DE LA CRÊTE NEURALE

1.1. *Etude in vitro de la ségrégation des lignées cellulaires dérivées de la crête neurale aviaire*

(F. SEXTIER-SAINTE-CLAIRE DEVILLE, C. ZILLER et N.M. LE DOUARIN)

Nous avons poursuivi ce travail en utilisant notre méthode de culture clonale de cellules dérivées de la crête neurale sur couche nourricière (fibroblastes 3T3) de souris.

Les résultats obtenus précédemment avec la crête neurale prélevée au début de la migration avaient montré qu'elle est composée majoritairement de précurseurs pluripotents, mais qu'elle contient aussi quelques cellules déterminées ainsi que de rares cellules totipotentes que nous considérons comme des cellules souches.

Nous avons observé, qu'au cours du développement de l'embryon, les potentialités de différenciation et de prolifération des cellules dérivées de la crête neurale se réduisent progressivement : ainsi les cellules non-neurales des ganglions rachidiens d'embryons de 6 à 14 jours d'incubation ne produisent que de petits clones qui ne contiennent pas de neurones.

Les cellules de crête neurale colonisant l'intestin conservent plus longtemps des potentialités plus étendues ; en particulier l'aptitude à produire des clones de grande taille et des cellules neuronales s'observe jusqu'au 7^e jour de l'incubation. Des phénotypes normalement non présents dans le système digestif s'expriment dans nos cultures. Celles-ci contiennent en effet des cellules adrénérgiques ainsi que des cellules gliales de type cellules de Schwann portant l'antigène SMP.

D'une manière générale, nos résultats montrent que même lorsqu'elles sont parvenues au terme de leur migration, les cellules de la crête neurale restent une population pluripotente soumise à l'action sélective de l'environnement.

1.2. *Différenciation mélanocytaire*

Effet du facteur steel sur la mélanogénèse dans des cultures de crête neurale aviaire.

(R. LAHAV, L. LECOIN, V. NATAF et N.M. LE DOUARIN en collaboration avec F.H. MARTIN, J.F. CARNAHAN, K.E. LANGLEY, T.C. BOONE de la Société AMGEN, Thousand Oaks, Californie, USA)

Des mutations des locus *steel* et *W* chez la souris affectent trois types de cellules embryonnaires : les cellules germinales primordiales, les cellules souches hématopoïétiques et les mélanocytes dérivés de la crête neurale. Le produit du gène *steel* est un facteur de croissance, le SCF, dont le récepteur,

le protooncogène c-kit, s'est révélé être le produit du gène W. Ce récepteur membranaire possède une activité enzymatique tyrosine-kinase.

Nous avons étudié l'effet du facteur SCF recombinant de poulet sur la différenciation des mélanocytes dans des cultures de crête neurale troncale de caille et montré que le nombre de mélanocytes est augmenté significativement en présence de ce facteur. Toutefois, le SCF n'agit ni sur la prolifération, ni sur la survie et la détermination des précurseurs des mélanocytes. Le SCF en fait, stimule le processus de différenciation de cellules déjà engagées dans le lignage mélanocytaire.

1.3. Marqueurs de différenciation mélanocytaire chez l'embryon d'oiseau (V. NATAF, P. MERCIER, C. ZILLER et N.M. LE DOUARIN)

Après l'immunisation de souris par des cellules de crête neurale différenciées en mélanocytes en culture, nous avons obtenu trois anticorps monoclonaux qui réagissent avec des cellules pigmentées et non pigmentées dans l'épiderme et dans des cultures de crête neurale. Ces marqueurs sont caractéristiques de différentes étapes du développement des cellules pigmentaires. L'un d'eux, MeEM, détecte les mélanoblastes dès qu'ils ont atteint le mésenchyme sous-ectodermique. Les deux autres, Mel1 et Mel2, reconnaissent des antigènes présents plus tard au cours du développement. De plus, MeEM est spécifique des mélanoblastes et des mélanocytes dérivés de la crête neurale. Il ne reconnaît pas ceux de la rétine. L'antigène reconnu par MeEM est une protéine de masse relative 26000. Mel1 et Mel2 se lient à des épitopes glycosylés portés par des glycoprotéines de masses relatives 123000 et 85000 respectivement.

Ces anticorps sont des outils précieux pour nos études sur la ségrégation des lignages issus de la crête neurale.

1.4 Rôle de l'environnement dans la différenciation des cellules de la crête neurale (E. DUPIN et N. LE DOUARIN)

Les résultats de l'ensemble de nos expériences de clonages *in vitro* des cellules de la crête neurale ou de ses dérivés (appartenant aux ganglions du système nerveux périphérique (SNP) sensoriel ou autonome, et aux plexus entériques), suggèrent un rôle crucial des signaux extracellulaires dans l'émergence et la stabilisation des différents lignages issus de la crête neurale. Une étape décisive dans l'analyse des mécanismes moléculaires gouvernant ce processus, consiste maintenant à identifier les facteurs impliqués soit dans le choix phénotypique des précurseurs pluripotents, soit dans la sélection de cellules déterminées appropriées à chaque tissu dérivé de la crête neurale.

a) *Régulation de la différenciation adrénérique par l'AMPc*

(E. DUPIN, en collaboration avec M. FAUQUET, Laboratoire de Biochimie Cellulaire du Collège de France)

La différenciation *in vitro* des précurseurs du système sympatho-adrénomédullaire issus de la crête neurale troncale est largement influencée par les conditions de culture utilisées, et, en particulier, dépend de la présence d'extrait embryonnaire dans le milieu de culture. Les molécules et mécanismes mis en jeu n'étant pas connus, nous avons testé la possibilité d'une régulation via le métabolisme de l'AMPc.

Nous avons étudié l'expression de la tyrosine-hydroxylase (TH), enzyme-clé de la synthèse des catécholamines, lors de la différenciation adrénérique des cellules de la crête neurale en culture. Nous avons pour cela disposé de deux outils majeurs, un anticorps monoclonal dirigé contre la TH de caille d'une part, et le clone génomique complet correspondant, d'autre part. En combinant la culture cellulaire, les techniques de transfection génique et l'utilisation d'agents pharmacologiques, nous avons montré que l'AMPc agit comme second messager dans la réponse à l'extrait embryonnaire. De plus, la régulation positive de la TH par l'AMPc s'effectue au niveau transcriptionnel et met en jeu l'activation des récepteurs β -adrénériques présents sur les cellules de crête neurale.

Ceci suggère qu'*in vivo*, des amines exogènes, dont la présence a été démontrée chez l'embryon, sont impliquées dans l'acquisition du phénotype adrénérique par les précurseurs sympatho-adrénomédullaires de la crête neurale.

b) *Influence de l'acide rétinolique sur la différenciation des cellules de la crête neurale en culture*

(E. DUPIN et N. LE DOUARIN)

Nous avons récemment entrepris d'étudier le rôle de l'acide rétinolique sur le développement de la crête neurale. En effet, ce dérivé de la vitamine A est connu depuis longtemps pour provoquer chez l'embryon de graves perturbations dans la formation des dérivés de la crête neurale, en particulier au niveau céphalique. De plus, la présence de récepteurs nucléaires aux rétinoïdes a été démontrée récemment dans la crête neurale et la plupart de ses dérivés.

Nous avons donc testé l'action éventuelle de l'acide rétinolique sur les propriétés des cellules de la crête neurale troncale et céphalique en culture. L'addition d'acide rétinolique réduit la prolifération cellulaire et stimule de façon spectaculaire la différenciation des cellules adrénériques et des cellules pigmentaires. Il apparaît cependant que l'influence « adrénergisante » de l'acide rétinolique est observée uniquement sur les cellules de la crête neurale

au début de leur migration, alors que l'effet positif sur la mélanogénèse se produit également à des stades plus tardifs, en particulier lorsque les cellules issues des crêtes neurales ont colonisé la peau.

L'utilisation de cultures clonales a permis en outre de mieux caractériser l'état de détermination des cellules sensibles à l'acide rétinoïque ainsi que la nature de leur réponse. Toutes les colonies obtenues en présence d'acide rétinoïque sont pluriphénotypiques, contenant à la fois de très nombreuses cellules adrénérgiques et un nombre réduit de cellules gliales. Certaines de ces colonies incluent également des mélanocytes alors que les cultures témoins ne sont pas pigmentées.

En conclusion, nous montrons que l'acide rétinoïque agit sur des cellules de crête neurale pluripotentes, en modifiant la répartition des phénotypes cellulaires qu'elles engendrent. Deux mécanismes peuvent être proposés : d'une part l'acide rétinoïque semble orienter de façon spécifique le choix de différenciation vers la voie adrénérgique et d'autre part, il est capable de stimuler la différenciation terminale des mélanocytes.

Ces observations ouvrent la voie à une analyse moléculaire des mécanismes mis en jeu (étude des récepteurs des rétinoïdes, des gènes cibles...) ainsi qu'à une étude expérimentale du rôle de l'acide rétinoïque dans le développement de la crête neurale *in vivo*.

2. LA TRIPLE ORIGINE DU CRÂNE CHEZ LES VERTÉBRÉS

(G. COULY, P. COLTEY et N.M. LE DOUARIN)

Bien que l'origine des os de la face à partir de la crête neurale céphalique ait été établie par des travaux antérieurs de mon laboratoire (Le Lièvre et Le Douarin, 1975) celle de la voûte de la boîte crânienne constituée par les os frontaux et pariétaux restait incertaine. Avec G. Couly et P. Coltey, nous avons utilisé la méthode de marquage cellulaire par la réalisation de chimères embryonnaires entre caille et poulet, pour clarifier cette question. Les greffes de crête neurale de caille chez le poulet ont été réalisées à un stade plus précoce du développement que dans les expériences précédentes (stades *neurula*, 3 somites) et les embryons ont été observés à partir de 10 à 14 jours, c'est-à-dire lorsque les os de membrane de la voûte du crâne sont bien différenciés.

De plus, la même méthode de substitution homotopique et homochronique des territoires embryonnaires a été appliquée au mésoderme paraxial céphalique (au stade 3 somites) et aux six premiers somites formés afin que les contributions respectives de ces structures au squelette crânien puissent être identifiées.

Les résultats de l'ensemble de ces travaux permettent désormais d'assigner à

chaque os du crâne une origine embryologique précise. Nous distinguons un crâne « acordal » ou « précordal » situé en avant de l'extrémité antérieure de la notocorde qui se trouve au niveau de la selle turcique du sphénoïde. L'origine du crâne précordal est entièrement ectodermique c'est-à-dire dérivée de la crête neurale. Cette région comprend l'os frontal dont l'origine à partir de la crête neurale est désormais démontrée. Le crâne « cordal » est d'origine mésodermique dans sa partie ventromédiane et ectodermique (crête neurale) en ce qui concerne le pariétal et une partie de la capsule otique. Un point important éclairci par ce travail concerne la double origine du corps de l'os sphénoïde dans lequel le basiprêphénoïde provient de la crête neurale et le basipostsphénoïde provient du mésoderme céphalique.

Les Vertébrés appartiennent avec les protocordés au phylum des cordés. Les protocordés sont eux-mêmes séparés en deux groupes celui des Céphalocordés dont le prototype actuel est l'*Amphioxus* et celui des Urocordés (Ascidies).

L'organisation du corps chez l'*Amphioxus* est fondamentalement celle d'un Vertébré si ce n'est qu'il ne possède ni tête munie d'organes des sens ni crête neurale.

Il apparaît donc que la transition des Céphalocordés aux Vertébrés a fait intervenir le développement considérable i. de la partie antérieure du primordium neural à partir duquel se forment les hémisphères cérébraux, le thalamus et les organes des sens (yeux et organe de l'odorat), ii. de la crête neurale qui a co-évolué avec le cerveau antérieur pour fabriquer la boîte crânienne et qui a produit le système nerveux périphérique et les organes responsables du sens du toucher. Selon Gans et Northcutt (1983), cette transformation profonde serait à mettre en parallèle avec le changement profond du mode de vie lors du passage des protocordés aux Vertébrés. Ces derniers sont mobiles et d'une manière générale se nourrissent de proies qu'ils doivent capturer. Ils ont besoin pour cela d'organes des sens et de centres nerveux intégrateurs qui se sont essentiellement développés à partir de la région antérieure de l'ébauche neurale.

3. RÔLE INDUCTEUR DE LA NOTOCHORDE DANS L'ACQUISITION DE LA POLARITÉ DORSO-VENTRALE DU SOMITE

(O. POURQUIÉ, M. COLTEY, M.-A. TEILLET, C. ORDHAL et N.M. LE DOUARIN)

3.1. *Position du problème*

Chez l'embryon de vertébré, une manifestation de la polarité antéropostérieure est la segmentation du mésoderme paraxial en somites. Ceux-ci sont formés par l'organisation de cellules mésenchymateuses en sphères épithéliales

généérées selon un gradient cranio-caudal des deux côtés du tube neural. Les somites se polarisent secondairement selon l'axe dorso-ventral en un compartiment ventral, le sclérotome et un compartiment dorsal, le dermomyotome. Le dermomyotome dérive de la partie dorsale du somite et donne naissance aux muscles striés axiaux ainsi qu'au derme dorsal. Le sclérotome dérive de la partie ventrale du somite et est à l'origine du squelette axial de l'individu. Le somite épithélial peut-être de plus subdivisé en une moitié latérale dont les cellules migrent précocément et vont donner naissance aux muscles appendiculaires et des ceintures, ainsi qu'en une moitié latérale dont sont issus le sclérotome et le dermomyotome.

La notochorde est une structure axiale d'origine mésodermique qui joue un rôle crucial dans l'établissement de la polarité dorso-ventrale du tube nerveux. Elle induit la partie ventrale du tube nerveux à se différencier en un groupe spécialisé de cellules appelé **floor plate** qui a son tour acquiert des propriétés d'induction homéogénétiques et induit les motoneurones à se différencier dans la zone ventrale du tube nerveux. La greffe ectopique de notochorde ou de **floor plate** en position latéro-dorsale par rapport au tube nerveux est capable d'induire la différenciation de structures de type ventral (motoneurones et **floor plate**) en position ectopique. Bien que le rôle du tube nerveux et de la notochorde sur le développement du squelette axial ait fait l'objet de nombreuses études, leur rôle dans la différenciation du mésoderme reste mal compris.

Nous avons entrepris d'examiner le rôle de la notochorde sur la différenciation du mésoderme paraxial. Pour cela, nous avons commencé par greffer de la **notochorde** en position latéro-dorsale entre le tube nerveux et le mésoderme paraxial. Les embryons ont ensuite été fixés à différents stades et examinés en immunocytochimie à l'aide de l'anticorps 13F4 qui reconnaît les cellules de la lignée musculaire, ainsi qu'à l'aide de l'anticorps anti-BEN afin de mettre en évidence les structures ventrales du tube nerveux (motoneurones et **floor plate**).

3.2. Ventralisation du mésoderme paraxial par la greffe de notochorde

Chez les embryons examinés à des stades précoces (de 2,5 j à 4 j), nous avons observé que lorsque la notochorde est greffée dans la région non segmentée du mésoderme paraxial, celle-ci empêche la formation du dermomyotome du côté greffé. Ceci se traduit plus tard par l'absence de myotome (visualisé par l'anticorps 13F4) du côté opéré. Lorsqu'on laisse ces embryons se développer jusqu'à 8-10 jours, on observe du côté opéré l'absence totale de muscles axiaux et de derme dorsal. De plus une importante masse de cartilage s'est formée autour de la notochorde greffée simulant un deuxième corps vertébral. Par conséquent, nous montrons dans ces expériences que la notochorde exerce un effet ventralisant sur le mésoderme paraxial en induisant la

disparition des structures dorsales dérivées du dermomyotome au profit de structures ventrales dérivées du sclérotome. Cet effet est tout à fait comparable à celui produit sur le tube nerveux où la greffe de notochorde induit une ventralisation de territoires latéro-dorsaux.

3.3. Effet de la greffe de différentes portions du tube nerveux

Dans le cas du tube nerveux, il a été montré que la **floor plate** possédait des propriétés similaires à celles de la notochorde. Par conséquent, nous avons décidé d'examiner si cela était aussi le cas pour le mésoderme paraxial. Pour cela, différents cadrans du tube nerveux ont été greffés de la même manière que la notochorde. Nous avons observé que seule la partie ventrale du tube nerveux était capable de produire un effet similaire à celui de la notochorde sur la différenciation du mésoderme paraxial. La greffe de partie dorsale ou latérale du tube n'a pas d'effet sur la formation du dermomyotome. Par conséquent, comme dans le cas du tube nerveux, la **floor plate** est dotée des mêmes propriétés inductrices sur le mésoderme paraxial que la notochorde.

3.4. Modèle d'inductions secondaires dans la partie dorsale de l'embryon

Nos expériences montrent que la **floor plate** et la notochorde produisent *in vivo* des facteurs capables d'induire les cellules du mésoderme paraxial à se différencier en cartilage mais aussi d'inhiber leur différenciation en dermomyotome. Notre hypothèse est que la différenciation de type dorsal (dermomyotome) constitue un phénotype par défaut vers lequel les cellules se différencient en l'absence de facteur inducteur ventral provenant de la notochorde et de la **floor plate**. Ceci est en accord avec le fait que les cellules de la partie latérale du somite qui migrent précocément et échappent ainsi à l'influence de la notochorde et de la floor plate, optent exclusivement pour une différenciation musculaire. Cette hypothèse est aussi en accord avec les expériences d'ablation de notochorde. En effet, si l'ablation est pratiquée suffisamment tôt, le tube neural se différencie sans **floor plate**. On observe dans ce cas la différenciation de myotomes bilatéraux qui fusionnent sous le tube neural. Le devenir du sclérotome dans ces expériences n'a pas été étudié, cependant, nous avons obtenu un cas d'ablation montrant une absence de cartilage dans la région où le tube nerveux est dépourvu de **floor plate**, et où les myotomes fusionnent sous le tube nerveux. Par conséquent, *in vivo*, il est probable que le premier signal inducteur ventral provient de la notochorde et s'exerce dans la région non segmentée de l'embryon. Ce signal est à l'origine de la polarisation dorso-ventrale du tube nerveux qui se traduit par l'apparition d'un nouveau centre inducteur ventral : la **floor plate**. Celle-ci va ensuite induire les autres structures ventrales telles que les motoneurones. Ces deux centres inducteurs pourraient être à l'origine d'un gradient de morphogène responsable de la ventralisation du mésoderme paraxial.

4. GÈNES À HOMEODOMAINES ET DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME NERVEUX ET DU SQUELETTE CHEZ L'EMBRYON DE VERTÉBRÉS

4.1. *Etude de l'expression du gène Quox-1 au cours du développement chez l'oiseau et dans d'autres espèces à l'aide d'un antisérum anti-Quox-1*
(Z.G. XUE, X. XUE et N.M. LE DOUARIN)

Quox-1, un homéogène de caille, a été isolé en 1991 par nos soins à l'aide de la sonde d'ADNc du gène *Antennapedia* (*Antp.*) de drosophile. La séquence de l'homéodomaine de Quox-1 présente 100 % d'homologie avec celle de Hox-A7 de souris et 98 % avec celle d'*Antp.* Cette homologie s'étend à la partie N-terminale de la molécule située en amont de l'homéodomaine. En revanche, dans la région 3' en aval de l'homéodomaine, aucune homologie significative n'a été observée avec aucune séquence publiée. L'expression de ce gène est aussi unique parmi les homéogènes de classe I. La technique d'hybridation *in situ* a révélé que l'expression de Quox-1 est principalement détectée dans la totalité du système nerveux central (SNC) au moins jusqu'au 6^e jour d'incubation chez l'embryon d'oiseau. En particulier, l'expression de Quox-1 est observée dans le cerveau antérieur, y compris le télencéphale et le mésencéphale. Il s'agit d'une caractéristique remarquable de cet homéogène, car aucun des gènes Hox découverts chez la souris et chez l'homme caractérisés par une « homeobox » présentant un haut niveau d'homologie avec l'homéogène *Antp.* de drosophile, n'est exprimé dans la tête en avant du rhombomère 3. Quox-1 est le premier homéogène de type *Antp.* chez les vertébrés, qui soit exprimé dans tout le SNC incluant le cerveau antérieur. Nous avons observé le même type de distribution de l'expression de Quox-1 chez l'embryon de souris et de xénope.

Il nous paraissait très important d'étudier d'une manière plus approfondie l'expression du gène Quox-1 au cours du développement embryonnaire de différentes espèces, en particulier aux stades plus précoces. Des anticorps spécifiques dirigés contre les protéines codées par les homéogènes constituent des outils favorables pour poursuivre cette étude. Nous avons inséré une séquence spécifique de la partie C-terminale de Quox-1 dans le vecteur d'expression pT7. La protéine (environ 11 kd) exprimée par des bactéries contenant un plasmide d'expression sous le contrôle de la T7ARN polymérase a été séparée par électrophorèse sur un gel d'acrylamide/SDS. Un antisérum dirigé contre la protéine Quox-1 a ainsi été obtenu par immunisation chez le lapin. La spécificité de l'anticorps a été contrôlée par analyse biochimique en Western blot. Ces expériences ont montré que l'antisérum anti-Quox-1 reconnaît une seule molécule de 47 kd chez les embryons de caille, de poulet et de souris. L'argument le plus convaincant de la spécificité de l'anticorps est obtenu par comparaison des résultats observés sur coupes en immunocytochimie et en hybridation *in situ*. Nous avons ainsi effectué une série d'expé-

riences en utilisant parallèlement ces deux techniques sur des coupes du même embryon de caille et de souris. Sur coupes parasagittales, nous avons montré que l'accumulation d'ARNm de Quox-1 est localisée tout au long du tube nerveux et également dans le cerveau, y compris le prosencéphale. Le schéma d'expression détecté par immunocytochimie avec l'anticorps anti-Quox-1 est identique à celui qui est fourni par hybridation *in situ*. En effet, les régions dans lesquelles un signal nucléaire est détecté par l'anticorps sont également celles qui contiennent l'ARNm correspondant à Quox-1.

Chez l'oiseau, le marquage initial par l'anticorps est détecté dans le neurectoderme du pli céphalique. Au cours de la formation du tube nerveux et, plus tard dans le développement, l'expression de Quox-1 s'étend progressivement dans tout le SNC. Nous avons également examiné l'expression de Quox-1 dans les cellules de la crête neurale *in vivo* et *in vitro*. Aux stades de 10 à 12 somites, les cellules immunoréactives de la crête neurale céphalique sont très nombreuses. Après le stade de 13 somites, les cellules marquées par l'anticorps sont de plus en plus dispersées dans l'embryon. Quand la crête neurale céphalique ou troncale est mise en culture en milieu défini, les noyaux d'une sous-population de cellules qui se différencient en neurones sont fortement marqués par l'anti-Quox-1. Nous avons observé que le ganglion sensoriel rachidien est le seul dérivé de la crête neurale qui soit marqué par l'anti-Quox-1. L'anticorps anti-Quox-1 peut donc être utilisé comme un marqueur précoce des neurones sensoriels.

Comme la plupart des homéogènes qui s'expriment chez les vertébrés dans le mésoderme segmenté, Quox-1 est aussi activé dans ce tissu. L'expression de Quox-1 dans les somites présente une dynamique spatio-temporelle intéressante. On observe d'abord l'immunoréactivité vis-à-vis de l'anti-Quox-1 dans toutes les cellules somitiques (stade de 20 somites). Ensuite, l'activité du gène Quox-1 se restreint au myotome. Il est intéressant de noter que la plupart des gènes Hox étudiés jusqu'à présent sont plutôt exprimés dans la partie sclérotomale des somites. On observe aussi l'accumulation de la protéine Quox-1 dans les bourgeons des membres.

4.2. Hétérogénéité dorso-ventrale du cartilage vertébral au cours du développement.

(A.-H. MONSORO-BURO, M. BONTOUX, M.-A. TEILLET et N.M. LE DOUARIN)

La polarisation du tube nerveux au cours du développement est sous le contrôle de signaux ventralisants provenant de la notochorde puis de la **floor plate** et de signaux spécifiques de la moitié dorsale du tube neural. Des gènes régulateurs du développement s'expriment en réponse à ces signaux selon un profil polarisé le long de l'axe dorso-ventral du tube nerveux. Des greffes de

notochorde ectopique modifient la polarisation dorso-ventrale du tube nerveux.

Nous avons montré qu'à son tour, le tube nerveux dorsal interagit avec le sclérotome. Les cellules de la **roof plate** expriment le gène *Msx 2-Quox 8* et induisent le mésenchyme susjacent à exprimer lui-même ce gène et à former l'apophyse épineuse de la vertèbre. Nous avons étudié l'influence de la notochorde sur le développement de la partie dorsale de la vertèbre. Nous montrons que des greffes de notochorde en position médio-dorsale inhibent précocément l'expression du gène *Msx 2-Quox 8* dans le tube neural et dans le mésenchyme dorsal. La vertèbre qui se forme à la suite d'une telle greffe ne présente pas d'apophyse épineuse. Dans cette position dorsale, la notochorde joue un rôle inhibiteur sur la chondrogenèse. Ce rôle est inverse de celui de la notochorde greffée en position latérale par rapport au tube nerveux. Des expériences d'ablation précoce de notochorde, résultant en l'absence de polarisation dorso-ventrale correcte du tube nerveux, montrent que l'établissement de l'expression polarisée de *Msx 2* ne dépend pas de la présence d'une notochorde ventrale. Nous en concluons que la partie dorsale de la vertèbre se distingue des parties latéro-ventrales, et se développe à partir du mésenchyme somitique migrant au-dessus de la moelle épinière troncale en dehors de l'influence de la notochorde.

5. ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT DU CERVEAU PAR LA MÉTHODE DES CHIMÈRES EMBRYONNAIRES

5.1. *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-poulet 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 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 dorso-ventral, l'ébauche cérébelleuse provient exclusivement des plaques alaires, c'est-à-dire, des parties latérales du neuroépithélium entre 25 et 120 degrés à partir du plan sagittal. Cette partie du neuroépithélium engendre aussi d'autres structures cérébrales, par exemple les toits optiques au niveau du mésencéphale, et n'est donc pas spécifique du cervelet seulement.

Comme nous l'avions déjà rapporté, la participation mésencéphalique à la formation du cervelet est restreinte à une région en forme de "V" au niveau dorsal médian. Or, la couche granulaire externe est d'origine métencéphalique

dans cette région, comme dans le reste du cervelet. La région rostromédiane du cervelet est donc 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 observer que les cellules de Purkinje migrent radialement vers la périphérie de l'ébauche cérébelleuse tandis que les neurones de Golgi, les cellules de la couche moléculaire et les petites cellules de la couche des cellules de Purkinje migrent de façon centrifuge depuis l'épithélium ventriculaire en suivant des migrations à petites composantes tangentielles, i.e. longitudinales et transversales. Au cours de leur mise en place à partir des plaques alaires métencéphaliques, les cellules de la couche granulaire externe accomplissent 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, i.e., de la mise en place des différentes vésicules céphaliques et de leur différenciation au cours de l'ontogenèse. Nous avons donc entrepris de suivre la mise en place de la zone du neuroépithélium correspondant au territoire présomptif du cervelet depuis le stade de 3 paires de somites. Cette région exprime spécifiquement le produit du gène *En-2*, reconnu par l'anticorps monoclonal 4D9. D'autre part, le gène *Wnt-1* est spécifiquement exprimé dans une bande transversale au niveau du mésencéphale postérieur. Nous avons cloné une partie du gène *Wnt-1* de caille et nous étudions maintenant la régulation éventuelle de l'expression de ces gènes quand le territoire présomptif où *En-2* est exprimé (mésencéphale caudal et métencéphale rostral) est échangé avec la partie du tube neural situé au niveau des deux premiers somites, entre embryons de caille et de poulet. Nos résultats préliminaires indiquent que le territoire prospectif d'expression d'*En-2* est déjà déterminé au stade de 3 somites pour l'expression de ce gène. Nous tentons actuellement d'identifier la nature des dérivés produits par ces greffes ectopiques pour déterminer si une information de position influence la différenciation fonctionnelle de la greffe.

5.2. *F-Epi, un modèle aviaire d'épilepsie généralisée réflexe d'origine génétique* (N.M. LE DOUARIN, M.-A. TEILLET, N. GUY et B. SCHULER en collaboration avec R. NAQUET et G. LE GAL LA SALLE, Institut Alfred-Fessard, CNRS-UPR 2212, Gif-sur-Yvette et C. BATINI, Laboratoire de Physiologie de la Motricité, CNRS-URA 385 et Université Pierre et Marie Curie, Paris)

Une épilepsie généralisée, réflexe, d'origine génétique a été décrite chez le poulet (Crawford, 1970). Il s'agit d'une mutation récessive à pénétrance

complète (F-Epi) apparue spontanément dans la souche Fayoumi. Les crises peuvent être déclenchées par une lumière intermittente (SLI) ou à un moindre degré par différentes formes de stress affectant le système nerveux (e.g. bruit, agitation). Les crises à la lumière se déroulent classiquement en trois phases : alerte, perte d'équilibre, convulsions généralisées. Un électroencéphalogramme (EEG) interictal de type épileptique et une sensibilité aux drogues anticonvulsivantes en ont fait un bon modèle d'épilepsie généralisée. Ces caractéristiques sont en effet semblables à celles de l'épilepsie humaine (Johnson et Tuckek, 1987).

Profitant de la possibilité d'intervenir microchirurgicalement chez l'embryon de poulet et de construire ainsi des chimères ayant tout ou une partie de leur cerveau provenant d'un autre animal (Balaban et al., 1988), nous avons réussi à transférer l'épilepsie photogène chez des poulets normaux par la greffe isotopique, au 2ème jour de l'incubation, de certaines régions du cerveau prélevées sur des embryons génétiquement épileptiques. En collaboration avec R. Naquet et G. Le Gal La Salle, (Teillet et al., 1991) nous avons ainsi démontré que le transfert complet de l'épilepsie photogène est réalisé par la greffe d'au moins le prosencéphale et une partie du mésencéphale. Les caractéristiques EEG interictales (ondes lentes et pointes-ondes) sont transférées avec la greffe du prosencéphale. Dans le cas d'une greffe de prosencéphale seul, les chimères sont sensibles à la SLI (alerte, perte d'équilibre) mais ne développent pas de convulsions. Les chimères ayant reçu des greffes autres que le prosencéphale ne présentent pas l'EEG interictal caractéristique de l'épilepsie et ne présentent aucune réaction de type épileptique à la SLI.

En collaboration avec C. Batini, nous avons étudié l'activité EEG pendant les crises induites par la SLI chez les homozygotes F-Epi et les chimères épileptiques (Guy et al., 1992). Pour éviter les artefacts durant les crises, les animaux sont paralysés par le flaxédil (Galamine Triethiodine) ou immobilisés par des bandages. Qu'ils soient paralysés ou non, tous les animaux épileptiques présentent paradoxalement, quelques secondes après le début de SLI, une désynchronisation transitoire suivie d'un aplatissement du tracé électroencéphalographique. L'électromyogramme des muscles du cou, enregistré conjointement (sur des animaux en contention partielle), révèle l'existence de clonies des muscles du cou au rythme de la stimulation lumineuse. L'EEG ictal des poulets épileptiques est à rapprocher de celui des rongeurs atteints d'une épilepsie audiogène qui présente également une désynchronisation et un aplatissement durant les crises. Ce type d'EEG suggère l'existence de crises du tronc cérébral. Les F-Epi sont cependant capables de faire des crises corticales typiques après administration de métrazol auquel ils sont plus sensibles que les poulets normaux.

En collaboration avec C. Batini (Guy et al., 1993) nous avons étudié l'activité unitaire de neurones de deux structures appartenant au système visuel, le *wulst* (dans le prosencéphale) et le *tectum opticum* (dans le mésencé-

phale) chez des adultes paralysés, épileptiques ou non. Dans le *wulst*, on enregistre chez les épileptiques (F-Epi ou chimères) une activité spontanée en bouffées plus ou moins régulières généralement associées avec les pointes EEG interictales. Pendant la désynchronisation et l'aplatissement accompagnant la SLI, les bouffées disparaissent faisant place à des décharges continues. L'activité en bouffées se rétablit en même temps que les pointes. Chez les poulets non épileptiques, les décharges neuronales sont aléatoires et ne subissent aucun changement sous l'action de la stimulation lumineuse. Dans le *tectum* et les voies tectospinales, l'activité unitaire est peu différente chez les poulets non épileptiques et les poulets épileptiques en période de repos. C'est pendant la SLI qu'apparaissent, exclusivement chez les épileptiques (F-Epi et chimères pro-mésencéphaliques), deux types de neurones, les uns caractérisés par une hyperactivité en bouffées, suivie d'une période d'inhibition, les autres arrêtant toute activité dès le début de la SLI. Sachant que la présence d'un « mésencéphale épileptique » est indispensable chez les chimères pour qu'apparaissent des convulsions après stimulation lumineuse nous avons émis l'hypothèse que le mésencéphale épileptique pouvait inhiber le contrôle cortical et désorganiser ainsi les fonctions motrices.

6. CLONAGE D'UNE FAMILLE DE GÈNE CODANT POUR DES RÉCEPTEURS À ACTIVITÉ TYROSINE KINASE CHEZ L'EMBRYON D'OISEAU
(C. MARCELLE, A. EICHMANN, C. BRÉANT et N.M. LE DOUARIN)

La technique de PCR a été utilisée par C. Marcelle et A. Eichmann pour amplifier et cloner des séquences d'ADN présentant les caractéristiques de protéine-kinases (PKs) à partir d'ARNm de blastula d'embryon de caille et de la crête neurale et du tube neural d'embryons de 2 jours d'incubation (E2). Vingt trois séquences distinctes ont été obtenues. Huit correspondent à des gènes déjà décrits. Les molécules clonées sont de trois catégories : des récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinasique (RTKs) des tyrosine kinases cytosoliques et des sérine/thréonine kinases. Parmi les RTKs la comparaison des séquences avec celles de gènes déjà décrits chez les Mammifères indique que se trouvent le IGF1-R et le PDGF-R α ainsi que l'homologue aviaire d'un gène récemment cloné, *tyro5*, qui appartient à la famille *eph/elk/leck*. Nous avons aussi trouvé un nouveau récepteur au FGF (FGFR-5) et deux nouvelles molécules auxquelles nous attribuons le rôle de récepteur au VEGF (vascular endothelial growth factor). Ces séquences ont fait l'objet d'une étude plus approfondie décrite ci-dessous.

6.1. Deux récepteurs putatifs au VEGF exprimés par les cellules endothéliales vasculaires chez l'embryon d'Oiseau

Ces molécules ont été appelées Quek1 et Quek2 (pour quail endothelial kinases). L'ADNc correspondant a été cloné et montre une homologie impor-

tante avec trois gènes murins et humains : *flk-1*, *KDR* et *flt*. *Flt* a été récemment identifié comme étant le récepteur du facteur mitogénique des cellules endothéliales VEGF. Nous proposons que *Quek1* et *Quek2* remplissent une fonction analogue chez les Oiseaux sur la base de l'homologie de séquence de ces gènes avec *Flt* d'une part et de leur expression par les cellules endothéliales vasculaires. Ces deux gènes sont en effet exclusivement exprimés par ces cellules au stade de la vasculogénèse. Chez l'embryon précoce les transcrits des gènes *Quek1* et *Quek2* sont aussi présents dans des îlots hémangioblastiques du mésoderme où ils pourraient marquer les précurseurs bipotentiels vasculaires et hématopoïétiques.

6.2. *Un cinquième membre de la famille des récepteurs du FGF cloné chez l'Oiseau*

Un nouveau membre de la famille des FGFR, dont quatre molécules, ont été clonées chez les Mammifères a été découvert chez l'Oiseau à la suite de l'expérience d'amplification par PCR décrite plus haut portant sur l'ARNm de blastula d'embryon de caille.

Le clonage du cDNA complet indique que le transcrit primaire peut être l'objet d'un épissage alternatif générant deux récepteurs munis respectivement de deux ou trois domaines de type immunoglobuline (Ig-like). La production de l'une ou l'autre des formes du FGFR5 est l'objet d'une régulation spatio-temporelle stricte, c'est-à-dire qu'elle dépend du tissu et du stade considérés.

D'une manière générale, FGFR5 est exprimé dans l'épiblaste au stade blastula et pendant la gastrulation. Son expression est aussi très forte dans le nœud de Hensen au moment de la formation du mésoderme. Ensuite, à partir de E2,5, FGFR5 est activé dans diverses structures ectomésodermiques. Aucun transcrit n'a été trouvé dans l'endoderme. Aux stades de l'organogénèse, FGFR5 est présent essentiellement dans les myotomes, les muscles striés en général et dans les ébauches cartilagineuses.

Au cours de leur différenciation les myocytes cessent d'exprimer ce gène qui reste cependant actif chez l'adulte dans les cellules satellites du muscle.

La distribution spatio-temporelle des différents types de récepteurs du FGF est donc strictement compartimentalisée au cours du développement. Cette dynamique est probablement responsable de l'action sélective qu'exerce ce facteur largement ubiquitaire sur des types cellulaires bien déterminés à des stades différents du développement.

IMMUNOLOGIE

RÔLE DE L'ÉPITHÉLIUM THYMIQUE DANS L'INDUCTION DE LA TOLÉRANCE AU SOI : ÉTUDE DE L'ÉVENTUELLE IMPLICATION DE L'ÉPITHÉLIUM THYMIQUE DANS LA TOLÉRANCE AUX SUPERANTIGÈNES

(J. SALAÜN, M. COLTEY, V. THOMAS-VASLIN, I. KHAZAL, N. LE DOUARIN en collaboration avec A. COUTINHO et A. BANDEIRA, département d'Immunobiologie, Institut Pasteur)

Le rôle de l'épithélium thymique dans l'induction de la tolérance *in vivo* a été clairement établi grâce à la réalisation de chimères embryonnaires chez les Oiseaux. Notre groupe qui étudie le développement du système immunitaire de la souris, a pu également démontrer la capacité de l'épithélium thymique à induire la tolérance à des greffes tissulaires allogéniques dans cette espèce. Nous nous intéressons actuellement aux mécanismes de cette induction. L'éventuelle implication de l'épithélium thymique dans les phénomènes de délétion et d'anergie clonales a été étudiée dans deux groupes de superantigènes : ceux du Mls d'une part, ceux liés aux molécules de classe II I-E d'autre part.

Dans le premier cas, des souris nude BALB/c (H-2^d, Mls 1^b) sont restaurées par des greffes d'ébauches thymiques prélevées sur des embryons de souche DBA2 (H-2^d, Mls1^a avec élimination de clones de cellules T V β 6). Les animaux restaurés ont un répertoire de cellules T comparable à celui des souris BALB/c restaurées par des ébauches thymiques BALB/c. En particulier les clones V β 6, réactifs aux antigènes Mls1^a ne sont ni éliminés ni inactivés.

Dans la seconde étude, des souris nude C57BL/6 (H-2^b, I-E⁻) sont restaurées avec des ébauches thymiques prélevées sur des embryons BALB/c (H-2^d, I-E⁺ avec élimination des clones V β 11). Les animaux restaurés, tolérants aux greffes de peau BALB/c possèdent un pourcentage important de clones V β 11 qui ne subissent donc pas d'élimination dans le thymus ou à la périphérie.

Dans ces deux types d'expérience, nous montrons donc que l'épithélium thymique, n'intervient pas dans l'élimination des clones de cellules T réactifs aux superantigènes liés au Mls et à I-E. Nous montrons ainsi que tolérance et réactivité aux superantigènes sont des phénomènes dissociés.

La question qui se pose actuellement est de connaître le mécanisme responsable de la tolérance induite par l'épithélium du thymus. Plusieurs observations suggèrent que ce dernier provoque la différenciation de cellules suppressives capables d'inactiver des cellules autoréactives ayant échappé à l'élimination intrathymique. Nous nous orientons actuellement vers la vérification de cette hypothèse en recherchant notamment si la tolérance ainsi induite est

transférable et si oui quel est le type de cellules T capable de transférer la tolérance.

DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DES GONADES

S. MAGRE, V. FRIDMACHER, J. HOFFBECK, O. LOCQUET, S. PERLMAN

Au cours de cette année, nous avons, d'une part continué nos recherches sur l'expression des cytokératines dans les cellules somatiques des gonades en cours de différenciation, d'autre part entrepris un certain nombre d'expériences préliminaires devant nous permettre d'étudier le rôle des hormones (hormone anti-Müllérienne -AMH-, et œstrogènes) dans la différenciation des gonades.

1) Etude de l'expression des cytokératines au cours de la différenciation des gonades.

Nos résultats antérieurs obtenus par immunohistochimie et immunoblotting avaient montré qu'il existe une expression différentielle des cytokératines (CKs) acides 18 et 19 en fonction du sexe et du stade de développement de la gonade de fœtus de rat. Les gonades indifférenciées et les ovaires expriment la CK 19 mais pas la CK 18, alors que les testicules au tout début de leur différenciation coexpriment les CKs 18 et 19 puis n'expriment plus que la CK 18.

Afin de déterminer si la régulation de l'expression des CKs s'établit au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel, nous avons entrepris l'étude des ARNm, par Northern Blotting, RT-PCR et hybridation *in situ*. Les Northern Blots ont été réalisés sur des gonades de fœtus de 20 jours, à l'aide de sondes cDNA pour les CKs 18 et 19 murines, gracieusement fournies par, respectivement, le Dr. Jorcano (Madrid, Espagne) et le Dr. Royal (Montréal, Canada). Les stades antérieurs, compte tenu de la petite taille des gonades foetales, ont été étudiés par hybridation *in situ* à l'aide de sondes rat que nous avons obtenues après élution et sous-clonage des bandes amplifiées par RT-PCR.

Les résultats obtenus ont montré que la régulation de l'expression des CKs 18 et 19 s'établit au niveau transcriptionnel et que le gène de la CK 19 cesse de s'exprimer très précocement au cours de la différenciation testiculaire, quelques heures après l'apparition des premières cellules de Sertoli (premier signe morphologique de l'organogénèse testiculaire).

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Florian Guillou (INRA, Nouzilly) et Marc Le Bert (Lab. Biochimie Cellulaire du Collège de France).

2) Rôle de facteurs diffusibles dans la différenciation des gonades

Dans le cadre des recherches que nous effectuons en collaboration avec l'Unité INSERM U 293 (B. Vigier et J. Y. Picard) sur l'Effet Freemartin et sa reproduction *in vitro* dans des ovaires de rat cultivés en présence d'AMH, nous avons cloné une sonde AMH de rat et nous envisageons d'étudier par hybridation *in situ* si la masculinisation morphologique et physiologique décrite précédemment s'accompagne d'une activation du gène de l'AMH. Quel que soit le résultat obtenu, nous poursuivrons cette étude par l'analyse des facteurs intervenant dans la mise en place et la régulation de la fonction AMH dans le testicule foetal de rat.

Le rôle des stéroïdes et particulièrement des œstrogènes dans la différenciation de la gonade des oiseaux a été abondamment documenté depuis de nombreuses années. Toutefois, les mécanismes moléculaires et cellulaires de leur action sont encore inconnus. Grâce à l'infrastructure du site de Nogent-sur-Marne et grâce à l'aide de Constance Scharff, nous avons entrepris l'étude détaillée des premiers stades de la différenciation sexuelle des gonades de poulet sur une souche possédant un marqueur du sexe génétique (pigmentation de l'œil chez les mâles, œil albinos chez les femelles). Les caractéristiques morphologiques de la différenciation sexuelle étant établies, nous poursuivrons cette étude, en collaboration avec Cl. Pieau (CNRS, Institut J. Monod, Paris 7) par l'analyse des effets que l'administration d'œstrogènes ou d'inhibiteurs d'aromatase (enzyme transformant les androgènes en œstrogènes) provoquera sur la structure de la gonade.

MIGRATIONS CELLULAIRES : L'ATTRACTION CHIMIOTACTIQUE DES CELLULES GERMINALES CHEZ LES OISEAUX (R. DUBOIS ET D. CUMINGE)

Parmi les théories explicatives de la migration des cellules germinales, la plus ancienne semble être le chimiotactisme : c'est le lieu de destination qui dirige à distance les déplacements cellulaires. Dans le contexte conceptuel de l'époque, ce mode d'explication a incontestablement souffert d'un excès de vitalisme. D'inspiration plus nettement mécaniste, la « selective contact guidance » (P. Weiss, 1941) a supplanté le chimiotactisme en bénéficiant au cours de son évolution historique d'aménagements *ad hoc* empruntés au cadre d'une logique à code binaire (notions d'affinités membranaires, d'adhésivité complémentaire, en différentielle, ... etc) ; toutes ces constructions qui décrivent les migrations par les propriétés du substrat, et non par celles du but à atteindre, ont plus cédé aux terminologies de modes passagères qu'elles n'ont innové sur le plan des idées. (cf. Dubois et Cuminge, Arch. Biol. : p. 187-189, 1982).

Actuellement, le « compartiment de migration » (le substrat) connaît un regain de vigueur par le rôle central que les nouveaux schémas lui attribuent dans le déterminisme des migrations cellulaires ; par le jeu complexe des « Cell Adhesion Molecules », des fibronectines et laminine, les cellules sont retenues, libérées, mobilisées, orientées, canalisées vers leurs sites récepteurs. Tout en reconnaissant les avantages descriptifs de ces modèles lorsqu'ils s'appliquent aux processus d'histogenèse des organes, il convient de souligner qu'ils n'expurgent nullement tout relent de vitalisme d'une part, et que d'autre part il paraît abusif d'étendre leurs vertus explicatives aux déplacements orientés de certaines catégories cellulaires.

Par analogie, considérons l'observateur martien de J. Monod (Le hasard et la nécessité, p. 19, 1970) chargé d'étudier les modalités du trafic terrestre. Il serait amené à conférer au revêtement du réseau routier le mécanisme responsable des migrations automobiles. Ne constate-t-il pas que les véhicules égarés en dehors des voies de migration sont ou bien immobilisés, ou bien animés de progressions désordonnées, ou hésitantes, ou chaotiques ? Des mesures précises ne démontrent-elles pas que les modifications du substrat induites par les conditions d'humidité et de température (risque de verglas) entraînent des perturbations considérables des flux de migration ? La perspicacité de l'observateur sera cependant aiguisée par quelques faits troublants ; le même revêtement s'accommode de circulations en sens inverses, les mobiles recouvrent des comportements individuels et autonomes aux carrefours et aux bifurcations ; des expériences de marquage mettent en évidence des singularités, certains mobiles semblant être régulièrement attirés vers les mêmes buts. L'hypothèse d'un mécanisme de télépilotage des trajectoires individuelles mérite d'être examinée. En étudiant les navigations aériennes et maritimes, notre observateur voit dans cette hypothèse la source d'un modèle pertinent. Car avions et bateaux semblent bien emprunter des voies de navigation précises, avoir des comportements identiques sur bien des aspects à ceux des automobiles. Il est pourtant impossible de reconnaître des propriétés moléculaires particulières du substrat sur les itinéraires parcourus. Tout se passe comme si ces déplacements nettement orientés obéissaient à un stimulus de téléguidage exercé par le but à atteindre.

Pour Konrad Lorenz, « toute analogie est vraie » (Discours au Nobel, cités par R. Thom in « Prédire n'est pas expliquer », p. 41, 1991). Ce sont des épithéliums germinatifs et eux seuls qui commandent à distance la mobilité et le pilotage des cellules germinales chez les Oiseaux. Le téléguidage des cellules germinales primordiales (CGP) ne s'exerce spécifiquement que sur cette population cellulaire, les CGP trouvent leur lieu de destination quels que soient les substrats sur lesquels elles progressent. L'attraction exercée par les ébauches gonadiques, à l'exclusion de tout autre organe, diffuse à travers des obstacles poreux ainsi que le démontrent divers dispositifs expérimentaux (R. Dubois, J.E.E.M., 20 : 189-213, 1968). Ce chimiotactisme électif et très

puissant est d'une remarquable efficacité : 95 % des CGP retrouvent le centre attractif (Dubois et Cuminge, Publ. cit. p. 229, 1982). dans les conditions normales du développement, le compartiment de migration (le réseau vasculaire de l'embryon) influe fortement sur les modalités de la migration des CGP, mais il ne la détermine pas (Dubois et Cuminge, Arch. Biol., 93 : 275-310, 1982 ; Arch. Biol., 93 : 382-432, 1982).

Les cellules germinales ne sont pas des « corps d'épreuve inertes » (au sens des physiciens) passivement canalisés vers les futures glandes sexuelles. C'est dans leurs propriétés intrinsèques, non dans celle du substrat, qu'il faut rechercher le mécanisme de leurs déplacements orientés. Les CGP se meuvent dans un champ attractif. « Pour détecter un gradient, les cellules doivent disposer de quelque chose de subtil, il leur faut de la mémoire, le sens de l'orientation » (R. Thom, ouvrage cité, p. 107).

Les complexes glycoprotéiques membranaires des CGP jouent un rôle fondamental dans la détection du « signal attractant » et dans la réponse chimiotactique qui lui est donnée : la concanavaleine A perturbe les facultés d'orientation des cellules germinales sans inhiber les mobilités cellulaires individuelles. C'est par l'oblitération biochimique des sites récepteurs du signal chimiotactique et le brouillage des mécanismes d'orientation que la colonisation des ébauches gonadiques échoue (Dubois et Cuminge, Arch. Biol., 95 : 347-410, 1984). La concanavaleine A marquée par la peroxydase (SIGMA) démontre une nette affinité pour les CGP auxquelles elle se lie préférentiellement. Il a été possible de définir les conditions de concentration et de temps d'incubation dans les milieux réactionnels qui permettent un marquage quasi électif des cellules germinales sur les préparations histologiques (couplage mis en évidence par la réaction de coloration DAB, Cuminge et Dubois, résultats non publiés).

En association avec cette technique, nous avons tenté de préciser le rôle des complexes glycoprotéiques dans l'activité migratrice des CGP en mettant en œuvre un inhibiteur de la glycosilation des protéines, la tunicamycine (SIGMA). Des difficultés majeures se sont opposées à l'utilisation de cette molécule en embryologie expérimentale ; de nombreuses raisons rendent hasardeuse toute interprétation biologique des résultats obtenus. La tunicamycine s'est révélée être une substance d'une grande toxicité. A des concentrations infinitésimales (de l'ordre du 1/10 de $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) elle provoque en quelques heures l'arrêt cardiaque et l'atrophie du réseau vasculaire des blastoderms explantés. Dans ces conditions, toute mesure se rapportant à l'étude de la migration des cellules germinales est illusoire. En culture organotypique, les régions gonadiques explantées sur des milieux de culture enrichis en tunicamycine ($1/10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) sont totalement désorganisées en quelques heures. La puissance toxique de la molécule est telle que tissus et épithéliums subissent une sévère dilacération biochimique et montrent des signes évidents de nécroses.

L'extrême cyto-toxicité de la tunicamycine se traduit à l'échelle moléculaire et cellulaire par un spectre d'actions si étendu qu'il ne permet pas de localiser correctement les effets biologiques strictement liés aux propriétés de l'inhibiteur des glycosilations. Par cet exemple, on voit comment une substance dont l'action spécifique est bien connue dès lors qu'elle concerne un mécanisme moléculaire pur et isolé *in vitro*, se révèle être d'un emploi périlleux lorsqu'elle est mise à l'épreuve dans l'étude de systèmes biologiques complexes. Il y a donc un acquis positif à retenir d'échecs expérimentaux localisés à la frontière du biochimique et du biologique.

ACTIVITÉS DIVERSES

Nicole LE DOUARIN

Distinguished Lectures

1992

Lecture Fondation Alsace, Espace Européen des Sciences et des Arts sur le thème « Xénogreffes » Strasbourg, 29 juin-2 juillet.

Plenary Lecture Seconde Convention Nationale del Gruppo italiano per lo studio della Neuromorfologia. Santa Margherita Ligure 3-4 octobre.

Plenary Lecture at the International Symposium on fetal and neonatal neurology, Tours, 7-10 octobre.

Lecture at the Centennial Celebration of the University of Chicago : Symposium on Cell Interaction in Development. A Tribute to Aron Moscona. The University of Chicago, October 9-10.

1993

Lecture au Joint Meeting Anatomische Gesellschaft and Nederlandse Anatomen vereniging, Düsseldorf, Allemagne, mars.

Lecture au 21st International Congress of Neurovegetative Research, Bologne, Italie, avril.

Opening Lecture Medulloblastoma 93, Sixth International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology, Hôpital des Enfants (La Timone) Marseille, 12-15 juin.

Lecture au Max Planck Institute de Tübingen, dans le cadre des « Montagskolloquium », Tübingen, 21 juin.

Séminaires

1992

- Séminaire à la Fondation « Transplantations », Strasbourg, 19 septembre.
- Séminaire à la Société Belge de Culture des Tissus. Bruxelles, 30 septembre.

1993

- Séminaire au National Institute of Immunology à New Delhi, Invitation du Pr. Talwar, 15 février.
- Séminaire au Laboratoire d'Etude des Mécanismes Moléculaires et Cellulaires de l'Embryogenèse. Invitation du Dr. A.M. Duprat, Université Paul Sabatier, Toulouse, 4 juin.

Conférences sur invitation à des colloques, symposiums, congrès

1992

- IVth International Symposium on Neural Transplantation : Embryonic neural chimeras to study the development of the nervous system. Washington, 12-16 juillet.
- The International Society for Differentiation : Cellular programmes for Growth, differentiation and neoplasia Helsinki, 19-23 juillet.
- Avian, Immunology Research Group -Session : Ontogeny and lymphoid Development, Tours Nouzilly 31 août-2 septembre.
- Sloan Kettering Cancer Center : Third Robert Steel Foundation International Symposium : Genetic and Cellular Events contributing to the normal development, differentiation and organization of the central nervous system, New York, 28-30 octobre.

1993

- Fondation Marcel Mérieux et Institut des Sciences du Vivant : « Xéno-transplantation » Annecy, 3-5 mars.
- Workshop on Craniofacial Morphogenesis, University of Iowa, Iowa City, USA, April 25-28.
- Second International Workshop on the *Genetic Control of Vertebrate Development* European Science Foundation. Kolybari, Crête, 3-5 mai.

— Entretiens « Science et Défense » organisé par la DGA, Ministère de la Défense, sur le thème « Biotechnologies dans les Sciences de la Vie » Immunoprophylaxie, Paris 11-12 mai.

Organisation de Symposiums

— Mars 1993 : Symposium regroupant les séminaires de la chaire de Biochimie Cellulaire (P^r François GROS) et ceux de la Chaire d'Embryologie Cellulaire et Moléculaire, organisés conjointement avec le P^r Fr. Gros.

— Juillet 1993 : Symposium organisé conjointement avec Pr. François GROS pour le lancement de la nouvelle série III des Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences, sur « Les Mécanismes du Développement ».

Direction de thèse

— Direction de la thèse de Jean-Léon Thomas, « Etude oncogénique et biochimique de deux protéines GRL1 et GRL2, marqueurs des granules sécrétoires des cellules à sécrétion régulée, chez le poulet. Thèse de doctorat de l'Université Paris VII soutenue le 18 déc. 1992.

Distinction

Membre honoraire étranger de l'Académie Royale de Médecine de Belgique, 1993.

Nomination

Reviewing Editor of SCIENCE, 1993.

ACTIVITÉS DIVERSES

Catherine DULAC

M^{lle} Catherine DULAC, Maître de Conférences au Collège de France, effectue actuellement une mission temporaire chez le P^r Richard Axel au Howard Hughes Medical Institute à New York.

LISTE DES PUBLICATIONS

Développement du système nerveux

1992

BARBU M., POURQUIÉ O., VAIGOT P., GATEAU G. and SMITH J. (1992). Phenotypic plasticity of avian embryonic sympathetic neurons grown in a chemically defined medium. Direct evidence for noradrenergic and cholinergic properties in the same neuron. *J. Neurosc. Res.*, 32, 350-362.

COULY G., COLTEY P. and LE DOUARIN N.M. (1992) The developmental fate of cephalic mesoderm in quail-chick chimeras. *Development*, 114, 1-15.

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

GUY N., TEILLET M.-A., SCHULER B., LE GAL LA SALLE G., LE DOUARIN N.M., NAQUET R. and BATINI C. (1992). Pattern of electroencephalographic activity during light induced seizures in genetic epileptic chickens and brain chimeras. *Neuroscience Letters*, 145, 55-58.

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.

LE DOUARIN N.M. and DULAC C. (1992). Influence of the environment on the development of the enteric nervous system from the neural crest. In « Advances in the innervation of the gastrointestinal tract ». G.E. Holle *et al.* eds., *Elsevier Science Publishers*. 3-17.

LE DOUARIN N.M., DUPIN E., BAROFFIO A. and DULAC C. (1992). New insights into the development of neural crest derivatives. *Int. Rev. Cytol.*, 138, 269-314.

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 », Steryl A. Scott ed., *Oxford University Press*, New York, USA, 143-170.

MARCELLE C. and EICHMANN A. (1992). Molecular cloning of a family of protein kinase genes expressed in the avian embryo. *Oncogene*, 7, 2479-2487.

NATAF V. and MONIER S. (1992). Effect of insulin-like growth factor I on the expression of the catecholaminergic phenotype by neural crest cells. *Dev. Brain Res.*, 69, 59-66.

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

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

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.

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

TAKAHASHI Y., MONSORO-BURO A.-H., BONTOUX M. and LE DOUARIN N.M. (1992). A role for QUOX-8 in the establishment of the dorsoventral pattern during vertebrate development. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 10237-10241.

XUE, ZHI-GANG, XUE X.J., FAUQUET M., SMITH J. and LE DOUARIN N.M. (1992). 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.*, 69, 23-30.

1993

CAMERON-CURRY P., DULAC C. and LE DOUARIN N.M.. Negative regulation of Schwann cell myelin protein gene expression by the dorsal root ganglionic microenvironment. *Europ. J. Neurosci.* 5, 594-604.

COULY G., COLTEY P. and LE DOUARIN N.M. (1993). The triple origin of skull in higher vertebrates. *Development*, 117, 409-429.

CUADROS M.A., MARTIN C., COLTEY P., ALMENDROS A. and NAVASCUÉS J. (1993). First appearance, distribution and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J. comp. Neurol.*, 330, 113-129.

GUY N.T.M., BATINI C., NAQUET R and TEILLET M.-A. (1993). Avian photogenic epilepsy and brain chimeras : neuronal activity of the prosencephalon and the mesencephalon. *Exp. Brain Res.*, 93, 196-204.

LE DOUARIN N.M. (1993). Embryonic neural chimeras in the study of brain development. *Trends in Neurosciences*, 16, n° 2, 64-72.

LE DOUARIN N.M. and DUPIN E. (1993). Cell lineage analysis in neural crest ontogeny. *J. Neurobiol.*, 24, n° 2, 146-161.

LE DOUARIN N.M., TAN K., HALLONET M. and KINUTANI M. (1993). Studying brain development with quail-chick neural chimeras. *Acta Anatomica Nipponica*, 68, 152-161.

NATAF V., MERCIER P., ZILLER C. and LE DOUARIN N.M. (1993). Novel markers of melanocyte differentiation in the avian embryo. *Exp. Cell Res.*, 207, 171-182.

POURQUIÉ O., COLTEY M., TEILLET M.-A., M., ORDAHL C. and LE DOUARIN N.M. (1993). Control of dorso-ventral patterning of the somitic derivatives by notochord and floor plate. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 5242-5246.

SMITH J., VYAS S., GARCIA-ARARAS J.E. (1993). Selective modulation of cholinergic properties in cultures of avian embryonic sympathetic ganglia. *J. Neurosci. Res.*, 34, 346-356.

ZILLER C. and LE DOUARIN N.M. (1993). The neural crest in nerve development. In « Peripheral neuropathy », P.J. Dyck and P.K. Thomas eds., 3rd edition, *W.B. Saunders Company*, 230-242.

Sous presse ou Soumis

DUPIN E. and LE DOUARIN N.M. Culture of avian neural crest cells. In « Essential Developmental biology : a practical approach ». C.D. Stern and P.W.H. Holland eds., *Oxford University Press*. (sous presse)

DUPIN E., MAUS M. and FAUQUET M. Regulation of the quail tyrosine hydroxylase gene in neural crest cells by cAMP and β -adrenergic ligands. *Dev. Biol.* (sous presse).

HALLONET M.E.R. and LE DOUARIN N.M. Tracing neuroepithelial cells of the mes- and metencephalic alar plates during cerebellar ontogeny in quail-chick chimeras. *Europ. J. Neurosci.* (sous presse).

LAHAV R., ZILLER C., LECOIN C., NATAF V., MARTIN F.H., CARNAHAN J.F., LANGLEY K.E., BOONE T.C. and LE DOUARIN N.M. Effect of *steel* gene product on melanogenesis in avian neural crest cell cultures. (sous presse)

LE DOUARIN N.M. Introduction. In « Essential Developmental biology : a practical approach ». C.D. Stern and P.W.H. Holland eds., *Oxford University Press*. (sous presse).

LE DOUARIN N.M. What are the developmental relationships between the neural crest and the polypeptide hormone secreting cells ? In « Embryonic origin of APUD cells. The current position » B. Kramer and B. Rawdon eds. *Festschrift Pr. A. Andrews* (sous presse).

LE DOUARIN N.M., ZILLER C. and COULY G.F. Patterning of neural crest derivatives in the avian embryo : *in vivo* and *in vitro* studies. *Dev. Biol.* (sous presse).

PRADOS J., PENNA-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 (soumis).

ROTHMAN T.P., LE DOUARIN N.M., FONTAINE-PÉRUS J.C. and GERSHON M.D. Colonization of the bowel by neural crest-derived cells remigrating from foregut backtransplanted to vagal or sacral regions of host embryos. *Developmental Dynamics.* (sous presse).

SEXTIER-SAINTE-CLAIRE DEVILLE F., ZILLER C. and LE DOUARIN N.M. Developmental potentials of enteric neural crest-derived cells in clonal and mass cultures. (soumis).

XUE Z.-G., JIN XUE X. and LE DOUARIN N.M. Quox-1, an *Antp*-like homeobox gene of the avian embryo : a developmental study using a Quox-1 specific antiserum. *Mech. of Dev.* (sous presse).

ZILLER C., MIRABEL A.M., VANDENBUNDER B. and FAUQUET M. The tyroxine hydroxylase gene is expressed in endoderm and pancreas of early quail embryos. (soumis).

Développement du système immunitaire

1992

BANDEIRA A., COUTINHO A., BURLIN-DEFRANOUX O., KHAZAL 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.

CORBEL C., CORMIER F., POURQUIÉ O. and BLUESTEIN H. (1992). BEN, a novel surface molecule of the immunoglobulin superfamily on avian hemopoietic progenitor cells shared with neural cells. *Exp. Cell Res.*, 203, 91-99.

CUADROS M.A., COLTEY P., NIETO M.C. and MARTIN C. (1992). Demonstration of a phagocytic cell system belonging to the hemopoietic lineage and originating from the yolk sac in the early avian embryo. *Development* 115, 157-168.

LACOSTE-ELEAUME A.S., BLEUX C., CORBEL C., CARRIERE D., PONCELET P., KANELLOPOULOS J. and KANELLOPOULOS-LANGEVIN C. (1992). A new

marker on chicken hematopoietic cells is defined by a monoclonal antibody raised against a V λ chain of the TCR. *Developm. Immunol.*, 2, 273-284.

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

SALAÜN J., BANDEIRA A., KHAZAAL I., BURLIN-DEFRANOUX O., THOMAS-VASLIN V., COLTEY M., LE DOUARIN N.M. and COUTINHO A. (1992). Transplantation tolerance is unrelated to superantigen-dependent deletion and anergy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 10420-10424.

1993

CUADROS M.A., MARTIN C., COLTEY P., ALMENDROS A. and NAVASCUÉS J. (1993). First appearance, distribution and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J. comp. Neurol.*, 330, 113-129.

DIETERLEN-LIÈVRE F. and LE DOUARIN N.M. (1993). The use of avian chimeras in developmental biology. In « Manipulation of the avian embryo », R. Etches and A.M. Verrinder Gibbins eds., *CRC Press*, chap. 7, 103-119.

EICHMANN A., MARCELLE C., BRÉANT C. and LE DOUARIN N.M. (1993). Two novel molecules related to the VEGF-receptor are expressed in early endothelial cells during avian embryonic development. *Mech. of Develop.*, 42, 33-48.

THOMAS J.-L., POURQUIÉ O., COLTEY M., VAIGOT P. and LE DOUARIN N.M. (1993). Identification in the chicken of GRL1 and GRL2 : two granule proteins expressed on the surface of activated leukocytes. *Exp. Cell Res.* 204, 156-166.

Sous presse ou soumis

CORBEL C., POURQUIÉ O., CORMIER F. and BLUESTEIN H.G. BEN, a surface glycoprotein of the immunoglobulin superfamily on avian hemopoietic progenitor cells and activated T lymphocytes shared with neural cells. In « Avian Immunology Research Group », ed. INRA, Paris (sous presse).

COUTINHO A., SALAÜN J., CORBEL C., BANDEIRA A. and LE DOUARIN N.M. The role of thymic epithelium in the establishment of transplantation tolerance. *Immunol. Rev.*, n° 133 (sous presse).

DIETERLEN-LIÈVRE F. and LE DOUARIN N.M. Developmental rules in the hemopoietic and immune systems of birds : how general are they ? In « Semi-

nars in *Developmental Biology : early hematopoietic development* ». *Academic Press* (soumis).

FUCS R., SALAÜN J., VAIGOT P., COUTINHO A. and LE DOUARIN N.M. Persistence and expansion capacity of T cells derived from the first wave of hemopoietic cells colonizing the thymic rudiment (soumis).

LE DOUARIN N.M. Rôle du thymus dans la reconnaissance du soi et du non-soi. *Entretiens Science et Défense* 1993. « Biotechnologies dans les Sciences de la Vie » (sous presse).

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).

Différenciation sexuelle des gonades

1992

FRIDMACHER V., LOCQUET O. & MAGRE S. (1992). Differential expression of acidic cytokeratins 18 and 19 during sexual differentiation of the rat gonad. *Development*, 115 : 503-517.

FRIDMACHER V., GUILLOU F., FLECHON J. & MAGRE S. (1992). Differential expression of mRNAs for Cks 18 and 19 according to the sex of the fetal rat gonad. (résumé) 7th. International Conference of the International Society of Differentiation (19-23 July 1992, Helsinki, Finlande).

1993

MAGRE S. La différenciation du sexe (1993). In : « Hormones et Grandes Fonctions », *Ellipses*, Paris, tome 2, pp : 390-399.

Sous presse ou soumis

JOST A., and MAGRE S. Sexual differentiation. In : « Reproduction in Mammals and Man », *Ellipses*, Paris (sous presse).

Cellules germinales

1992

D. CUMINGE et R. DUBOIS. (1992). L'origine embryologique de la lignée germinale des Oiseaux : étude expérimentale chez le Poulet. *Eur. Arch. Biol.*, 103, 1-15.