

Embryologie cellulaire et moléculaire

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

Le cours de cette année s'est déroulé en deux parties. L'une comportant six leçons faites au Collège de France, a porté sur le contrôle génétique du développement du système nerveux chez les Invertébrés. Le modèle d'étude considéré a été la *Drosophile* qui se prête particulièrement bien aux recherches de génétique moléculaire du développement.

La seconde partie du cours (6 leçons) a été délivrée à la Fondation Gulbenkian à Lisbonne à la suite d'un accord passé entre le Collège de France et cette institution. Elle a porté sur l'analyse du développement d'une structure multipotente de l'embryon de vertébrés, la crête neurale d'une part, et sur les perspectives qu'offre l'utilisation des chimères embryonnaires dans l'étude de l'ontogenèse du cerveau.

LE CONTRÔLE GÉNÉTIQUE DU DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME NERVEUX ÉTUDIÉ CHEZ LA DROSOPHILE

Après que dans les années 50 et 60, la structure de la molécule d'ADN, le code génétique et la relation entre les gènes et protéines aient été élucidés, puis que l'existence de systèmes régulateurs de l'activité des gènes aient été découverts par Monod, Jacob et Lwoff, il est apparu que l'analyse génétique du développement embryonnaire devait permettre de démontrer les mécanismes qui président à la construction d'un organisme à partir d'une cellule unique, l'œuf fécondé.

Cette vision s'est révélée exacte à peu près vingt ans plus tard, lorsque Nusslein-Volhard, Weischaus et leurs collaborateurs, ont montré qu'il est possible d'identifier pratiquement tous les gènes nécessaires à l'accomplisse-

ment d'un processus biologique aussi compliqué que la mise en place du plan général de l'organisme c'est-à-dire la détermination des axes de polarité et la segmentation, chez la *Drosophile*.

Cependant, même complexes, ces phénomènes paraissent simples au regard du développement et du fonctionnement du système nerveux. Le comportement d'un organisme, manifestation de l'activité de son système nerveux, est très éloigné de l'activité élémentaire des gènes et, même si des paradigmes tels que un gène-une enzyme existent dans ce domaine, ils ne paraissent pas faciles à mettre en évidence. C'est en particulier grâce à des pionniers tels que Sydney Brenner et Seymour Benzer que l'analyse génétique du développement du système nerveux a vu le jour. Ils décidèrent en effet vers le milieu des années 60 de se consacrer à la recherche de modèles favorables à une telle entreprise. Beaucoup de chercheurs cependant restaient, à cette époque, dubitatifs quant à l'efficacité d'une approche aussi réductionniste.

S. Benzer en 1967 propose l'utilisation de la *Drosophile* et de mutations provoquées expérimentalement pour sélectionner des mutants dont le **comportement** est modifié et sur lesquels on pourra rechercher les anomalies morphologiques ou fonctionnelles affectant le système nerveux.

Selon lui : « In principle it should be possible to dissect the genetic specification of behaviour much in the same way as was done for biosynthetic pathways in bacteria or for bacteriophage assembly. »

Sidney Brenner s'est adressé à un autre matériel, le nématode *Coenorhabditis elegans*, qu'on peut produire en grand nombre et dont le comportement est simple comme l'est la structure de son système nerveux.

De nombreuses études sur les composants génétiques du comportement avaient été réalisées auparavant par le croisement de lignées sélectionnées d'une même espèce ou même d'animaux d'espèces différentes, suivi de l'observation des caractères interagissant dans les hybrides et ségrégeant dans la descendance. Mais ces expériences faisaient intervenir de nombreuses différences génétiques et les résultats étaient difficiles à interpréter.

L'originalité de l'approche de S. Brenner et S. Benzer était de provoquer la mutation d'un gène isolé sur des souches génétiquement homogènes (i.e. des animaux isogéniques).

Le modèle *Drosophile* a sans doute été le plus fécond pour l'étude du système nerveux. Celle-ci a bénéficié des résultats obtenus sur la mise en place des axes de polarité et la segmentation. Il est en effet apparu que chaque processus biologique complexe nécessite la mise en route de **gènes multiples** qui interviennent d'une manière séquentielle. D'où la nécessité de connaître tous les acteurs intervenant dans un phénomène donné pour comprendre les mécanismes qui le gouvernent.

Parmi les éléments qui ont permis une avancée importante se trouve la capacité de cloner les gènes ainsi mis en évidence. En effet, les études moléculaires sont complémentaires des analyses génétiques. On peut ainsi construire des modèles dans lesquels chaque gène, en fonction du type de molécule qu'il produit, se voit assigner un rôle dans la cascade d'événements qui mène à l'édification d'une structure fonctionnelle donnée. Si un gène dans une cellule A code pour une protéine membranaire douée des caractéristiques d'un récepteur, on cherche quel est son ligand dans les cellules avec lesquelles la cellule A est supposée interagir. Si le gène code pour un facteur de transcription on peut lui assigner le rôle de gène sélecteur et ainsi de suite.

Le clonage et la manipulation des gènes de *Drosophile* sont devenus au cours de ces dernières années de plus en plus faciles et efficaces. On peut identifier par mutagenèse puis cloner un gène de *Drosophile* sans connaître la nature chimique du produit de ce gène. La découverte par Rubin et Spradling de l'**élément P** et de l'usage qu'on peut en faire a été d'une grande importance à cet égard.

La recherche d'un système sur lequel analyser l'effet des mutations

Les principaux travaux ont été réalisés sur les systèmes nerveux périphériques embryonnaire et adulte et sur l'œil de la *Drosophile*.

Le système nerveux périphérique de la *Drosophile* comprend des constituants sensoriels et moteurs organisés d'une manière métamérique. Les neurones sensoriels disposés à la périphérie, en relation avec l'épiderme, sont à l'origine d'un arc réflexe dont le siège se situe dans chaque segment et comprend le ganglion et les muscles segmentaires. Par ailleurs, les ganglions sont réunis entre deux segments par des interneurons dont les axones s'étendent le long de l'axe antéro-postérieur.

Les différents constituants du système nerveux périphérique ont été décrits en détail chez la larve et l'adulte.

Ils se répartissent en trois types d'organes dont l'emplacement dans chacun des segments et dans la tête de la larve et de l'adulte est strictement déterminé génétiquement. Ainsi chez l'adulte, les soies sensorielles qui sont de deux sortes, les microchaetes et les macrochaetes, constituent des critères de reconnaissance des espèces et sont utilisées en taxonomie.

Chez la larve, on distingue les organes sensoriels externes (es), les organes chordotonaux (cho) et les cellules sous-épidermiques multipolaires.

Analyse génétique du développement du système nerveux périphérique

De nombreux résultats ont été obtenus dans ce domaine chez la larve par deux chercheurs, Lily et Yuh Jan et leurs collaborateurs, du Département de Physiologie et Biochimie de l'Université de Californie à San Francisco. L'idée

directrice de la recherche qu'ils ont entreprise est de provoquer des mutations et de rechercher celles qui affectent le développement du système nerveux périphérique de la larve. Beaucoup de ces mutations sont léthales, mais la mort survient dans la plupart des cas à un stade tardif laissant la possibilité d'analyser l'effet des mutations affectant le système nerveux. Certaines mutations affectant le système nerveux périphérique sont connues depuis longtemps, tel est le cas de « *scute* », connu depuis 1916, qui perturbe le développement de certaines soies sensorielles. D'autres allèles de ce qui devait devenir le complexe *achaete-scute* (AS-C) ont été isolés après que Müller en 1920 ait découvert l'action mutagène des RX.

L'histoire moderne de AS-C commence en 1975 avec Garcia-Bellido (Madrid) qui décida d'analyser l'effet de ces gènes du double point de vue de la génétique et du développement.

Beaucoup des résultats qui ont contribué à écrire l'histoire qui fait l'objet de ce cours ont été obtenus par l'école de Madrid, le laboratoire de Campos-Ortega (Cologne), le groupe de A. Ghyssen et C. Dambly-Chaudière à Bruxelles et, pour les résultats les plus récents, par L. et Y. Jan à San Francisco, S. Artavanis-Tsakonas (Yale University) notamment.

L'hypothèse de travail qui a présidé aux recherches sur le développement du système nerveux de la Drosophile est que ce développement est progressif et que chaque étape fait intervenir des groupes ou des gènes différents qui agissent à des étapes séquentielles de l'ontogenèse.

Certains gènes cependant (par ex. Notch) peuvent intervenir à plusieurs étapes différentes. Le modèle général auquel on aboutit est le suivant :

Chaque organe des sens dérive d'une seule cellule ectodermique : la cellule mère sensorielle. La détermination et la spécification de cette cellule sont le résultat de l'intervention de gènes qui interagissent entre eux ainsi que d'interactions entre cellules.

Les gènes qui sont activés en premier lieu définissent un territoire ectodermique dans lequel les cellules s'orientent vers une destinée neurale. Ils sont pour cette raison appelés **gènes proneuraux** car ils correspondent aux stades de la prédétermination de l'ectoderme vers une destinée neurale.

Les territoires ainsi définis ne sont pas situés au hasard, leur emplacement est défini par les gènes établissant les coordonnées du corps de l'embryon ou plus tard des disques imaginaux. Il s'agit des **gènes de « prepatter »** définissant les axes antéro-postérieur et dorsoventral et des gènes de segmentation.

Les gènes proneuraux définissent donc des clusters proneuraux au sein desquels seule une cellule deviendra neuronale et sera la **cellule-mère sensorielle** de l'organe périphérique considéré. Il s'agit là de gènes de détermination.

Cette cellule exerce ensuite une inhibition médiée par des contacts cellulaires sur les autres cellules des territoires préneuraux. Ce stade correspond à l'**inhibition latérale**. On sait en effet depuis les travaux de Doe et Goodman (1985) que l'ablation au laser de la cellule-mère neuronale aura pour effet le recrutement d'une autre cellule dont le développement neural était donc inhibé.

La mutation des gènes qui interviennent à ce stade provoque une hyperplasie du système nerveux et la transformation de toutes les cellules des zones préneurales en neurones aux dépens de l'épiderme. On les appelle pour cette raison **gènes neurogéniques**.

Ils sont au nombre de six : Notch, Delta, Enhancer of split, master mind, big brain and neuralised.

Enfin l'identité de chacune des cellules de l'organe sensoriel dérivant de la cellule mère sensorielle est contrôlée par un **gène de lignage**.

La suite du cours a consisté à analyser en détail les expériences ayant conduit au schéma désormais classique où une cascade de gènes, dont les produits ont été clonés et les protéines caractérisées, interviennent à chacune des étapes ainsi définies. Une attention particulière a été apportée aux rôles respectifs des produits des gènes Notch et Delta codant pour un récepteur (Notch) et son ligand (Delta). Les interactions entre les produits de ces gènes sont décisives pour la réalisation des phénotypes neuronaux et épidermiques. Ils ont été très clairement analysés par le D^r P. Simpson à Strasbourg par la méthode des recombinaisons somatiques.

Il faut noter que ce schéma sert de modèle pour l'étude du développement du système nerveux chez les Vertébrés dont le contrôle génétique fera l'objet du cours de l'année prochaine.

Le développement des ommatidies chez la Drosophile

L'œil à facettes des Insectes est constitué d'unités appelées ommatidies dont l'arrangement est d'une remarquable régularité et dont le développement a été l'objet d'une série d'études du plus haut intérêt à l'échelle cellulaire et moléculaire.

L'ommatidie elle-même consiste dans l'assemblée précise de 8 cellules photoréceptrices et de cellules accessoires.

La mise en place de ce complexe a été décrit avec une grande précision dans le disque oculaire et la plupart des gènes qui contrôlent la différenciation et l'arrangement de ces cellules ont été découvertes grâce à l'existence de mutations affectant l'une ou l'autre des étapes du développement de l'œil.

On a insisté particulièrement sur la mise en place du photorécepteur R7, particulièrement affecté par la mutation du gène « *sevenless* », découvert par

S. Benzer, qui s'est révélé être le ligand d'un récepteur (« boss ») situé sur une cellule voisine. En l'absence du produit de *sevenless*, le précurseur de R7 ne se différencie pas en photo-récepteur mais en cône.

Ceci correspond à une mutation de type homéotique où le phénotype « cône » apparaît « par défaut » du signal normalement transmis par le récepteur codé par le gène *sevenless*. Les travaux de G. Rubin (Berkeley) et de S. Benzer (Pasadena) ont notamment été analysés.

La conclusion du cours, mentionnant les travaux réalisés chez les Vertébrés à partir des enseignements fournis par la Drosophile, annoncent le sujet qui sera traité en 1994-1995.

Le cours délivré à la Fondation Gulbenkian a consisté dans une mise au point sur les recherches réalisées dans plusieurs laboratoires sur le développement de la crête neurale. Il a porté notamment sur le rôle prépondérant joué par la crête neurale dans la genèse des structures céphaliques chez les Vertébrés. Le contrôle génétique de l'organisation des structures hypobranchiales rhombencéphaliques par les homéogènes de type *Hox* a été envisagé en détail. Le développement du système nerveux périphérique (SNP) a fait l'objet d'un exposé de deux heures. Les points envisagés concernaient notamment les progrès récents réalisés grâce aux mutations provoquées chez la souris, montrant le rôle des neurotrophines et de gènes du type AS-C sur la différenciation des divers types de neurones du SNP chez les Vertébrés.

Dans une troisième partie, les possibilités offertes et les résultats déjà obtenus grâce à l'utilisation des chimères embryonnaires dans l'étude du développement du cerveau ont été exposés.

N.L.D.

SÉMINAIRES

Les séminaires se sont déroulés les 19 et 26 Janvier et le 2 Février 1994 (2 heures par séance) sur le sujet suivant : « **Développement et évolution des différentes formations squelettiques des Vertébrés** ».

P^r A. de RICQLES (*Université Paris VII*) :
« Origine et Evolution du squelette des vertébrés : apports récents de la Paléontologie et de la Biologie Comparée ».

D^r Moya Meredith SMITH (*Guy's and St. Thomas's Hospital, London*) :
« The role of neural crest in a developmental model for evolution of the early vertebrate dermal skeleton »

D^r Anne-Hélène MONSORO-BURO (*Institut d'Embryologie Cellulaire et Moléculaire, Nogent-sur-Marne*) :

« Rôle des gènes de la famille Msx dans le développement de certaines structures squelettiques des vertébrés ».

P^r Peter THOROGOOD (*Institute of Child Health, London*) :

« Building a skull - a problem in phylogeny and ontogeny ».

D^r Olivier POURQUIÉ (*Institut d'Embryologie Cellulaire et Moléculaire, Nogent-sur-Marne*) :

« Rôle des organes axiaux dans la formation de la colonne vertébrale ».

Le Professeur David SABATINI, Chairman du Département de Biologie Cellulaire de l'École de Médecine de l'Université de New York, a donné quatre leçons dans le cadre d'une invitation sur une chaire d'Etat sur le sujet suivant :

The cellular endomembrane system : a labyrinthine distribution network for protein trafficking :

1. General concepts : fundamental mechanisms, and experimental approaches.
2. The endoplasmic reticulum : fountainhead of resident and itinerant proteins.
3. Passage of proteins to and through Golgi apparatus.
4. Beyond the trans Golgi network.

RÉSUMÉ DE L'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE

NEUROEMBRYOLOGIE

LA CRÊTE NEURALE DES VERTÉBRÉS :

1. MISE EN ÉVIDENCE DES CAPACITÉS DE DIFFÉRENCIATION DES CELLULES DE LA CRÊTE NEURALE EN CULTURES CLONALES

1.1. *Influence de l'acide rétinoïque sur l'expression des phénotypes issus des cellules de crête neurale*

(E. DUPIN et N.M. LE DOUARIN)

S'il a été clairement établi que l'environnement joue un rôle crucial dans le choix des phénotypes exprimés par les cellules de crête neurale, les facteurs impliqués dans ce processus sont en revanche mal connus. Un dérivé de la vitamine A, l'acide rétinoïque, qui possède une activité morphogénétique au cours du développement du membre, est capable de perturber le développement de la crête neurale *in vivo*, et pourrait donc être impliqué dans la

formation de ses dérivés. Afin de tester l'action de l'acide rétinoïque sur la différenciation des cellules de la crête neurale, nous avons réalisé des cultures clonales de cellules de la crête neurale troncale et céphalique en présence d'acide rétinoïque (0,1 à 10 mM). La composition des clones obtenus a été ensuite analysée à l'aide de différents marqueurs, puis comparée à celle des cultures témoins.

En accord avec nos résultats précédents, il ressort de ces expériences que la plupart des progéniteurs ainsi mis en évidence sont des cellules multipotentes, capables de générer des cellules gliales, des neurones adrénérgiques, et des cellules du lignage mélanocytaire, ces dernières étant révélées par l'anticorps MeIEM (cf § 3.4). De plus, il apparaît qu'en présence d'acide rétinoïque la fréquence des colonies contenant des cellules adrénérgiques (tyrosine-hydroxylase positives) est fortement augmentée, alors que l'expression du phénotype glial n'est pas modifiée par rapport aux contrôles. En outre, la fréquence des cellules appartenant au lignage mélanocytaire n'est pas affectée par le traitement. Cependant, en milieu témoin, ces cellules restent à l'état de précurseurs indifférenciés, alors qu'en milieu enrichi en acide rétinoïque, la plupart synthétisent de la mélanine.

Ces résultats mettent donc en évidence un effet positif de l'acide rétinoïque *in vitro* sur l'expression des phénotypes adrénérgique et mélanocytaire par les cellules de crête neurale. Ainsi, l'acide rétinoïque modifie la descendance de précurseurs pluripotents, en favorisant l'émergence du phénotype adrénérgique d'une part, et d'autre part, en stimulant la différenciation terminale des mélanocytes. Ces résultats suggèrent également un rôle important de l'acide rétinoïque au cours de la ségrégation des lignages issus de la crête neurale *in vivo*.

1.2. Effet de l'acide rétinoïque sur l'acquisition du phénotype adrénérgique par les cellules de la crête neurale troncale

(E. DUPIN et LE DOUARIN)

Parallèlement à l'étude de l'effet de l'acide rétinoïque sur les cellules de crête neurale en cultures clonales, nous avons testé la possibilité que ce facteur puisse jouer un rôle dans l'acquisition du phénotype adrénérgique par les précurseurs des cellules adrénomédullaires. Nous avons donc examiné la différenciation de cellules exprimant la tyrosine-hydroxylase (TH) dans des cultures de crête neurale troncale prélevée chez l'embryon de caille de 2 jours et réalisées en présence ou en absence d'acide rétinoïque.

Dans les cultures témoins, les cellules sont cultivées sur plastique dans un milieu non permissif, et par conséquent très peu de cellules TH⁺ apparaissent après 5 jours. Après addition d'acide rétinoïque en revanche, une production massive de cellules TH⁺ est observée, qui varie en fonction de la concentration utilisée. En modifiant la période et la durée du traitement, il a pu être

établi que cette réponse se produit uniquement si l'acide rétinoïque est administré au début de la culture, c'est-à-dire peu après la migration des cellules de crête neurale à partir du tube nerveux.

Nous avons ensuite testé si l'acide rétinoïque pouvait influencer le devenir des précurseurs adrénérgiques pris à un stade plus tardif, lorsque les cellules de la crête neurale troncale ont colonisé le mésenchyme somitique (chez l'embryon de caille de 3 jours). Il apparaît ainsi que, dans des cultures de sclérotomes, la différenciation de cellules TH⁺ n'est pas favorisée en présence d'acide rétinoïque, mais au contraire inhibée.

Ces observations montrent donc que l'acide rétinoïque a un effet adrénérgisant sur les cellules de crête neurale troncale à un stade précoce de leur migration à partir de l'ébauche neurale, et suggère que ce facteur pourrait jouer un rôle important dans les premières étapes de la différenciation des précurseurs sympatho-adrénomédullaires.

1.3. Clonage de cellules de crête neurale transformées par le virus MC29 (M. FAUQUET, E. DUPIN et C. ZILLER)

Le rétrovirus MC29 de la myélocytomatose aviaire est porteur de l'oncogène *v-myc* qui a la propriété de stimuler la prolifération *in vitro* de divers types de cellules. Dans certains cas, ce virus altère l'expression phénotypique des cellules qu'il transforme. Des cellules de la crête troncale de caille, prélevées à deux jours d'incubation et mises en culture, ont été infectées par le virus, qui provoque une forte prolifération, et en particulier la multiplication de précurseurs catécholaminérgiques. Le nombre des cellules exprimant ce phénotype atteint un maximum lors des 4^e à 6^e repiquages, puis décroît. Au-delà des 11^e et 12^e repiquages, le phénotype adrénérgique est perdu (Fauquet et al., 1990).

Le clonage en agar s'étant révélé impossible, nous avons entrepris le clonage de ces cellules transformées par micromanipulation et culture sur cellules nourricières 3T3. Nous espérons ainsi obtenir des lignées de cellules aviaires adrénérgiques qui n'existent pas actuellement. Plusieurs clones ont ainsi été obtenus et amplifiés, dont la caractérisation est en cours.

D'autre part, nous avons identifié les cellules de crête neurale cibles de la transformation virale par l'infection de cellules individuelles. L'infection en culture clonale (et non plus de masse) a produit deux types de clones. L'un est composé uniquement de cellules non-adrénérgiques, probablement de type non-neuronal (absence de tous les marqueurs de différenciation testés). L'autre inclut à la fois des cellules adrénérgiques et des cellules TH⁻. Ceci montre que les cellules adrénérgiques obtenues après la transformation proviennent de la différenciation de précurseurs pluripotents. Des résultats similaires ont été observés dans le cas de la crête neurale céphalique infectée par le même virus

et sont en accord avec les conclusions concernant les cellules de crête neurale normale (cf. § précédents).

En conclusion, nous disposons actuellement de populations cellulaires ayant un grand pouvoir prolifératif qui peuvent être un outil précieux pour l'identification des facteurs de différenciation des cellules de crête neurale (extrait embryonnaire, facteurs de croissance, hormones...) et pour des expériences de transfection génique (cf. § suivant).

1.4. *Mise en évidence par hybridation in situ du rôle de l'insuline sur la différenciation catécholaminergique des précurseurs autonomes des ganglions sensoriels*

(Z.G. XUE, X. JIN, J. SMITH et N.M. LE DOUARIN en collaboration avec M. FAUQUET)

Dans des travaux précédents, nous avons démontré la présence de précurseurs adrénérgiques dans la population de cellules non neuronales du ganglion rachidien. De tels précurseurs apparaissent 4 jours après le début de la culture à condition que le milieu soit supplémenté par de l'extrait embryonnaire (de 5 à 10 %) ou par des hormones telles que l'insuline et l'IGF-1.

Dans le présent travail, nous avons montré par hybridation *in situ* et RT-PCR la synthèse d'ARN messager de tyrosine hydroxylase (TH) dans une sous-population de cellules de ganglion rachidien en culture. Lorsque le milieu de base (DMEM NGF et sérum de veau) est supplémenté par 5 à 10 % d'extrait embryonnaire ou par de l'insuline à la concentration de 10 ng/ml, les premières cellules exprimant l'ARN messager de TH, tout comme celles exprimant l'enzyme elle-même, apparaissent à partir de 3 jours de culture ; ensuite, leur nombre augmente considérablement, en parallèle avec celui des cellules réagissant avec le sérum anti-TH. Le même résultat est obtenu par RT-PCR. Quand les 2 primers spécifiques de la région 5' de l'ADNc de TH sont employés, une seule bande de 330bp est amplifiée dans les ganglions sympathiques et dans la glande surrénale. La taille et la séquence nucléotidique de cette bande correspondent à la région attendue d'ADNc de TH, une bande de même taille est également détectée dans les ganglions rachidiens cultivés pendant 6 jours en culture en présence de 10 ng/ml d'insuline. Néanmoins, aucune amplification n'est observée dans les ganglions rachidiens non cultivés. Cette expérience confirme parfaitement le résultat obtenu par hybridation *in situ*. Notre observation a clairement montré que sous l'influence de l'insuline ou de l'extrait d'embryon, l'activité du gène TH est induite dans une sous-population de cellules du ganglion rachidien en culture *in vitro*.

1.5. *Potentialités de développement des cellules entériques dérivées de la crête neurale : analyse en cultures clonales et en cultures de masse*

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

L'analyse clonale des potentialités de développement des cellules de la crête neurale céphalique en début de migration et de crête troncale migrant dans le mésoderme troncal ou ayant formé les ganglions rachidiens a été réalisée précédemment. Elle avait montré d'une part l'hétérogénéité de la crête neurale, qui est composée de précurseurs pluripotents et de cellules plus ou moins déterminées ; d'autre part, cette étude mettait clairement en évidence une restriction progressive des potentialités de développement des cellules dérivées de la crête neurale au cours de l'ontogenèse.

Dans le présent travail, notre but était d'analyser les capacités de différenciation des cellules dérivées de la crête neurale qui ont colonisé la paroi intestinale et sont en train d'édifier les plexus entériques. Nous avons utilisé des tubes digestifs d'embryons de caille de 4 à 12 jours d'incubation (E4 à E12). Les gésiers et intestins sont dissociés en une suspension cellulaire par traitement à la trypsine. Les cellules de crête neurale qui colonisent le tractus digestif portent le marqueur HNK1/NC1. Ceci nous permet, après coloration par immunofluorescence, de les reconnaître et de les sélectionner sous contrôle microscopique en lumière ultraviolette. Des cellules dérivées de la crête neurale sont prélevées à partir du gésier et sont ensemencées isolément sur couches nourricières de fibroblastes de souris 3T3, dont la prolifération est arrêtée par la mitomycine. Cette technique de culture clonale a été précédemment employée au laboratoire pour l'analyse des potentialités des crêtes céphalique et troncale.

L'efficacité de clonage des cellules entériques est de 28 % de E4 à E7 ; elle décroît brusquement à E8. La taille des clones engendrés par les cellules prises entre E4 et E8 varie considérablement. Les grands clones, de plus de 10^3 cellules, sont nombreux pour les cellules prises à E4 et E5, tandis que les cellules de gésiers prises à E7 et E8 ne produisent que de très petits clones.

De même, la diversité phénotypique des cellules composant les clones décroît pendant la période considérée.

Deux phénotypes, qui ne se rencontrent jamais *in situ* dans les plexus entériques, sont trouvés dans nos cultures : des cellules adrénérgiques et des cellules gliales exprimant SMP, un marqueur porté exclusivement dans le système nerveux périphérique, *in vivo*, par les cellules de Schwann. SMP n'est pas normalement exprimé par la glie entérique.

La capacité à produire des cellules adrénérgiques est mise en évidence jusqu'à E6 dans les cultures clonales de cellules dérivées de la crête neurale prises dans le gésier.

Des cultures de masse de cellules de gésier et d'intestin dissociés, comprenant donc à la fois les cellules dérivées de la crête et celles du mésenchyme et de l'épithélium digestif, ont montré que les cellules adrénérgiques ainsi que les cellules SMP⁺ pouvaient se différencier dans ces conditions, même dans un milieu dépourvu de sérum et d'extrait embryonnaire.

Le nombre de cellules adrénérgiques, exprimant l'immunoréactivité de la tyrosine hydroxylase (TH), qui se développent dans les cultures d'intestin atteint un pic à E7. A ce stade, les cultures de gésier, par contre, ne produisent pas de cellules TH⁺. Un gradient cranio-caudal de disparition des précurseurs adrénérgiques dans le tractus digestif a ainsi été mis en évidence.

D'autre part, cette étude confirme les résultats d'expériences précédentes faites dans notre laboratoire et dans d'autres, à savoir que des précurseurs de cellules adrénérgiques sont présents dans tous les types de ganglions sensoriels et autonomes du système nerveux périphérique pendant le développement embryonnaire, même si dans la majorité de ces dérivés ces cellules n'expriment jamais le phénotype adrénérgique.

1.6. *Le gène de la tyrosine hydroxylase est exprimé dans l'endoderme et le pancréas de l'embryon de caille à des stades précoces du développement*
(C. ZILLER, en collaboration avec M.A. MIRABEL, B. VANDENBUNDER et M. FAUQUET)

Le phénotype catécholaminérgique est exprimé normalement par des cellules des systèmes nerveux central et périphérique, par les cellules chromaffines de la médullo-surrénale et certaines cellules paraganglionnaires. L'étape initiale de la synthèse des catécholamines est catalysée par l'enzyme tyrosine hydroxylase (TH), qui peut donc être considérée comme un marqueur spécifique du métabolisme catécholaminérgique.

Nous avons étudié l'expression du gène codant pour la TH dans le tronc d'embryons de caille par hybridation *in situ*. La présence de l'ARN messager de la TH de caille est détectée au moyen d'une sonde antisens marquée au 35 S à 3,5 jours d'incubation (E3,5) dans les chaînes sympathiques et le plexus aortique. Chez des embryons nettement plus jeunes, à E1,5-E2,5, le gène de la TH s'exprime dans l'endoderme, dès le stade 8 somites. Le signal est détecté essentiellement dans la région axiale de l'endoderme, au voisinage de la chorde. L'ARN-m de la TH est trouvé aussi, à E6, dans l'ébauche pancréatique, qui est un dérivé de l'endoderme.

Nous avons recherché ensuite, par immunocytochimie, la protéine TH dans ces structures. L'immunoréactivité de la TH, révélée par un anticorps monoclonal anti-TH de caille que nous avons produit au laboratoire, et par un sérum de lapin de source commerciale, est trouvée dans un certain nombre de

cellules de l'endoderme explanté à E1,5-E3. Des cellules TH positives sont également présentes dans les ébauches pancréatiques explantées entre E3 et E6.

Par contre, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de catécholamines dans les cellules endodermiques, que ce soit au moment de l'explantation ou après quelques jours de culture. Dans les explants de pancréas, quelques rares cellules faiblement positives après fixation à l'acide glyoxylique ont été observées.

Il est possible que les cellules à TH de l'endoderme soient les précurseurs des cellules catécholaminergiques du pancréas et des cellules entérochromaffines de la muqueuse intestinale.

D'autre part, il a été montré par plusieurs auteurs que la chorde, le tube neural et le mésoderme somitique à E2-E3 chez l'embryon d'oiseau peuvent synthétiser ou stocker les catécholamines. Les cellules à TH de l'endoderme, qui ne contiennent apparemment pas de catécholamines, pourraient produire de la L-DOPA, qui diffuserait dans les tissus environnants, chorde et autres structures axiales. Celles-ci convertiraient la L-DOPA en catécholamines et les relargueraient dans l'environnement où se différencient les cellules sympatho-adrénales. Des expériences *in vitro* ont montré que de la noradrénaline exogène peut exercer un effet positif sur la différenciation de cellules de crête neurale en cellules sympatho-adrénales. D'autre part, les catécholamines agissent sur la crête neurale par l'intermédiaire de l'activation des récepteurs bêta de l'adrénaline et de l'élévation de l'AMP cyclique pour stimuler l'activité du gène de la TH (Dupin et al., 1993). On peut donc concevoir qu'*in vivo*, les cellules de la crête neurale reçoivent l'influence des catécholamines produites par la chorde ou le tube neural ventral ; la L-DOPA endodermique serait dans ce cas à l'origine de la cascade d'événements conduisant à la différenciation sympatho-adrénales.

1.7. *Etude des cellules de la crête neurale issue du tube neural caudal et de ses potentialités de différenciation*

(M. CATALA, C. ZILLER et N.M. LE DOUARIN)

La moelle épinière est une structure qui présente des caractères anatomiques variables selon les espèces. Ainsi, chez les oiseaux, elle est dépourvue de nerfs et de ganglions rachidiens à son extrémité la plus caudale. Afin de comprendre les particularités embryologiques qui permettent d'expliquer cet aspect anatomique, nous avons réalisé une étude *in vitro* et *in vivo* des cellules des crêtes neurales issues des niveaux les plus caudaux du tube neural de l'embryon d'oiseau. A ces niveaux, le tube neural se met en place entre le 4^e et 5^e jour embryonnaire. Tant en culture *in vitro* qu'en greffes hétérotopiques et hétérochroniques, le tube neural prélevé rostralement par rapport au

47^e somite produit des cellules de crêtes neurales qui peuvent se différencier en cellules gliales, en mélanocytes et en neurones (organisés dans un ganglion rachidien). Le tube neural des niveaux situés entre le 48^e et le 53^e somite (le dernier somite formé chez le poulet) donne naissance à des cellules de crêtes neurales qui se différencient en mélanocytes et cellules gliales mais pas en neurones. Enfin, le tube neural situé caudalement par rapport au niveau du 53^e somite dans une zone qui reste non segmentée ne produit aucune cellule de crête neurale. Ainsi, les particularités anatomiques du système nerveux périphérique des niveaux caudaux de la moelle épinière chez l'oiseau peuvent s'expliquer par une perte progressive des potentialités des cellules de la crête neurale puis par leur absence.

2. LE PROTO-ONCOGÈNE *C-RET* ET LE DÉVELOPPEMENT DE LA CRÊTE NEURALE

2.1. *Analyse fonctionnelle du proto-oncogène c-ret* (B. BOSSY, Y. BELLAICHE et N.M. LE DOUARIN)

Le proto-oncogène *c-ret* est un membre de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase qui est principalement exprimé dans les reins embryonnaires et dans certaines parties des systèmes nerveux central et périphérique pendant l'embryogenèse. Ce gène est impliqué dans plusieurs types de tumeurs chez l'homme ainsi que dans la maladie de Hirschsprung. Ces tumeurs concernent des dérivés de la crête neurale : phéochromocytomes, tumeurs médullaires de la thyroïde, neurofibromatoses, neuroblastomes. En outre des études chez la souris ont démontré le rôle crucial joué par ce gène pour la formation des reins et du système nerveux entérique (dérivant de la crête neurale) chez l'embryon. Nous avons décidé d'étudier plus en détail le rôle de *c-ret* en utilisant le système aviaire comme modèle. Des rétrovirus recombinants ont été construits en utilisant des cDNAs de *c-ret* de poulet (les cDNA nous ont été donnés par les D^{rs} A. Schuchardt, F. Costantini de l'Université Columbia à New York et le D^r V. Pachnis, au NIMR à Londres) pour exprimer une forme mutante de *c-ret*, tronquée dans sa région cytoplasmique (sans domaine kinase). L'expression des protéines *c-ret* mutantes devrait avoir un effet négatif dominant, en formant des hétérodimères non fonctionnels. Ainsi les cellules de la crête neurale exprimant abondamment la forme mutante de *c-ret* devraient être incapables de participer à l'élaboration du système nerveux entérique. L'analyse des cellules exprimant la forme mutante de *c-ret* dans l'embryon infecté avec des marqueurs neuronaux et gliaux permettra de déterminer le stade du développement auquel la fonction de *c-ret* est nécessaire. Il s'agit, en particulier, de vérifier si *c-ret* est nécessaire pour la migration, la prolifération ou au contraire pour la différenciation des cellules de crête neurale donnant naissance au système nerveux entérique.

La détection des protéines de *c-ret* mutantes est effectuée grâce à un épitope à l'extrémité C-terminale (ajouté lors du clonage), qui est reconnu par l'anticorps monoclonal 12CA5. Ces constructions de *c-ret* dans les vecteurs rétroviraux sont actuellement utilisées pour transfecter des fibroblastes en culture primaire afin de produire du virus recombinant à un titre élevé.

2.2. Localisation du ligand du proto-oncogène *c-ret* (B. BOSSY, Y. BELLAICHE et N.M. LE DOUARIN)

Un des éléments clé de la compréhension du rôle du proto-oncogène *c-ret* est la description de son activation au cours du développement embryonnaire et dans les cellules de la crête neurale en particulier. L'activation du récepteur *c-ret* suppose l'existence d'un ligand spécifique qui est encore inconnu. Ce ligand peut être, a priori, soit lié à une membrane cellulaire, soit sous forme de facteur soluble, soit encore sous ces deux formes simultanément. Nous avons construit une forme mutante soluble de *c-ret* qui ne conserve que son domaine extracellulaire auquel nous avons ajouté un épitope à l'extrémité C-terminale. Ceci nous permet de la purifier ou de la détecter avec un anticorps monoclonal spécifique pour cet épitope. Cette forme soluble de *c-ret*, qui contient potentiellement le site de liaison du récepteur, sera utilisée comme sonde sur des cultures primaires de cellules embryonnaires, afin de détecter la présence d'un ligand à leur surface ou dans leur matrice extracellulaire avoisinante. Les cellules les plus susceptibles d'exprimer le ligand de *c-ret* sont celles qui interagissent avec les cellules exprimant *c-ret* à leur surface et qui participent à des organes où *c-ret* a un rôle essentiel d'après des études génétiques chez la souris. Il s'agit principalement des cellules du mésenchyme de l'intestin et des reins embryonnaires. Nous avons pour l'instant exprimé la forme soluble de *c-ret* de façon transitoire dans des cellules COS et nous sommes en train de sélectionner des lignées transfectées stables de cellules NIH3T3. Ces cellules transfectées nous permettront d'exprimer abondamment la forme soluble de *c-ret* qui sera ensuite purifiée avant d'être utilisée pour détecter la présence de ligand sur les cellules embryonnaires. Cette expérience nous sera donc utile, premièrement pour déterminer les cellules embryonnaires capables d'exprimer le ligand de *c-ret* *in vitro*, deuxièmement pour vérifier que le domaine extracellulaire de *c-ret* peut effectivement être utilisé comme sonde pour se lier au ligand de *c-ret*, et finalement pour déterminer si le ligand de *c-ret* est une protéine de surface cellulaire plutôt qu'un facteur soluble. Ces résultats seront déterminants pour élaborer une stratégie de clonage du ligand de *c-ret*.

3. DE LA CRÊTE NEURALE AUX CELLULES PIGMENTAIRES

3.1. *Etude de l'expression des gènes c-kit et steel au cours du développement des cellules pigmentaires chez l'embryon d'oiseau.*

(L. LECOIN, R. LAHAV, M.-A. TEILLET et N.M LE DOUARIN, en collaboration avec F.H. MARTIN, AMGEN Laboratories)

C-kit est un récepteur tyrosine kinase dont le ligand *steel* a récemment été identifié. Le système *c-kit/steel* joue un rôle important dans le développement d'au moins trois lignées cellulaires différentes : les cellules hématopoïétiques, les cellules germinales, et les cellules pigmentaires.

Nous avons entrepris d'étudier le pattern d'expression des gènes *c-kit* et *steel* au cours du développement de l'embryon d'oiseau, grâce aux sondes correspondantes clonées chez le poulet par F.H. Martin de la société AMGEN avec qui nous collaborons et qui finance en partie ces recherches.

Dès le 4^e jour de développement embryonnaire (E4), *c-kit* est exprimé par des cellules isolées situées entre l'ectoderme et le dermomoyotome, le long de la voie dorso-latérale de migration des cellules de crête neurale. L'association des techniques de greffe hétérospécifique de tube neural de caille chez l'embryon de poulet et de la technique d'hybridation *in situ* avec la sonde *c-kit*, nous a permis de démontrer que ces cellules isolées *c-kit*-positives proviennent effectivement de la crête neurale. Ceci a été confirmé par le marquage immunocytochimique à l'aide de l'anticorps HNK1 de ces mêmes cellules. *C-kit* constitue donc un marqueur précoce des mélanoblastes, permettant de suivre leur migration bien avant que la pigmentation de ces cellules ne permette leur identification.

Steel, le ligand de *c-kit*, s'exprime exclusivement dans l'ectoderme, contrairement à ce qui a été observé chez la souris où il s'exprime dans le derme à E13,5 là où les futures cellules pigmentaires se multiplient avant de rentrer dans l'ectoderme. Chez l'oiseau, au contraire, les précurseurs des mélanocytes entrent précocement (à E5) dans l'ectoderme et continuent à proliférer. Nous avons observé que le domaine d'expression de *steel*, à partir de E12, se restreint progressivement à la partie la plus apicale de la plume. L'intensité maximale d'expression de *steel* est observée entre E9 et E14.

Sur coupes transversales de plumes d'embryons de poulet à E13-E14, *c-kit* s'exprime dans les mélanocytes dont les corps cellulaires se trouvent alignés à la base des crêtes barbares, proches du centre de la plume, alors que son ligand *steel* est exprimé par les cellules des barbes situées à la périphérie de la plume. Or, le transfert des mélanosomes du mélanocyte au kératinocyte commence dans les cellules les plus externes des barbes, et, réciproquement seuls les mélanocytes situés à la base des crêtes barbares arrivent à transférer leur pigment et survivent. Il est possible que le système *c-kit/steel* joue un rôle important chez l'oiseau à cette étape de la différenciation.

3.2. Etude d'un modèle d'hyperpigmentation : la poule Nègre-Soie

(L. LECOIN, P. MERCIER et N.M. LE DOUARIN)

La Nègre-Soie est une race de poule qui présente une pigmentation très importante des organes internes : les tissus conjonctifs, le contour des nerfs, des vaisseaux, les gonades, les méninges sont envahis par de très nombreux mélanocytes. Seul le foie, le cœur et la rate ne sont pas pigmentés. Les cellules pigmentaires, chez les vertébrés supérieurs, se situent principalement dans la peau ; cette race constitue donc une exception et un modèle intéressant pour étudier le déterminisme de migration des futures cellules pigmentaires au cours du développement embryonnaire.

Des expériences de greffe de tube neural de caille chez la poule Nègre-Soie et de tube neural de Nègre-Soie chez la poule White-Leghorn ont montré que cette pigmentation interne est due non pas à une particularité intrinsèque des cellules pigmentaires mais plutôt aux tissus environnants dans lesquels les futures cellules pigmentaires migrent.

Nous avons confirmé ces résultats *in vitro* en comparant l'action d'extraits d'embryons de poulet de race Nègre-Soie à celle d'embryons témoins sur des cultures de cellules de crête neurale de caille : ces cultures initialement comparables (suspension cellulaire de 10 000 cellules par puits) apparaissent plus importantes et macroscopiquement plus pigmentées après une semaine de culture en présence d'extrait d'embryon Nègre-Soie qu'avec un extrait d'embryon de poulet témoin du même âge. L'effet de ces extraits sur la prolifération cellulaire a été quantifié par comptages cellulaires et par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée en 24 h. Leur action sur la différenciation cellulaire a été déterminée par le pourcentage de cellules pigmentées et par la quantité de mélanine formée en culture (mesurée spectrophotométriquement). L'extrait d'embryon Nègre-Soie stimule la prolifération cellulaire 2 à 2,5 fois plus que l'extrait d'embryon témoin mais ne favorise pas particulièrement la différenciation mélanocytaire. Cette étude montre que les tissus d'embryons de poule Nègre-Soie contiennent un ou plusieurs facteurs de croissance qui stimulent les cellules qui dérivent de la crête neurale.

Nous avons dans un second temps cherché à déterminer *in vivo* à quel moment se produit cette prolifération des mélanoblastes. A l'aide de chimères caille/poule et grâce au marqueur *c-kit* il nous a été possible de suivre la migration des mélanoblastes chez l'embryon de poule Nègre-Soie : les cellules de la crête neurale empruntent initialement les mêmes voies de migration (dorso-latérales et dorso-ventrales) que dans d'autres races, mais à partir de E5, les mélanoblastes (marqués par *c-kit*) deviennent beaucoup plus nombreux que chez un embryon de poulet témoin et envahissent progressivement les tissus internes.

Le facteur de croissance steel ne semble pas être responsable du phénotype Nègre-Soie car il est exprimé dans l'ectoderme exclusivement, de la même

façon chez l'embryon Nègre-Soie et chez l'embryon de poulet ne présentant pas de pigmentation interne. Nous cherchons à présent à déterminer si d'autres facteurs de croissance des mélanocytes tels que le bFGF ou le HGF seraient surexprimés chez l'embryon de poule Nègre-Soie ou s'il s'agit d'un facteur non encore identifié.

3.3. *Etude du développement des cellules c-kit positives dans le tube digestif chez l'embryon d'oiseau*

(L. LECOIN et N.M. LE DOUARIN, en collaboration avec G. GABELLA)

Les cellules pigmentaires, germinales et hématopoïétiques ne sont pas les seules cellules exprimant le gène *c-kit*. Parmi les cellules qui dérivent de la crête neurale, les petits neurones (sensoriels) situés dans la partie dorso-latérale du ganglion de la racine dorsale des nerfs rachidiens expriment *c-kit*. On remarque également en hybridation *in situ* avec la sonde *c-kit* sur coupe d'embryon de poulet à partir de 9 jours de développement embryonnaire, un signal intense sur la partie la plus externe du tube digestif.

Nous avons cherché à savoir dans un premier temps si ces cellules *c-kit* positives correspondent ou non aux plexus entériques qui proviennent de la crête neurale. Nous avons donc greffé de façon orthotopique et orthochronique des tubes neuraux de caille chez des embryon de poulet hôtes au niveau vagal (entre les somites 1 à 7). L'expression du gène *c-kit*, étudiée en hybridation *in situ* sur les chimères ainsi réalisées, a montré que les cellules *c-kit* positives entourent les plexus entériques mais ne correspondent pas aux cellules qui dérivent de la crête neurale.

De plus, nous avons démontré que les cellules *c-kit* positives du tube digestif pouvaient se développer en l'absence des cellules qui dérivent de la crête neurale : des tubes digestifs post-ombilicaux (caeca, colon et rectum) ont été prélevés avant la colonisation par les cellules de crête neurale et cultivés sur membrane chorio-allantoïdienne. Ces tubes digestifs « aneuxaux » possèdent des cellules qui expriment *c-kit* comparables à celles observées dans des tubes digestifs normaux d'âge équivalent.

La nature exacte des cellules *c-kit* positives du tube digestive est encore mal connue. Différents marqueurs associés à l'hybridation *in situ* devraient nous permettre de préciser si les cellules *c-kit* positives sont de type musculaire (anticorps 13F4).

Ces cellules qui expriment *c-kit* dans le tube digestif pourraient correspondre en partie à une catégorie cellulaire pour laquelle il n'existe pas de marqueur spécifique : les cellules interstitielles de Cajal. Ces cellules sont caractérisées par leur aspect en microscopie électronique. Nous cherchons à présent à déterminer si des cellules interstitielles de Cajal peuvent être mises en évidence dans les tubes digestifs aneuxaux de la même façon que les cellules *c-kit* positives.

3.4. Nouveaux marqueurs de la différenciation des mélanocytes chez l'embryon d'oiseau

(V. NATAF, P. MERCIER, C. ZILLER et N.M. LE DOUARIN)

Afin de produire des marqueurs de mélanoblastes et des mélanocytes, nous avons immunisé une souris avec des cellules de crête neurale différenciées en mélanocytes en culture. Nous avons obtenu 3 anticorps monoclonaux (Mab) qui réagissent avec des cellules pigmentées et non pigmentées, dans l'épiderme et dans les cultures de crête neurale. Ces marqueurs caractérisent différentes étapes de la différenciation des mélanocytes. L'un d'eux, MelEM (pour Melanoblast/cyte early marker) détecte les mélanoblastes dès qu'ils ont atteint le mésenchyme sub-ectodermique, alors que les 2 autres, Mel1 et Mel2, détectent des antigènes présents dans les (pré)mélanosomes plus tard, au cours du processus de différenciation. En outre, le Mab MelEM est un marqueur spécifique des mélanoblastes/cytes dérivant exclusivement de la crête neurale : il ne marque pas les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine. L'antigène reconnu par l'Ac MelEM est une protéine de Mr = 26 000. Les épitopes reconnus par les Mab Mel1 et Mel2 sont des résidus glycosylés portés par des glycoprotéines de Mr 123 000 et 85 000 respectivement.

3.5. Effets du produit du gène *steel* sur la mélanogenèse des cellules de crête neurale en culture *in vitro*

(R. LAHAV, L. LECOIN, C. ZILLER, V. NATAF, J. CARNAHAN, F. MARTIN et N.M. LE DOUARIN)

Les mutations *steel* (sl) et *dominant white spotting* (W) de la souris affectent trois lignées cellulaires embryonnaires : les cellules germinales primordiales, les mélanocytes et les cellules hématopoïétiques. Ces trois catégories ont en commun d'être des cellules migratrices. Les produits des gènes de ces loci sont d'une part un facteur de croissance peptidique, le SCF (pour *stem cell factor*) et son récepteur à fonction tyrosine kinase, le proto-oncogène *c-kit*.

Nous avons étudié l'effet du SCF recombinant de poulet sur le développement des mélanoblastes et des mélanocytes dans des cultures de cellules de crête neurale de caille. Des conditions de culture secondaire strictement reproductibles, dans un milieu chimiquement défini, ont été mises au point.

Nous observons qu'en présence de SCF, le nombre des cellules de crête neurale dans les cultures, ainsi que le nombre des mélanocytes et de leurs précurseurs, est significativement plus élevé que dans les cultures témoins.

Un marquage par la bromodéoxyuridine montre que le SCF exerce une action mitogène transitoire et relativement faible sur l'ensemble de la population crête neurale en culture.

Par ailleurs, le SCF stimule la différenciation des précurseurs des mélanocytes, reconnus par l'anticorps monoclonal MelEM (pour *melanocyte early*

marker, voir Nataf et al., 1993), et celle des mélanocytes eux-mêmes. En effet, la proportion de ces deux sous-populations par rapport à l'ensemble des cellules dans les cultures augmente significativement en présence du facteur.

Enfin, le SCF a aussi un effet positif sur la survie de la population des cellules de crête neurale, puisqu'en sa présence le nombre total des cellules reste constant tandis qu'il décroît progressivement dans les cultures témoins. Ces résultats suggèrent que le SCF favorise la survie de l'ensemble de la population crête neurale et stimule le processus de différenciation mélanocytaire.

4. LE DÉVELOPPEMENT DE LA GLIE PÉRIPHÉRIQUE À PARTIR DE LA CRÊTE NEURALE

Rôle du microenvironnement dans l'acquisition et la stabilité du phénotype glial entérique

(C. DULAC et N.M. LE DOUARIN)

La découverte au laboratoire de nouveaux marqueurs spécifiques des cellules gliales synthétisés depuis des stades précoces de l'ontogénèse a été à l'origine de la mise en évidence au laboratoire d'aspects nouveaux liés à la différenciation gliale périphérique précoce.

Les expériences de clonage cellulaire réalisées au laboratoire ont montré que la plupart des cellules de la crête neurale peuvent donner des cellules de Schwann dans leur descendance. Cependant dans la paroi intestinale il n'y a jamais de différenciation de cellules de Schwann mais apparition de cellules gliales entériques de type astrocytaire. Afin d'analyser l'influence du microenvironnement tissulaire sur la différenciation gliale périphérique nous avons réalisé des expériences d'associations cellulaires Caille/Poulet dans lesquelles nous avons suivi l'expression du phénotype SMP.

Dans un premier temps nous avons associé des cellules de crête neurale de Caille à des fragments de paroi intestinale, de peau ou de muscle d'un embryon de poulet de 6 jours. Après 12 jours de coculture *in vitro* ou en greffe chorioallantoïdienne, des cellules de Caille SMP⁺ se différencient dans la peau ou le muscle de poulet mais jamais dans le tissu intestinal. L'absence du phénotype SMP dans la paroi intestinale résulte donc d'une inhibition locale de la différenciation des précurseurs de cellules de Schwann et non d'un défaut de migration de certains précurseurs dans l'intestin.

Nous avons précisé les modalités de cette influence inhibitrice en associant des cellules de nerfs de caille exprimant déjà le phénotype SMP à différents microenvironnements de poulet. Dans ces conditions et après 7 jours de coculture le phénotype SMP persiste dans la peau, malgré l'absence de neurones mais disparaît dans l'intestin. Ceci démontre que le microenvironnement entérique peut inhiber l'expression d'un phénotype établi de cellules de

Schwann qui adoptent alors un caractère SMP⁻ de cellule entérique. Cette modulation phénotypique est confirmée par des expériences de culture cellulaire : lorsque des plexus entériques sont disséqués de la paroi intestinale et mis en culture, le phénotype SMP de même que la synthèse de laminine, caractéristiques des cellules de Schwann apparaissent au bout de quelques jours de culture à la surface de la majorité des cellules gliales. L'ampleur et la rapidité de l'activation de ces synthèses suggèrent un véritable processus de transdifférenciation et non la différenciation de précurseurs restés quiescents. Ceci démontre une plasticité phénotypique remarquable entre deux types cellulaires pourtant très différents *in situ* : les cellules de Schwann et la glie entérique et suggère que les deux types de cellules gliales sont issus d'un même lignage cellulaire et que leur phénotype final est modulé par des interactions cellulaires spécifiques.

Ces expériences ont révélé l'existence d'un effet inhibiteur du mésenchyme intestinal et de l'environnement ganglionnaire sur la différenciation des cellules de Schwann ainsi qu'une remarquable plasticité phénotypique entre les différentes glies périphériques. Ceci nous a conduit à proposer un modèle d'ensemble de la gliogenèse périphérique très différent de celui envisagé pour la gliogenèse dans le système nerveux central. En effet, et bien que les cellules gliales périphériques et centrales dérivent toutes du neuroépithélium embryonnaire, seule la différenciation ainsi que la stabilité phénotypique des différentes catégories de cellules gliales périphériques semblent être dépendantes de signaux régulateurs réversibles, d'où l'importante plasticité phénotypique constatée.

5. UN NOUVEAU GÈNE À EXPRESSION NEURONALE Z-1

(K. KATSUBE et N.M. LE DOUARIN)

« Numb » est un des gènes qui contrôle la différenciation terminale du système nerveux périphérique chez la Drosophile. Son équivalent n'a pas encore été isolé chez les Vertébrés. Par la technique de RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), en utilisant des amorces homologues aux séquences à doigt de Zn de « numb » de Drosophile (CHGFLAC---CAFAVC), un fragment d'ADN possédant des séquences à doigt de Zn (CHLNSLAC---CFLC) a été isolé et cloné. Ce fragment a permis de cribler à faible stringence une banque d'ADNc de moelle épinière de caille de 10 jours après l'éclosion. Un nouveau gène (Z-1) a été isolé pendant ce criblage. Z-1 n'a pas beaucoup de similarité avec les autres gènes de la famille des protéines à doigt de zinc sauf la répétition de cystéines (CGRCC---CLADVHLFDC), dans la partie 5' des 283 acides aminés de la phase ouverte de lecture. On a conclu que Z-1 est un gène unique d'après les résultats de comparaison des séquences de la phase ouverte de lecture avec les séquences publiées.

L'hybridation des ARNs par « Northern » blot a révélé que la taille entière de l'ADNc de Z-1 est d'environ 5 kb et qu'il n'y a qu'une forme d'ARNm (pas de splicing alternatif). Le signal est visible à partir de 6 jours dans les tissus du cerveau et il diminue vers 9 jours. Dans les tissus de la rétine, le signal est visible à partir de 9 jours et il diminue vers 12 jours. Le signal n'est jamais visible dans les tissus musculaires et dans l'intestin pendant les stades du développement.

L'hybridation *in situ* a révélé que la distribution d'ARNm de Z-1 est limitée au système nerveux. La première expression a été observée dans le tube neural d'embryons de 3 jours. L'expression de Z-1 dans le système nerveux central est forte dans les neuroblastes post-mitotiques à partir de ce stade et elle diminue vers 10 jours. Dans le système nerveux périphérique, l'expression de Z-1 est un peu plus précoce dans les ganglions crâniens (4 jours) que dans les ganglions rachidiens dorsaux (5 jours) et elle persiste jusqu'à l'éclosion. Dans la rétine, ce gène est exprimé dans la couche des cellules ganglionnaires à partir de 4 jours et l'expression diminue au stade de 12 jours.

L'analyse des séquences de l'ADNc de Z-1 a révélé la présence de structures uniques dans les séquences 3' non-codantes. Elles sont très longues (plus que 3 kb) et environ 70 % de l'ADNc de Z-1 semble être composé de séquences 3' non-codantes. Elles sont très riches en répétitions de type « AUUUA » qui sont considérées comme un signal de déstabilisation de l'ARNm (e.g., c-fos, c-myc, GM-CSF). Récemment, on a trouvé plusieurs « RNA binding proteins » qui contrôlent la différenciation de neuroblastes chez la Drosophile (e.g., ELAV : embryonic lethal abnormality of visual system) et aussi chez les vertébrés (e.g., Hu-D, Hu-C, Hel-N1). On a montré que ces protéines reconnaissent les séquences de poly-AU et, plus spécifiquement, les séquences de type « AUUUA ». Les cibles ARN de ces protéines ne sont toujours pas connues. Nous pensons que Z-1 pourrait être une de ces cibles et nous essayons de construire des vecteurs qui expriment l'ARN du 3' de Z-1 *in vitro* pour connaître les rôles de Z-1 dans la neurogenèse. Nous essayons de créer les anticorps contre la protéine Z-1 pour étudier la distribution de la protéine.

BEN : UNE NOUVELLE PROTÉINE D'ADHÉRENCE HOMOPHILIQUE DE LA SUPERFAMILLE DES IMMUNOGLOBULINES COMMUNE AUX SYSTÈMES NERVEUX ET IMMUNITAIRE

Au moyen d'un anticorps monoclonal, nous avons identifié une protéine membranaire, appelée BEN, exprimée au cours du développement du système nerveux et du système immunitaire aviaire (voir Lacoste-Eleau et al., 1993 pour l'expression dans les cellules hématopoïétiques). BEN est présente transitoirement à la surface de certaines sous-populations de neurones tels que les neurones dérivés de la crête neurale, ainsi que les motoneurones et les neurones du cerveau. BEN apparaît sur la membrane dès que les neurones sont postmitotiques. La molécule est abondamment représentée au niveau du corps cellulaire et de l'axone pendant la phase d'extension axonale, alors que son expression est réprimée au moment de la synaptogénèse. La protéine disparaît d'abord au niveau du corps cellulaire, puis de l'axone, mais est maintenue au niveau de la synapse fonctionnelle. L'étude de cette protéine nous a paru intéressante à cause de sa spécificité cellulaire (restriction à certains types neuronaux) et de son expression au cours de la maturation du système nerveux (restriction à la phase d'extension axonale). Nous avons donc entrepris la caractérisation moléculaire de cette protéine ainsi que des études plus détaillées de son expression dans différents systèmes neuronaux. Par ailleurs nous cherchons à comprendre le rôle joué par BEN dans la mise en place de ces différents systèmes. Enfin nous avons étudié l'expression de l'homologue humain de cette protéine au cours de l'ontogénèse du système nerveux.

1. CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE DE LA PROTÉINE BEN : UNE MOLÉCULE D'ADHÉRENCE HOMOPHILIQUE

1.1. *Approche transgénique chez la drosophile*

(O. POURQUIÉ, en collaboration avec K.-F. FISCHBACH
Université de Freiburg, RFA)

Le groupe de K-F Fischbach a récemment caractérisé une molécule de structure similaire à BEN, appelée IrreC, impliquée dans le guidage des axones rétiniens chez la drosophile. Nous avons décidé de comparer l'effet de la surexpression de ces deux protéines sur la formation du système nerveux de la drosophile. Les séquences codantes de chaque protéine ont été clonées sous contrôle de séquences UAS de levure dans un vecteur contenant un élément P de drosophile permettant la fabrication de lignées transgéniques. Plusieurs lignées contenant ces transgènes ont ainsi été fabriquées. Pour obtenir l'expression de ces transgènes, il est nécessaire de les croiser avec d'autres lignées transgéniques exprimant l'activateur Gal4 de levure (qui permet l'expression du gène sous contrôle des UAS) de manière tissu spécifique.

Dans les drosophiles issues de ces croisements, les gènes BEN ou IrreC sont alors transcrits de manière tissu-spécifique. Nous avons utilisé des lignées exprimant Gal4 dans le système nerveux afin de cibler l'expression des transgènes dans les neurones. Plusieurs lignées indépendantes exprimant les protéines BEN et IrreC dans le système nerveux ont ainsi été obtenues. Des résultats préliminaires montrent que dans les deux cas, les projections axonales sont très perturbées. Ces expériences sont en accord avec un rôle homophilique de la protéine BEN, la protéine agissant alors comme son propre récepteur.

1.2. *Etude de la distribution de BEN au cours de la mise en place des premiers faisceaux d'axones dans le cerveau aviaire*

(O. POURQUIÉ, en collaboration avec A. CHÉDOTAL et C. SOTELO INSERM U106, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière)

Une caractéristique du cerveau des vertébrés est la présence d'un circuit neuronal d'une complexité extrême. Sa mise en place est un phénomène progressif et se produit en grande partie au cours du développement embryonnaire. La première étape se manifeste par l'apparition d'une trame axonale primitive composée de quelques faisceaux, qui sont conservés au sein des vertébrés. Cette trame servira de base à la mise en place du reste de la circuiterie neuronale. Nous avons étudié l'expression de BEN au cours du développement du cerveau antérieur et du cerveau moyen de l'embryon de poulet où apparaissent ces premiers faisceaux. Grâce à l'utilisation de techniques d'immunomarquage *in toto* avec un anticorps dirigé contre un marqueur pan-neuronal (β -tubuline), ainsi qu'avec les anticorps anti-BEN, nous avons pu définir les étapes de la construction des premiers faisceaux d'axones dans le cerveau, ainsi que l'expression de BEN au cours de leur mise en place. Les premiers axones détectés dans le cerveau sont ceux dérivés du noyau interstitiel de Cajal qui est à l'origine du faisceau longitudinal médian. Ces axones expriment la protéine BEN. Peu de temps après l'apparition de ce premier faisceau apparaissent le faisceau de la commissure post-optique dont les axones ne portent jamais BEN, ainsi que le faisceau du noyau mésencéphalique du nerf trijumeau qui exprime BEN. Plus tard, BEN est détecté sélectivement sur certains faisceaux tels que les nerfs moteurs III et IV, l'habenula latérale, le faisceau des fibres tecto-bulbaires. D'autres tels que le faisceau de la commissure postérieure n'expriment jamais BEN au cours de leur mise en place. Par conséquent, nos résultats montrent que la protéine BEN est exprimée sélectivement par certains faisceaux d'axones dans le cerveau. Cette molécule pourrait permettre, grâce à ses propriétés d'adhérence homophilique une reconnaissance inter-axonale favorisant ainsi le maintien entre elles des fibres neuronales de même origine constituant un faisceau. Les résultats obtenus sur la construction du système nerveux des insectes montrent l'existence d'une combinatoire de molécules d'adhérence homophilique, impliquées

dans l'adressage des différents types d'axones. Dans le cas des vertébrés BEN paraît être une des molécules entrant dans une telle combinatoire.

2. RÔLE DE BEN DANS LES INTERACTIONS AXONES-CIBLES : ÉTUDE DE LA PROJECTION OLIVO-CÉRÉBELLEUSE

2.1. *Cartographie de l'expression de l'ARN messenger et de la protéine BEN au cours du développement du système olivo-cérébelleux*

(O. POURQUIÉ en collaboration avec A. CHÉDOTAL et C. SOTELO INSERM U106, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière)

Nous entrepris une étude systématique de l'expression de BEN au cours du développement du système olivo-cérébelleux du poulet grâce aux techniques d'immunocytochimie et d'hybridation *in situ* sur préparation *in toto* ou coupes histologiques. Nous avons ainsi détaillé l'expression de BEN au niveau des fibres grimpantes et montré que la protéine et l'ARN messenger correspondant est présent au niveau des cellules de Purkinje, cible de ces fibres. Par ailleurs, une compartimentalisation particulière du cervelet a été récemment décrite, notamment grâce au travail du groupe de Constantino Sotelo. On peut définir sur la base de leur immunoréactivité pour certaines protéines des compartiments divisant le cortex cérébelleux en bandes parasagittales dont la signification fonctionnelle n'est pas encore élucidée. Nos travaux montrent que l'expression de BEN respecte ce niveau d'organisation et se restreint à certaines bandes du cortex cérébelleux. De plus nous avons observé que cette compartimentalisation qui concerne la projection des fibres grimpantes, et les cellules de Purkinje intéresse aussi l'olive inférieure. Seules certaines sous-populations de ces neurones expriment la protéine BEN. Etant donné ses propriétés d'adhérence homophile, nous pensons que cette protéine pourrait participer aux phénomènes de reconnaissance cellulaire entre fibres grimpantes et cellules de Purkinje. De plus, la restriction de l'expression de BEN à certains compartiments de la projection olivo-cérébelleuse suggère que cette protéine pourrait participer à l'établissement de la topographie de la projection olivo-cérébelleuse. Une autre protéine jouant un rôle similaire et dont l'identité est encore inconnue pourrait rendre compte de l'établissement des connexions dans les territoires BEN- du cortex cérébelleux.

2.2. *Etude du rôle de la protéine BEN dans la mise en place de la projection olivo-cérébelleuse : utilisation de vecteurs rétroviraux*

(E. HIRSINGER, O. POURQUIÉ, N.M. LE DOUARIN en collaboration avec A. CHÉDOTAL et C. SOTELO INSERM U106, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière)

Nous avons entrepris de développer une stratégie faisant appel aux rétrovirus afin d'étudier le rôle de la protéine BEN *in situ*. Nous avons choisi l'emploi de vecteurs rétroviraux répliatifs dérivés du virus du sarcome de

Rous (RCAS) afin de forcer l'expression de constructions dérivées du cDNA codant pour BEN dans les cellules de Purkinje. Nous espérons ainsi perturber la mise en place de la cartographie de la projection olivocérébelleuse. Nous utilisons deux types de vecteurs qui diffèrent par leurs protéines d'enveloppe. Ces protéines confèrent aux virus des spécificités d'espèce particulières. Les virus du sous-groupe d'enveloppe A infectent les tissus de caille et de poulet alors que ceux du sous-groupe E n'infectent que la caille. Nous avons réalisé des constructions à partir du cDNA codant pour la protéine BEN, dépourvue des domaines transmembranaire et cytoplasmique afin de produire une protéine sécrétée. Ces constructions ont été introduites dans des vecteurs rétroviraux des sous-groupes d'enveloppe A et E. Nous avons produit des stocks de ces virus recombinants destinés à infecter l'embryon *in vivo* et à modifier l'expression de BEN *in situ*. Nous avons en outre vérifié que des cellules infectées par ces virus produisent la protéine BEN soluble dans le surnageant de culture. De plus, nos résultats préliminaires indiquent que cette protéine soluble est fonctionnelle puisqu'elle est capable de stimuler la croissance neuritique dans un système *in vitro*. Les virus sont injectés dans le tube neural d'embryons de 2 jours au niveau de l'ébauche du cervelet. Nos résultats montrent qu'il est ainsi possible d'infecter les cellules de Purkinje. Les perturbations produites par la surexpression d'une forme soluble de BEN sur la mise en place de la cartographie de la projection olivo-cérébelleuse sont actuellement en cours d'analyse.

2.3. Rôle de la protéine BEN dans l'établissement de la jonction neuro-musculaire

(C. FOURNIER-LERAY, O. POURQUIÉ et N.M. LE DOUARIN)

BEN est exprimée transitoirement par les motoneurons pendant la phase d'axonogénèse, et son expression décroît au moment de la synaptogénèse mais est maintenue au niveau de la synapse neuromusculaire. Etant donné que dans le système olivocérébelleux, BEN est présente au niveau de la projection grimpante et de sa cible, nous avons entrepris de voir si BEN est exprimé par les cellules musculaires, cibles des motoneurons. L'expression des ARN messagers et de la protéine BEN a été étudiée au cours du développement musculaire. Le myotome somitique et les masses pré musculaires des bourgeons de membres accumulent le messager et la protéine BEN à partir du 5^e jour de développement. Cette accumulation augmente jusqu'au 8^e jour dans les muscles brachiaux, c'est-à-dire pendant la période d'établissement de la synaptogénèse, puis décroît à partir du 11^e jour. En culture *in vitro*, les myoblastes provenant des muscles brachiaux prélevés à 7 jours expriment également les ARN messagers et la protéine BEN. Ces observations suggèrent que BEN, outre son rôle dans l'axonogénèse et la fasciculation des motoneurons, pourrait favoriser la reconnaissance des cellules musculaires par les motoneurons, par l'intermédiaire d'une interaction homophile. La situa-

tion observée dans le système neuro-musculaire est tout à fait similaire à celle décrite dans le système olivocérébelleux.

2.4. Analyse de la distribution de l'homologue humain de la protéine BEN au cours du développement

(O. POURQUIÉ, C. POURQUIÉ et B. PÉAULT)

L'homologue de la protéine BEN a été identifié chez le rat grâce à un anticorps monoclonal appelé F84.1 produit par le Dr William Stallcup à la Jolla Cancer Research (USA). Nous avons obtenu cet anticorps par le Dr Stallcup et observé qu'il existe une réaction croisée avec les tissus humains embryonnaires. Nous avons étudié la distribution de la protéine BEN humaine au cours du développement de la moelle épinière chez l'embryon humain de la 5^e à la 12^e semaine de gestation. La distribution observée au cours du développement est parfaitement similaire à celle de la protéine aviaire. En effet, la réactivité F84.1 apparaît au niveau des motoneurons dès que ceux-ci sont post-mitotiques et envoient leur axone vers la périphérie. Cette réactivité est maintenue sur les motoneurons pendant toute la phase d'extension axonale et disparaît au moment de la synaptogenèse de ces axones. Comme chez l'oiseau, F84.1 est aussi détectée sur tous les neurones dérivés de la crête neurale tels que les neurones sympathiques, sensoriels et aussi les neurones entériques. Par conséquent, l'homologue humain de la protéine BEN constitue un marqueur de sous-population neuronale en phase d'extension axonale. En tant que marqueur de surface cellulaire, BEN pourrait être exploité comme outil de tri de certaines sous-populations neuronales dans le cadre d'applications thérapeutiques telles que les greffes de neurones fœtaux.

UTILISATION DE CHIMÈRES EMBRYONNAIRES POUR L'ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

1. ÉTUDE DE L'ONTOGENÈSE DU CERVELET AU MOYEN DE LA TECHNIQUE DE MARQUAGE CELLULAIRE CAILLE-POULET

(M. HALLONET et N.M. LE DOUARIN)

1.1. Le territoire présomptif du cervelet a une double origine : mésencéphalique et métencéphalique

L'origine et la mise en place du cortex cérébelleux ont été étudiées au moyen du marqueur cellulaire caille-poulet grâce à des échanges isotopiques et isochroniques au niveau des vésicules mésencéphalique et métencéphalique entre des embryons de caille et de poulet au deuxième jour d'incubation. Les résultats font apparaître, d'une part, des mouvements morphogénétiques se

produisant dans cette partie du tube nerveux et, d'autre part, l'origine et les migrations des différentes catégories cellulaires du cortex cérébelleux.

Au stade de 12 paires de somites, le territoire présomptif du cervelet s'étend au niveau du mésencéphale caudal et du métencéphale rostral. Du matériel mésencéphalique dorsal est soumis à des mouvements rostro-caudaux qui le font pénétrer dans la vésicule métencéphalique. Il participe ainsi à la formation de la partie rostro-caudale de l'ébauche cérébelleuse. Ce territoire produit tous les types cellulaires du cortex cérébelleux à l'exception de la couche granulaire externe qui provient de la partie métencéphalique. En conséquence, l'ébauche cérébelleuse médio-rostrale comprend deux couches germinatives d'origines différentes : mésencéphalique caudale pour l'épithélium ventriculaire et métencéphalique rostrale pour la couche granulaire externe.

Concernant la mise en place des différentes cellules du cortex cérébelleux, nous avons observé que (i) les cellules de Purkinje migrent strictement radialement de façon centrifuge à partir de l'épithélium ventriculaire, (ii) les cellules de la couche moléculaire ne sont pas issues de la couche granulaire externe à l'opposé des descriptions classiques mais de l'épithélium ventriculaire, (iii) la couche des cellules de Purkinje comporte une population importante de petites cellules issues de l'épithélium ventriculaire et jusque là non décrites, (iv) à l'exception des cellules de Purkinje, toutes les cellules du cortex cérébelleux peuvent suivre des migrations à composantes tangentielles au cours de leur mise en place. En particulier, les cellules des grains en formation peuvent migrer transversalement au niveau profond de la couche granulaire externe.

1.2. *Délimitation du territoire cérébelleux*

Nous avons pratiqué des échanges isotopiques et isochroniques, au stade de 12 paires de somites, entre embryons de caille et de poulet de la vésicule mésencéphalique accompagnée de la moitié rostrale de la vésicule métencéphalique. Nous avons vu que le territoire présomptif du cervelet ne concerne que la moitié rostrale de la vésicule métencéphalique.

Dans le but de délimiter avec plus de précision les limites du territoire présomptif du cervelet, nous avons effectué des échanges de territoires du mésencéphale caudal ou du métencéphale rostral au stade de 12 paires de somites entre embryons de caille et de poulet avec des limites latérales allant de 20 à 120 degrés environ du plan sagittal. Le cervelet provient entièrement de part et d'autre de la plaque alaire située sur les 240° dorso-latéraux de la vésicule més- métencéphalique.

L'origine exacte et la mise en place de la couche granulaire externe (CGE) ont pu être étudiées grâce à ces chimères. Au niveau métencéphalique, les futures cellules de la CGE migrent d'une manière centrifuge à partir de

l'épithélium ventriculaire vers la surface de l'ébauche cérébelleuse. Puis, elles migrent tangentiellement en suivant des mouvements caudo-rostraux et latéro-dorsaux pour recouvrir la partie mésencéphalique de l'ébauche. Ainsi les cellules localisées ventralement dans les plaques alaires métencéphaliques au stade de 12 paires de somites sont observées ultérieurement aux niveaux latéraux et rostraux de la couche granulaire externe.

2. F.EPI UN MODÈLE AVIAIRE D'ÉPILEPSIE GÉNÉRALISÉE. ÉTUDE ET TRANSFERT PAR GREFFES EMBRYONNAIRES

2.1. *Transfert de l'épilepsie photogène par greffe d'épithélium neural d'un embryon de poulet épileptique chez un embryon de poulet normal* (N.M. LE DOUARIN, M.-A. TEILLET et B. SCHULER, en collaboration avec R. NAQUET et G. LE GAL LA SALLE et P. MERAT)

Une épilepsie généralisée, réflexe, d'origine génétique a été découverte chez le poulet par R. Crawford en 1970. Il s'agit d'une mutation récessive à pénétrance complète apparue spontanément dans une souche de poulets Fayoumi et conservée sur une souche dite synthétique (F.Epi). Les crises d'épilepsie des F.Epi peuvent être déclenchées par une lumière intermittente (SLI) ou toute autre stimulation nerveuse (bruit, mouvement, fatigue musculaire ou stress). Les crises à la lumière se déroulent d'une manière stéréotypée en trois phases principales : alerte avec pertes d'équilibre, clonies du cou, convulsions généralisées auto-entretenues. Ces crises apparaissent dès la naissance et durent toute la vie. Un électroencéphalogramme (EEG) interictal de type épileptique et une sensibilité aux drogues anticonvulsivantes en ont fait un modèle d'épilepsie généralisée (Johnson et Tuckek, 1987 ; Crawford, 1990).

Profitant de la possibilité de construire par microchirurgie embryonnaire des chimères ayant tout ou une partie de leur cerveau provenant d'un autre animal (Balaban et al., 1988), nous avons tenté de transférer l'épilepsie photogène chez des poulets sains par la greffe isotopique de certaines régions du cerveau prélevées chez des embryons génétiquement épileptiques. Cette opération est réalisée *in ovo* chez des embryons de 2 jours d'incubation au stade de 12 somites environ. Nous avons démontré que le transfert complet de l'épilepsie photogène (comprenant les 3 phases de la crise) est réalisé par la greffe d'au moins le *prosencephale* et le *mésencéphale*. Les caractéristiques EEG interictales (ondes lentes et pointes-ondes) sont transférées avec la greffe du *prosencephale* seul. Dans ce cas cependant, les chimères, bien que sensibles à la lumière intermittente (alerte et perte d'équilibre), ne développent jamais de convulsions. Les chimères ayant reçu des greffes autres que le *prosencephale* ne présentent pas l'EEG interictal caractéristique et ne montrent généralement aucun comportement de type épileptique à la SLI. Ces

expériences montrent qu'il est possible de transférer une maladie nerveuse d'origine génétique par greffe neurale et que ce transfert est fonction du territoire greffé.

2.2. Activité électroencéphalographique pendant les crises induites par la lumière chez les F.Epi et les chimères épileptiques

(N. GUY, M.-A. TEILLET, B. SCHULER et N.M. LE DOUARIN, en collaboration avec C. BATINI, R. NAQUET et G. LE GAL LA SALLE)

Afin d'éviter les artefacts durant les crises, les animaux sont paralysés par le flaxédyl ou immobilisés par des bandages. Qu'ils soient paralysés ou non, tous les animaux épileptiques présentent paradoxalement, quelques secondes après le début de la stimulation lumineuse, une désynchronisation transitoire suivie d'un aplatissement du tracé électroencéphalographique. L'électromyogramme, enregistré conjointement, au niveau des muscles du cou, montre des clonies au rythme de la stimulation lumineuse. L'EEG ictal des poulets épileptiques rapproche ce modèle de ceux fournis par les rats et souris audiogènes qui présentent une désynchronisation et un aplatissement identiques durant les crises induites par le bruit. Ce type d'EEG peut être expliqué par 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.

2.3. Activité unitaire de neurones appartenant au Wulst (proscéphale) et au tectum opticum (mésencéphale), deux structures du système visuel

(N. GUY et M.-A. TEILLET, en collaboration avec C. BATINI et R. NAQUET)

L'étude a été faite chez des adultes paralysés, épileptiques ou non. Dans le *Wulst*, chez les épileptiques (F.Epi ou chimères) on enregistre spontanément une activité en bouffées généralement associées avec les pointes EEG interictales. Pendant la désynchronisation et l'aplatissement accompagnant la stimulation lumineuse, 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 sont irrégulières et ne subissent aucun changement sous SLI. Dans le *tectum* et les voies tectospinales, l'activité unitaire en période de repos est peu différente chez les poulets non épileptiques et les poulets épileptiques. C'est pendant la crise induite par la lumière qu'on distingue, 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 stimulation lumineuse. Sachant que la présence d'un mésencéphale épileptique est nécessaire chez les chimères pour l'apparition des convulsions nous avons émis l'hypothèse que le mésencéphale épileptique pouvait inhiber le contrôle cortical et désorganiser ainsi les fonctions motrices.

2.4. *Crises induites par la lumière et par le bruit chez les poulets F.Epi et chez les chimères. Etude comparative et mise en évidence des structures nerveuses impliquées*

(N.M. LE DOUARIN, B. SCHULER et M.-A. TEILLET, en collaboration avec C. BATINI, N. FADLALLAH, G. LE GAL LA SALLE et R. NAQUET)

D'un point de vue comportemental, les crises auditives se distinguent des crises visuelles par l'existence d'une vraie période de course entre la période d'alerte et les convulsions généralisées. La stimulation auditive la plus efficace est le bruit intense provoqué par le frottement d'objets métalliques sur la cage. Une composante visuelle n'est donc pas exclue. L'expression électroencéphalographique de la crise auditive comme celle de la crise visuelle est une désynchronisation éventuellement suivie d'un aplatissement. Plusieurs types de chimères ont été soumises à des stimulations visuelles et auditives :

a) Des chimères ayant uniquement le *proscncéphale* F.Epi. Elles présentent l'EEG interictal F.Epi typique, la phase 1 de la crise et une réaction d'éveil (EEG) à la lumière mais aucune réaction au bruit.

b) Des chimères avec le *pro-* et le *mésencéphale* F.Epi. Celles-ci montrent les caractéristiques comportementales et électrophysiologiques de l'épilepsie à la fois à la lumière et au bruit .

c) Des chimères avec le *mésencéphale* F.Epi, à l'exclusion du *proscncéphale*. Celles-ci, bien qu'ayant un EEG normal, développent des crises complètes au bruit. Lors de stimulations à la lumière, elles présentent des myoclonies du cou à la même fréquence que celle de la SLI. Des convulsions généralisées ont été observées occasionnellement chez quelques individus de cette série qui restent à l'étude.

d) Des chimères avec un *rhombencéphale* F.Epi, à l'exclusion du *mésencéphale*. Ces dernières ne réagissent ni à la lumière, ni au bruit.

L'expression du proto-oncogène *c-fos*, reconnu comme un marqueur d'activité neuronale et déjà utilisé comme marqueur de structures épileptiques chez certains rongeurs (Le Gal La Salle et al., 1992), a été révélée chez des poulets F.Epi et des chimères après des crises auditives ou visuelles. Quel que soit le type de stimulus employé, certaines structures mésencéphaliques étaient toujours marquées spécifiquement, alors que les mêmes structures ne l'étaient pas chez des poulets non épileptiques soumis aux mêmes stimulations. De plus, les structures relais, acoustiques ou visuelles étaient marquées spécifiquement selon le type de stimulus utilisé.

Ces résultats démontrent qu'au moins deux types d'épilepsie réflexe coexistent chez le poulet F.Epi. Ces deux phénomènes mettent en cause en plus de structures spécifiques dépendant du stimulus, une structure mésencéphalique commune qui peut être considérée comme le générateur de l'épilepsie dans cette mutation.

CLONAGE DE PROTÉINE-KINASES EXPRIMÉES CHEZ L'EMBRYON PRÉCOCE

(A. EICHMANN, C. MARCELLE, C. BRÉANT et N.M. LE DOUARIN)

Nous avons cloné, par la méthode de PCR, 23 molécules codant pour des fragments de protéines kinases à partir d'ARN messager isolé de la crête neurale, du tube nerveux et des blastodisques d'embryons de caille et de poulet. Parmi ces fragments, nous avons trouvé des récepteurs de type tyrosine kinase, des tyrosine kinases cytoplasmiques et des sérine/thréonine kinases. Seize des molécules clonées n'ont jamais été décrites dans la littérature. Afin d'étudier leur rôle potentiel pendant le développement de l'embryon d'oiseau, nous avons regardé leur expression dans l'embryon par la technique d'hybridation *in situ*. La plupart des kinases cytoplasmiques montraient une expression ubiquitaire, tandis que les récepteurs aux facteurs de croissance montraient un patron d'expression spécifique de différents tissus embryonnaires. Nous nous sommes ensuite concentrés sur quatre des récepteurs tyrosine kinase : deux récepteurs au VEGF (vascular endothelial growth factor) nommés Quek 1 et Quek 2 (pour quail endothelial kinase), un nouveau récepteur au FGF (fibroblast growth factor) appelé FREK (pour FGF-receptor-like embryonic kinase), ainsi que le PDGFR α (platelet-derived growth factor receptor alpha).

1. RÉCEPTEUR DU PDGFR α

Le PDGFR α est exprimé dans tout le mésoderme de l'embryon jeune. Les bourrelets nerveux, la crête neurale céphalique et le cristallin sont les seules structures ectodermiques qui l'expriment. L'expression du PDGFR α dans les cellules de la crête neurale est restreinte aux cellules de la lignée méséctodermique. Ces cellules vont former le derme, le tissu conjonctif et des os du crâne. Les dérivés neuraux de la crête n'expriment pas le récepteur. Le PDGFR α semble donc être un marqueur extrêmement précoce de la lignée méséctodermique.

2. RÉCEPTEUR AU FGFb

La séquence de la molécule FREK est à 80 % homologue à celle du récepteur au FGF4 de la souris. Cependant, les comparaisons de séquence avec les autres membres de la famille des récepteurs au FGF ont montré que la molécule PFR4, décrite chez le Pleurodèle, est plus homologue à FREK qu'au récepteur au FGF4. Ceci pourrait indiquer que FREK et PFR4 représentent un nouveau type de récepteur au FGF. FREK est exprimé dans l'embryon d'oiseau pendant la gastrulation dans l'ectoblaste ainsi que dans le

nœud de Hensen. Son expression s'éteint par la suite, pour réapparaître au quatrième jour du développement dans le myotome et dans le cartilage en formation. Il reste exprimé dans tous les muscles squelettiques de l'embryon et dans le muscle adulte son expression est restreinte aux cellules satellites. Dans des cultures de cellules satellites, nous avons pu démontrer qu'après addition de FGFb le transcrite codant pour le récepteur est rapidement augmenté, suggérant que le FGFb joue un rôle dans la prolifération de ces cellules.

3. RÉCEPTEURS AU VEGF

Nous avons réalisé le clonage de deux homologues aviaires du VEGF-R appelés Quek 1 et Quek 2. Plus précisément, Quek 1 et Quek 2 sont les homologues des récepteurs au VEGF humain KDR et flt-4, respectivement. Nous avons défini le pattern d'expression de ces gènes au cours du développement précoce de l'embryon d'oiseau. L'hybridation *in situ* avec Quek 1 et 2 a montré que leurs messagers respectifs sont exprimés presque exclusivement dans les cellules endothéliales. Ces cellules sont identifiables chez l'embryon de caille par l'anticorps monoclonal MB1/QH1. Cependant, Quek 1 et 2 sont exprimés dans le mésoderme précoce environ 15 h avant l'apparition de l'affinité QH1. Des expériences de greffes caille/poulet ont montré que ces précurseurs mésodermiques exprimant Quek 1 et 2 se différencient en cellules endothéliales (Couly et al., manuscrit en préparation). Quek 1 et 2 représentent donc des marqueurs pour des précurseurs endothéliaux à un stade très précoce de différenciation.

4. ÉTABLISSEMENT DE LA VASCULARISATION DU CERVEAU

L'un des processus d'angiogenèse les plus spectaculaires lors de l'embryogenèse est celui de l'invasion du neuroépithélium. Chez la caille, cette vascularisation commence au jour 3 (E3) dans le mésencéphale ventral et s'étend progressivement à d'autres régions du CNS. L'invasion des cellules endothéliales semble être soumise à un contrôle spatiotemporel strict. Néanmoins, les facteurs de régulation demeurent jusqu'alors inconnus. Une hypothèse, proposée dans le modèle murin est que le VEGF pourrait déterminer la colonisation du neuroépithélium par les cellules endothéliales (Breier et al., 1981). En effet, ce facteur commence à être exprimé dans le neuroépithélium au moment où les cellules endothéliales l'envahissent. Les VEGF-R Quek 1 et Quek 2 sont exprimés dans les premières cellules endothéliales qui envahissent le neuroépithélium de la caille à E3 (Eichmann et al., 1993). Cependant, ces gènes s'expriment déjà dans le mésoderme céphalique à E1, deux jours avant le début de la migration des cellules endothéliales. Ceci suggère que le neuroépithélium ne devient « attractif » pour les cellules endothéliales qu'à

E3. Les cellules Quek 1 et 2 positives ont-elles cependant la capacité de coloniser le neuroépithélium dès que les gènes s'y expriment ? Afin de répondre à cette question, nous avons cocultivé du mésoderme céphalique, isolé à partir d'embryon au stade de 3 somites avec un neuroépithélium de 4 jours. Cette culture organotypique de type « transfiltre » est similaire à celle décrite par Fontaine-Pérus et collaborateurs (Fontaine-Pérus et al., 1981). Brièvement, le mésoderme est immergé dans un milieu nutritif et recouvert de neuroépithélium exposé à l'air dont il est séparé par un filtre aux pores de 5 μm . Après 12 h, les cultures sont fixées et examinées pour l'expression de Quek 1 et 2 par la technique d'hybridation *in situ*. Les cellules Quek 1-2 positives semblent être les seules cellules à traverser le filtre (Eichmann, résultats non publiés). Ce résultat prouve que les précurseurs mésodermiques possèdent la capacité d'envahir le neuroépithélium dès leur apparition dans l'embryon et atteste la chémoattractivité du neuroépithélium à E4. Nous étudions actuellement les mécanismes moléculaires de l'invasion du neuroépithélium par les cellules endothéliales.

INTERACTIONS CELLULAIRES CONTRÔLANT LA MISE EN PLACE ET LE DÉVELOPPEMENT DES ORGANES AXIAUX

1. LE BOURGEON CAUDAL DE L'EMBRYON DE POULET EST RÉGIONALISÉ (M. CATALA)

Le bourgeon caudal est une structure embryonnaire qui apparaît en arrière du neuropore postérieur, au stade de 15 paires de somites environ. Il donne naissance à l'ensemble des tissus de la moitié caudale du corps. La théorie selon laquelle le bourgeon caudal des oiseaux et des mammifères est une structure homogène (Griffith et al., 1992) méritait d'être réexaminée avec la technique des chimères caille-poulet. Nous avons étudié le devenir de régions définies du bourgeon caudal de l'oiseau, en les greffant isotopiquement et isochroniquement de la caille chez le poulet et inversement au stade de 25 somites, stade auquel le bourgeon caudal est limité caudalement par un repli ectodermique. Nos expériences montrent que : (1) La charnière chorde-neurale décrite par Pasteels sous la partie la plus caudale du tube neural formé par neurulation primaire, ainsi que la partie la plus caudale de la notochorde située immédiatement à son contact, donnent naissance au plancher du tube neural et à la notochorde de toute la région caudale du corps. (2) Les 2/3 médians rostraux du bourgeon caudal fournissent les plaques alaires et dorsales du tube neural caudal ainsi que du mésoderme somitique. (3) La région médiane caudale et les régions latérales ne fournissent que du mésoderme. Les cellules mésodermiques prospectives issues de la région caudale migrent latéralement et s'ajoutent caudalement au mésoderme

paraaxial non segmenté, réalisant une croissance par accréation. Afin de connaître le degré de détermination de chacune de ces régions, nous avons réalisé des greffes hétérotopiques entre elles. Dans tous les cas, les dérivés cellulaires du greffon étaient identiques à ceux obtenus en greffes isotopiques, et non conformes à leur nouvelle localisation, montrant qu'au stade de 25 somites, le bourgeon caudal est régionalisé en territoires dont la destinée est déjà fixée d'une manière qui ne peut pas être altérée par une greffe dans un territoire hétérotopique.

Ces travaux nous permettent de proposer un modèle pour rendre compte de la mise en place des structures sacrées et caudales qui diffère de celle de structures céphaliques et cervicotroncales.

2. GÈNES DE LA FAMILLE *MSX* ET DÉVELOPPEMENT DES ORGANES AXIAUX ET DU SQUELETTE

Les gènes *Msx*, isolés chez différentes espèces de vertébrés et d'invertébrés, constituent une famille particulière de gènes à homéobox. Ils sont exprimés chez les Vertébrés dans des sites tels que le bourgeon de membre, les arcs mandibulaires ou les dents, où les interactions morphogènes entre les tissus sont actives.

2.1. *Expression du gène Msx 2 par les structures dorsales de l'embryon d'oiseau*

(A.-H. MONSORO, Y. TAKAHASHI et N.M. LE DOUARIN)

Nous nous sommes intéressés à l'expression du gène *Msx2* dans le tube neural et les tissus environnants chez l'embryon d'oiseau. Grâce à un gène cloné chez la Caille (Takahashi et Le Douarin, 1990) mais présentant 98 % d'homologie avec le gène de Poulet (Suzuki et al., 1991 ; Robert et al., 1991), nous avons tiré parti des greffes interspécifiques entre la Caille et le Poulet pour analyser par hybridation *in situ* l'expression du gène après modification des interrelations entre les tissus exprimant ce gène. Le gène *Msx2* présente une expression polarisée dorsalement, dans la plaque du toit du tube nerveux, sur toute la longueur de l'axe antéropostérieur (AP), ainsi que, au niveau du tronc, dans le mésenchyme dorsal qui donne naissance à l'apophyse épineuse de la vertèbre, et dans l'ectoderme dorsal. Nous avons pu ainsi mettre en évidence les interactions inductrices qui président à la mise en place du patron d'expression de *Msx2* dans la région troncale. Le tube nerveux dorsal, exprimant *Msx2* dès la fermeture du tube neural, induit l'expression de ce gène s'il est greffé dans le territoire somitique, le tube neural ventral ne produisant pas cet effet. De plus, l'expression ectopique de *Msx2* dans le mésenchyme somitique résulte en la différenciation d'îlots de cartilage ectopiques superficiels tandis que l'extinction de son expression est suivie d'une

absence de fermeture de l'arc neural et de l'apophyse épineuse de la vertèbre. Le gène *Msx2* est donc un bon candidat pour assurer les interactions entre le tube neural dorsal et les tissus sus-jacents, assurant la formation de la partie dorsale de la vertèbre.

2.2. Effet de la notochorde sur la formation de l'apophyse épineuse

Ces résultats posent le problème de la mise en place et du maintien de l'expression de *Msx2* au cours du développement du tube nerveux : lors de la rotation de 180° du tube nerveux, la plaque du toit en position ventrale cesse d'exprimer *Msx2*. Le problème se posait de savoir si ce phénomène résulte de l'environnement inhibiteur ventral (de la notochorde) ou de la perte de la proximité du tube nerveux avec l'ectoderme.

Nous nous sommes intéressés au rôle de la notochorde dans l'ontogenèse de cette partie de la vertèbre, et nous avons corrélié ces résultats avec l'expression précoce de *Msx2*. L'ablation précoce de la notochorde prévient la polarisation dorsoventrale (DV) correcte du primordium neural (van Straaten et Hekking, 1991). Cependant, le patron d'expression de *Msx2* n'est pas modifié par l'opération : il est donc établi au cours du développement, indépendamment de l'influence de la notochorde, au contraire de ce qui est observé pour d'autres gènes à expression dorsale comme *Pax3* (Goulding et al., 1993) ou *Dorsalin-1* (Basler et al., 1993). Cependant, si la notochorde est placée à E2 au-dessus de la plaque du toit, l'expression de *Msx2* est inhibée quand l'opération intéresse une région encore peu déterminée du tube nerveux (correspondant au territoire axial où le mésoderme est encore non segmenté). La greffe d'un obstacle neutre ne change pas l'expression de *Msx2*.

La vertèbre formée à la suite de cette opération est incomplète : la partie médiadorsale de la vertèbre reste ouverte, à cause de l'absence de fusion des arcs neuraux et de formation de l'apophyse épineuse à partir du mésenchyme dorsal (un obstacle neutre n'empêche pas la formation de cartilage dorsal). Loin de promouvoir la différenciation cartilagineuse comme c'est le cas quand la notochorde est en position ventrale, si elle est greffée médiadorsalement elle inhibe la formation de l'apophyse épineuse. Les cellules du mésenchyme dorsal obéissent donc à des signaux régulateurs distincts de ceux qui régissent la formation des parties ventrales et latérales de la vertèbre.

2.3. Effet de la notochorde sur le développement de la moelle épinière dorsale

Nous avons analysé par ailleurs l'effet des greffes médiadorsales de notochorde sur la formation de la moelle épinière dorsale de E4 à E9, grâce à l'analyse de divers marqueurs de polarité dorsoventrale du tube neural (la glycoprotéine BEN, la protéine DVR6, les gènes *Pax3*, *Pax6*, *Dorsalin-1*, *Msx1*), de la morphologie des embryons opérés (par histologie classique et par

microscopie électronique à transmission) et de la formation des fibres nerveuses (par la technique d'imprégnation argentique).

Lorsque la notochorde est implantée à E2 au dessus du tube neural en cours de fermeture, dans la majorité des cas, la plaque du toit se forme, des ganglions rachidiens témoignent de l'émigration de cellules de crête neurale. La morphologie et la taille de ces ganglions sont souvent anormales.

Dans des cas extrêmes (6/17 testés avec BEN), la partie caudale de la greffe présente de profondes modifications : les ganglions rachidiens ne sont plus détectables, des cellules de la plaque alaire sont induites à exprimer BEN et projettent des fibres hors de la moelle épinière, vers la racine motrice ventrale. Ce sont donc des motoneurones induits dorsalement par la notochorde greffée, à la place des interneurones.

L'analyse de différents marqueurs précoces et des modifications de leur expression à la suite de la greffe, met en évidence des sensibilités différentes pour chacun vis-à-vis de la notochorde greffée. Dans aucun des cas observés la plaque du toit n'exprime BEN et donc ne présente les signes d'une induction de plaque du plancher, dans le tube neural dorsal. Certains domaines comme la plaque du toit semblent partiellement déterminés à E2.

L'étude histologique montre que ces greffes provoquent à E7 la désorganisation de la ligne médiodorsale constituée par le septum dorsal en formation et à E9-10, la disparition des régions dérivées des plaques alaires. La greffe d'une notochorde dorsale n'induit pas la formation d'une nouvelle région de type ventral dorsalement mais plutôt interfère avec le développement normal provoquant la désorganisation du tissu, ce que les études réalisées à E3-E4 n'avaient pas décelé (Yamada et al., 1991 ; Artinger et Bronner-Fraser, 1992, par exemple). La raison pour laquelle les structures dérivées du tube neural dorsal dégèrent après la greffe médiodorsale d'une notochorde sont actuellement à l'étude.

3. LE DÉVELOPPEMENT DU SOMITE

Rôle des organes axiaux dans la polarisation dorso-ventrale du somite
(O. POURQUIÉ, M. COLTEY, M.-A. TEILLET, C. ORDAHL
et N.M. LE DOUARIN)

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 du mésenchyme paraxial en sphères épithéliales se formant 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 dermo-mytome. Celui-ci donne naissance aux muscles striés ainsi qu'au derme dorsal. Le

sclérotome est à l'origine du squelette axial de l'individu. 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 de cellules spécialisées constituant la plaque du plancher ou « floor plate » qui à son tour acquiert des propriétés d'induction homéogénétiques et induit les motoneurons 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 (motoneurons 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. Chez les embryons examinés à des stades précoces (de 2,5 j à 4 j), nous observons 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 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 au contact 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. La floor plate étant dotée des mêmes propriétés inductrices sur le tube nerveux que la notochorde, nous avons vérifié si celles-ci pouvaient aussi concerner le mésoderme paraxial. Nous avons observé que seule la partie ventrale du tube nerveux (contenant la floor plate) est 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.

Nos expériences montrent que la floor plate et la notochorde sont capable de produire *in vivo* des facteurs capables d'induire les cellules du mésoderme paraxial à se différencier en cartilage mais aussi de bloquer leur différenciation en dermomyotome. Notre hypothèse est que la différenciation de type dorsal (dermomyotome) constitue un phénotype par défaut vers lequel tendent

les cellules 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 précocement 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 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 provienne de la notochorde et agisse 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.

IMMUNOLOGIE

ÉTUDE DE LA DISTINCTION IMMUNITAIRE DU SOI ET DU NON-SOI

Depuis plusieurs années, nos recherches tendent à élucider les mécanismes qui président à l'induction de la tolérance immunitaire. Nous poursuivons nos travaux sur ce thème.

1. RÔLE DU STROMA ÉPITHÉLIAL THYMIQUE DANS LA TOLÉRANCE VIS-À-VIS DU SOI ET LA RESTRICTION AU CMH

1.1. *Dans le modèle aviaire*

Notre approche expérimentale a consisté à étudier le statut immunitaire d'animaux chimères adultes obtenus par des greffes intra- ou interspécifiques réalisées sur des embryons d'oiseaux : caille et poulet. Nous avons pu démontrer le rôle du stroma épithélial thymique dans l'établissement de la tolérance.

Nous avons ainsi montré, en situation xénogénique caille → poulet, que l'épithélium thymique a la capacité d'induire la tolérance tissulaire vis-à-vis

d'une autre greffe telle que le stroma bursique ou l'ébauche de l'aile, lorsque les deux greffes (rudiment bursique ou bourgeon alaire et ébauches épithéliales thymiques de caille) sont implantées à des stades qui précèdent le début du développement des cellules T de l'hôte.

Nous nous sommes alors tournés vers le modèle murin qui offre de grands avantages au plan de l'analyse moléculaire et génétique des phénomènes observés.

1.2. Dans le modèle murin

Nous avons montré que la restauration de la fonction immunitaire T de la souris athymique nude peut être obtenue par la greffe d'une ébauche thymique épithéliale prélevée au niveau de la 3^e poche branchiale d'un embryon de souris de 10 jours de gestation (E10). A ce stade l'épithélium thymique n'est pas encore colonisé par les précurseurs hématopoïétiques.

Ce modèle expérimental nous a permis, en collaboration avec le P^r Antonio Coutinho et le D^r Antonio Bandeira de l'Institut Pasteur, d'étudier les mécanismes intervenant dans la distinction du soi et du non soi, et l'éventuelle implication de l'épithélium thymique dans la sélection positive et dans la sélection négative des lymphocytes T.

L'épithélium thymique induit la tolérance à la peau et au tissu cardiaque alors que la tolérance aux lymphocytes B nécessite la présence de cellules hématopoïétiques

(V. THOMAS-VASLIN, J. SALAÜN, B. GAJDOS, N.M. LE DOUARIN en collaboration avec A. COUTINHO et A. BANDEIRA)

Des souris nude restaurées à la naissance par des greffes allogéniques d'épithéliums thymiques non encore colonisés (embryons de 10 jours de gestation (E10) sont tolérantes aux greffes de peau et de cœur de l'haplotype de l'ébauche thymique. La tolérance de ces animaux vis-à-vis de lymphocytes B est étudiée par l'injection intrapéritonéale de lymphocytes de différents haplotypes : donneur, receveur (ils sont alors distingués de ceux de l'hôte par un marqueur allotypique des Ig) et troisième souche. Des lavages de la cavité péritonéale sont effectués aux jours 2 et 5 après l'injection. Le pourcentage de lymphocytes B injectés, récupérés dans l'exsudat, est estimé après marquage immunofluorescent par cytofluorométrie (FACScan). On constate une élimination des cellules B de l'haplotype du donneur de l'épithélium thymique presque aussi rapide que celle des cellules B de la 3^e souche, alors que les cellules syngéniques au receveur persistent durant cette même période. Des immunisations préalables avec des cellules B n'affectent pas la tolérance à la peau et au cœur, mais accélèrent spécifiquement l'élimination des lymphocytes B injectés.

Par contre, la tolérance *in vivo* aux lymphocytes B est obtenue lorsqu'on restaure les souris avec des thymus colonisés par les précurseurs hématopoïétiques de la première vague (E15). La tolérance *in vitro* a également été étudiée chez ces chimères, par des tests de réaction lymphocytaire mixte (MLR) et d'estimation de la fréquence des cellules T produisant de l'IL-2 en dilution limite. Une réactivité *in vitro* est observée contre les cellules B de l'haplotype du thymus greffé, démontrant que la tolérance *in vivo* est un phénomène dynamique indépendant de la réactivité *in vitro*.

L'ensemble de ce travail montre que l'induction de la tolérance *in vivo* aux cellules B nécessite la présence dans le thymus de précurseurs hématopoïétiques, alors qu'une tolérance définitive à la peau et au cœur est établie par la seule présence de l'épithélium thymique. Les mécanismes induisant la tolérance vis-à-vis des cellules hématopoïétiques d'une part et somatiques d'autre part apparaissent ainsi tout à fait distincts. Les premières nécessitent en effet pour être tolérées une interaction avec des cellules thymiques de même origine alors que les dernières sont protégées si l'épithélium thymique est du même haplotype.

Implication de l'épithélium thymique dans la sélection positive conduisant à la restriction au CMH des lymphocytes T

(V. THOMAS-VASLIN, J. SALAÜN M. COLTEY, N.M. LE DOUARIN, en collaboration avec M.F. SARON et A. COUTINHO)

Les cellules du stroma thymique responsables de la restriction des cellules T aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sont généralement considérées comme de nature épithéliale. Cependant, les méthodes utilisées jusqu'ici pour étudier ce problème ne permettent pas d'éliminer un rôle possible des cellules dendritiques d'origine hématopoïétique dans ce phénomène. Notre modèle expérimental offre la possibilité d'étudier cette question dans une situation proche des conditions physiologiques *in vivo* et de voir si les cellules épithéliales seules peuvent induire la restriction au CMH. Nous avons choisi de suivre *in vivo* la réponse de souris chimères à une infection intracrânienne par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (CML). En effet, chez des souris normales infectées par ce virus, les peptides viraux présentés en association avec les molécules du CMH sur les cellules méningées sont la cible des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺, ce qui entraîne la mort de la souris en 7 à 9 jours après l'infection. Des chimères BALB/c (H-2^d) restaurées avec des épithéliums thymiques d'embryons C3H (H-2^k) ou d'embryons BALB/c sont infectées par voie intracrânienne par le virus de la CML. Les souris chimères restaurées avec un épithélium thymique syngénique meurent dans le même laps de temps que les souris témoins, alors que les chimères restaurées par des greffes allogéniques survivent à l'infection. Ainsi, ces animaux sont protégés par la présence des cellules épithéliales thymiques allogéniques ; ceci montre que le rôle principal (et probablement exclusif)

dans la restriction au CMH est joué par l'épithélium du thymus. Celui-ci a donc un rôle primordial dans deux des fonctions majeures du thymus : l'induction de la tolérance vis-à-vis du soi et la restriction au CMH.

2. TOLÉRANCE PÉRIPHÉRIQUE

Tolérance périphérique par des greffes embryonnaires de l'ébauche épithéliale de la bourse de Fabricius entre embryons de poulets non-histocompatibles
(C. MARTIN, M. BELO, N.M. LE DOUARIN et C. CORBEL)

Le problème se posait de savoir si la greffe embryonnaire allogénique d'un tissu donné induit une tolérance restreinte aux antigènes qu'il porte ou étendue à d'autres tissus. Nous avons ainsi testé si la greffe embryonnaire de l'ébauche épithélio-mésodermique de bourse de Fabricius (organe responsable de la différenciation des lymphocytes B) peut induire une tolérance vis-à-vis de la peau, c'est-à-dire vis-à-vis d'un tissu non inclus dans la greffe. Nous avons en effet mis au point un protocole expérimental qui permet d'exciser la bourse de Fabricius chez l'embryon de 5 jours d'incubation, c'est-à-dire avant qu'elle n'ait été colonisée par les cellules hématopoïétiques. La bourse excisée est ensuite remplacée *in situ* par une ébauche bursique allogénique dont nous savons par des expériences antérieures réalisées en situation xénogénique, qu'elle peut être colonisée et qu'elle peut reconstituer le compartiment B de l'individu (Corbel et al., 1987).

Des chimères bursiques obtenues par la greffe du rudiment de la bourse de Fabricius entre embryons de poulet histoincompatibles ont été construites. Les greffes isotopiques et isochroniques sont réalisées à 5 jours d'incubation. Les souches utilisées appartiennent aux haplotypes du CMH suivants : donneur B4 → receveur (B15 × B21)F1 et donneur B12 → receveur (B15 × B21)F1.

L'induction de la tolérance a été testée *in vitro* en MLR et *in vivo* par des greffes de peau de différents haplotypes du CMH (du donneur, du receveur, et d'une troisième souche) réalisées chez le poulet chimère adulte.

Nous avons montré que la bourse allogénique greffée se développe normalement avant et après la naissance et qu'elle n'induit pas de tolérance tissulaire (tolérance de peau de poulet adulte du même haplotype que le donneur) pendant la phase où elle est elle-même tolérée. Cette tolérance n'est que temporaire, la bourse greffée étant elle-même rejetée environ deux mois après la naissance.

Aucune tolérance *in vitro* n'est induite, la réponse proliférative des lymphocytes T du sang des chimères, testée en réaction lymphocytaire mixte, est similaire à celle des poulets normaux. La capacité tolérogène de différentes ébauches paraît donc dépendre de la quantité d'antigènes étrangers introduits chez le receveur mais aussi de leur origine embryonnaire. Le bourgeon alaire

et le rudiment épithélio-mésenchymateux bursique se développent à partir de différents feuilletts embryonnaires ; le mésoderme et l'ectoderme pour l'aile, le mésoderme et l'endoderme pour la bourse de Fabricius. L'épiderme, d'origine ectodermique, pourrait être responsable de l'induction de la tolérance vis-à-vis de la peau observée dans le cas des chimères d'aile allogéniques. Au contraire, la bourse de Fabricius dépourvue de peau, ne peut induire de tolérance vis-à-vis des antigènes portés par ce tissu.

Comme nous l'avons déjà observé, le thymus a à cet égard un statut immunologique particulier puisqu'il n'est rejeté ni en greffe xéno- ni en greffe allogénique. Ceci a également été vérifié dans notre modèle expérimental des chimères bursiques allogéniques. Ainsi la greffe de l'ébauche thymique du même haplotype que celle de la bourse de Fabricius induit la tolérance de la bourse greffée et de greffes de peau du même haplotype.

DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DES GONADES

(S. MAGRE, V. FRIDMACHER, A. APPERT, S. PERLMAN, O. LOCQUET)

A la suite de l'admission à la retraite du Professeur A. Jost, le Groupe de Physiologie du Développement du Collège de France a été rattaché administrativement à la Chaire d'Embryologie Cellulaire et Moléculaire du Professeur Nicole Le Douarin.

Depuis le décès de Monsieur Jost (3 Février 1991), S. Magre assure la responsabilité scientifique et administrative de ce groupe qui fait partie depuis 1993 de l'UMR-CNRS-9924-Institut d'Embryologie Cellulaire et Moléculaire, sous le nom d'équipe Différenciation Sexuelle des Gonades.

1. INTRODUCTION

Les recherches effectuées au cours des quatre dernières années sont le prolongement des travaux initiés par A. Jost sur l'étude des mécanismes responsables de la différenciation sexuelle et particulièrement sur ceux impliqués dans la différenciation testiculaire.

La différenciation du testicule fœtal est une étape-clé de la différenciation sexuelle chez les mammifères. Elle se produit précocement par rapport à la différenciation ovarienne et on sait, depuis les expériences de castration de fœtus de lapin *in utero* (Jost, 1947) que ce sont les hormones sécrétées par le testicule fœtal qui provoquent la masculinisation du sexe corporel en s'opposant au programme constitutif féminin. Au cours de ces dernières années, le développement de la génétique moléculaire a permis d'identifier sur le chromosome Y une séquence nucléotidique SRY (sex determining region y),

facteur probable de la détermination testiculaire. Toutefois, la ou les cibles de ce facteur, de même que les mécanismes responsables de la différenciation gonadique sont encore inconnus.

Les résultats antérieurs du laboratoire, obtenus par l'analyse détaillée *in vivo* et *in vitro* des stades initiaux de la différenciation testiculaire chez le fœtus de rat, ont montré que la première étape de la morphogenèse testiculaire est la différenciation d'un nouveau type cellulaire dans le blastème mâle à 13,5 jours de gestation. Ces cellules qui, dans les heures qui suivent, s'associent étroitement les unes aux autres pour former les cordons séminifères, sont les cellules de Sertoli primordiales.

Contrairement à ce que la plupart des travaux précédents avaient décrit, ces observations indiquaient que la différenciation testiculaire résulte de phénomènes de différenciation et de reconnaissances cellulaires et non de proliférations ou de réarrangements de cordons sexuels préexistants. Ces résultats originaux ont, donc, orienté nos recherches sur l'analyse des phénomènes de cytodifférenciation et d'interactions cellulaires au cours des premiers stades de la différenciation sexuelle des gonades.

2. MORPHOGENÈSE ÉPITHÉLIALE AU COURS DE LA DIFFÉRENCIATION GONADIQUE CHEZ LE RAT : ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES CYTOKÉRATINES

Les cytokératines (CKs) sont une des catégories protéiques constitutives des filaments intermédiaires, habituellement exprimées dans les cellules épithéliales. Elles forment une famille multigénique, composée de 20 espèces moléculaires différentes regroupées en sous-familles de type I : protéines acides et de type II : protéines basiques. Les filaments intermédiaires sont formés par l'appariement obligatoire de cytokératines de type I et de type II.

Des résultats préliminaires obtenus, en immunofluorescence indirecte, avec un anticorps reconnaissant un épitope commun à la plupart des CKs semblaient indiquer que l'immunoréactivité dépendait de l'état morphogénétique de la gonade.

Nous avons, alors, entrepris une étude détaillée, en immunohistochimie et en immunoblot, de l'expression des cytokératines comparativement dans les gonades des deux sexes depuis le stade indifférencié, jusqu'à 2 semaines après la naissance.

Les résultats obtenus ont montré que dans la gonade indifférenciée, quel que soit le sexe, la CK 8 (basique) est coexprimée avec la CK 19 (acide). Au cours du développement de l'ovaire ce profil d'expression est maintenu, les CKs 8 et 19 sont présentes dans les cellules somatiques des cordons ovigères puis dans les follicules primaires. Dans les follicules en croissance la réactivité diminue et disparaît progressivement. Dans le testicule foetal, dès le stade de

13 jours, c'est à dire lorsque les premières cellules de Sertoli se différencient, une réactivité pour la CK 18 apparaît. De 14 à 16 jours les cellules de Sertoli coexpriment les CKs 8, 18 et 19, puis progressivement, la réactivité de la CK 19 diminue. A partir de 18-19 jours jusqu'à la période prépubère, les cellules de Sertoli expriment les CKs 8 et 18.

Afin de déterminer le niveau de régulation de l'expression des CKs 18 et 19 au cours de la différenciation gonadique, nous avons étudié l'expression des ARNm des CKs 18 et 19 comparativement dans les gonades mâles et femelles depuis le stade de 12 jours jusqu'à 20 jours de gestation. Ce travail a été effectué en collaboration avec Florian Guillou (INRA, Nouzilly).

Des expériences de Northern Blot ont été réalisées sur des gonades de 20 jours, en utilisant des sondes ADNc murines fournies par le D^r Jorcano (Madrid, Espagne) et le D^r Royal (Montréal, Canada). Pour les stades antérieurs, nous avons utilisé les techniques de RT-PCR et d'hybridation *in situ*. Les séquences oligonucléotidiques servant d'amorces pour la PCR ont été déduites des séquences comparées d'humain, de souris et de bovin. Les sondes rat qui ont été utilisées pour l'hybridation *in situ* ont été obtenues par clonage des fragments d'ADNc amplifiés par la PCR. Leur séquençage a montré qu'elles présentaient plus de 90 % d'homologie avec les séquences de souris.

Les transcrits de la CK 19 sont présents dans la gonade indifférenciée et dans les cellules somatiques des cordons ovigères. Ils sont absents des cellules de Sertoli. Les transcrits de la CK 18 ne sont présents ni dans la gonade indifférenciée ni dans les ovaires. Ils apparaissent dans la gonade mâle très précocement, dès le stade de 13 jours, dans des régions qui ne présentent pas encore de morphogénèse de type testiculaire. Ils sont par la suite abondants dans les cellules de Sertoli.

Ces résultats, en cours de publication, montrent qu'il existe une régulation transcriptionnelle précoce de l'expression des CKs 18 et 19 au cours de la différenciation du testicule foetal qui ne se produit pas durant le développement de l'ovaire.

Perspectives : Nous envisageons de poursuivre notre étude en recherchant les mécanismes et les facteurs impliqués dans cette régulation. L'utilisation de souris transgéniques pour le promoteur de la CK 19 est prévue. Nous pensons que le développement de ces recherches devrait d'une part, nous permettre d'obtenir des informations sur les processus morphogénétiques impliqués dans la différenciation testiculaire sous le contrôle du chromosome Y ; d'autre part, nous fournir un modèle d'étude des relations existant entre l'expression des CKs et l'état de différenciation cellulaire.

3. ÉTUDE DU RÔLE DE FACTEURS DIFFUSIBLES DANS LA DIFFÉRENCIATION GONADIQUE

L'hypothèse que des facteurs diffusibles interviennent dans l'établissement de la différenciation sexuelle a été avancée, au début du siècle, à la suite de l'observation de cas de développement sexuel anormal, tel le Free-martinisme chez les bovins. La théorie hormonale du Free-martinisme supposait que les anomalies observées chez le freemartin, femelle issue d'une gestation gémellaire hétérosexuée, étaient provoquées par l'hormone du jumeau mâle transmise par les anastomoses vasculaires.

L'intervention des hormones dans la sexualisation du sexe corporel a été clairement établie en particulier par les expériences de Jost. Les hormones du testicule foetal, AMH (hormone anti-Müllerienne) et stéroïdes androgènes provoquent la masculinisation du tractus génital. En revanche, en ce qui concerne la différenciation des gonades, les mécanismes cellulaires et moléculaires en cause n'ont pas encore été élucidés avec précision.

a) Rôle de l'AMH

Les tentatives pour reproduire l'effet Freemartin sur des gonades de mammifères à l'aide de stéroïdes ayant échoué, l'hypothèse a été avancée que l'hormone testiculaire active pouvait être l'AMH.

La possibilité d'obtenir de l'AMH bovine purifiée (équipe de N. Josso) a permis de tester le rôle éventuel de cette hormone en l'introduisant dans le milieu de culture de gonades femelles. Dans ces conditions, on reproduit différents aspects de la gonade des free-martins : diminution du volume de la gonade, chute du nombre des cellules germinales et différenciation de cordons de type testiculaire.

Les mêmes résultats ont été obtenus dans des expériences de co-culture testicule-ovaire donc dans un modèle homospécifique. Nous avons cherché à savoir si les modifications morphologiques s'accompagnent d'une masculinisation fonctionnelle. Des cellules réactives pour l'AMH en immunohistochimie apparaissent dans la gonade femelle soumise à l'action testiculaire. Nous recherchons actuellement la présence d'ARNm de l'AMH par hybridation *in situ* dans les gonades masculinisées. Pour cela, en collaboration avec J.Y. Picard (INSERM 293) nous avons cloné par PCR une sonde AMH de rat.

Parallèlement, nous étudions l'expression des cytokératines dans les ovaires masculinisés comparativement aux ovaires témoins. Cette recherche est effectuée en hybridation *in situ*. Les premiers résultats obtenus indiquent clairement que dès le 2^e jour de culture l'ARNm de la CK 19 n'est plus détectée dans les ovaires masculinisés alors qu'il est présent dans les ovaires témoins.

Perspectives : Nous pensons que les résultats résumés ci-dessus doivent nous fournir un nouveau modèle d'étude des relations entre la différenciation testiculaire et l'expression des CKs ainsi que la possibilité d'analyser plus précisément le rôle éventuel de l'AMH dans la morphogénèse du testicule.

b) Rôle des stéroïdes

Le rôle des stéroïdes et particulièrement des œstrogènes dans la différenciation de la gonade d'espèces non-mammaliennes tels les oiseaux ou certains reptiles a été abondamment documenté depuis de nombreuses années. Toutefois, les mécanismes moléculaires et cellulaires de leur action sont encore inconnus.

Grâce à l'infrastructure de l'Institut d'Embryologie Cellulaire et Moléculaire, 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.

Dans cette optique l'équipe de Cl. Pieau a déterminé les niveaux d'activité de l'aromatase, dans les gonades des deux sexes, au cours du développement. L'activité de l'enzyme nulle à 5 jours d'incubation dans les gonades femelles, augmente à partir de 6 jours pour atteindre son maximum à 12-14 jours d'incubation et décroît jusqu'à l'éclosion. On ne note pas de différences notables entre les ovaires droit et gauche. Le niveau d'activité dans le testicule reste faible quel que soit le stade de développement.

**MIGRATIONS CELLULAIRES : ÉTUDE DU CHIMIOTACTISME
DES CELLULES GERMINALES CHEZ LES OISEAUX
(EMBRYON DE POULET)
(R. DUBOIS, D. CUMINGE)**

Ces dernières années nos travaux ont traité deux thèmes principaux :

- 1) Recherche de l'origine embryologique de la lignée germinale des Reptiles (Tortue) et des Oiseaux (Poulet).
- 2) Approche moléculaire de la migration chimiotactique des cellules germinales chez les Oiseaux.

Grâce à la présence d'un marqueur biologique d'origine ovulaire, l'origine embryologique de la lignée germinale des Batraciens Anoures est connue dès

les premiers stades de la segmentation. Ce groupe fait exception car chez les autres Vertébrés et notamment les Vertébrés Supérieurs (Reptiles, Oiseaux, Mammifères) l'absence de marqueur rend ce problème particulièrement ardu.

L'opinion qui a longtemps, et majoritairement, prévalu attribuait aux cellules germinales (CGP) des Amniotes une origine endoblastique extra-embryonnaire. Nous avons récemment démontré que chez les Reptiles Chéloniens (Tortue : Cistude d'Europe) les initiales germinales sont toutes localisées, au stade de la jeune gastrula, dans le feuillet supérieur à **potentialités exclusivement embryonnaires**.

Ce n'est que secondairement qu'une migration de vaste amplitude les conduit, au terme de la gastrulation, dans le massif endophyllien de l'endoblaste extra-embryonnaire postérieur (1 et 2).

Chez les Oiseaux la question est demeurée ouverte à une controverse liée à l'existence des phénomènes de régulation des déficiences qui se produisent lorsque le développement de très jeunes blastoderms est perturbé par de sévères agressions expérimentales.

Nous avons mis au point une procédure expérimentale qui préserve l'intégrité de chaque blastoderme expérimenté et permet d'exploiter, en l'absence de processus de régulation, les résultats obtenus du double point de vue histologique et quantitatif (3).

En bref, le nombre de CGP en position supérieure (= CGP_s) décroît au cours des premières 24 heures d'incubation selon :

$$(CGP_s) + 2,25 t - 74 = 0,$$

tandis que le nombre de CGP identifiées dans le feuillet inférieur à destinée extra-embryonnaire croît en accord avec l'expression :

$$(CGP_i) - 3,27 t + 21 = 0, \text{ avec } t \text{ en heures d'incubation.}$$

Ce système d'équations est en bon accord quantitatif, cinétique et chronologique avec l'existence d'une relation de précurseurs à dérivés qui désigne des (CGP_s) comme antécédents exclusifs des (CGP_i). Toutefois ce qui paraît clair en langage cinétique devient entaché d'ambiguïté lorsque l'on cherche à traduire, en termes d'embryologie évolutive, la relation de causalité observée.

Chez les Oiseaux, la situation est équivoque car le feuillet supérieur, abusivement qualifié d'**épiblaste** à potentialités exclusivement embryonnaires, représente en réalité l'équivalent embryogène de l'unique feuillet originel issu de la segmentation. A ce titre il recèle donc, — exprimées ou cachées —, les composantes embryonnaires, extra-embryonnaires, et la lignée germinale elle-même. Lorsque le feuillet supérieur atteint, au cours de la gastrulation, un degré d'évolution qui le différencie en épiblaste à potentialités embryonnaires, il a pratiquement épuisé son potentiel germinal en même temps que sont éteintes ses potentialités extra-embryonnaires.

Ces conceptions nous conduisent à souligner l'identité de comportement et la communauté d'origine des lignées germinale et endophyllienne, mises en place de manière quasi synchrone, et qui partagent par ailleurs l'ooplasme germinal (d) d'après M. Callebaut (1987).

Ainsi, la situation décrite chez les Oiseaux est fondamentalement différente de celle rencontrée chez les Tortues où les CGPs sont localisées dans un feuillet supérieur à potentialités exclusivement embryonnaires et provisoirement tenues à l'écart d'un hypoblaste dont la mise en place est très nettement antérieure à celle de la lignée germinale. En d'autres termes, des processus identiques étroitement associés chez les Oiseaux sont radicalement découplés chez les Tortues qui représentent vraisemblablement un modèle plausible des événements qui se déroulent chez les Mammifères. Malgré quelques obscurités liées aux difficultés d'interprétation, il reste que la lignée germinale demeure à ce jour la seule lignée cellulaire des Vertébrés Supérieurs dont on ait remonté aussi loin les origines et décrit aussi précisément l'évolution ontologique au cours des toutes premières étapes de l'embryogenèse (4).

On sait que la migration des cellules germinales des Oiseaux est orientée par un mécanisme chimiotactique dans lequel les ébauches gonadiques jouent un rôle directeur. Le substrat sert de support aux mouvements cellulaires et peut, en tant qu'agent extérieur, influencer sur les modalités de la migration ; **mais il ne la détermine pas** (5 et 6).

Le chimioguidage exercé par le but à atteindre est électif et fait intervenir des complexes glycoprotéiques dans le mécanisme signal-réponse. La Concanavoline A perturbe les déplacements orientés des cellules germinales sans inhiber leur motilité. C'est par le brouillage des interactions entre le signal du télépilotage et les récepteurs cellulaires que la lectine enrave le processus de colonisation des ébauches gonadiques. La Concanavoline A couplée à la peroxydase démontre une très nette affinité pour les CGP auxquelles elle se lie préférentiellement et électivement lorsque des conditions de concentration et d'incubation dans les milieux réactionnels sont respectés (Cuminge et Dubois) (7).

Nous avons été conduits à préciser le rôle des glycoprotéines dans le chimiotactisme des cellules germinales en mettant en œuvre un inhibiteur de la glycosylation, la Tunicamycine. Des difficultés majeures se sont opposées à l'utilisation de cette molécule en embryologie expérimentale : l'extrême toxicité de la Tunicamycine rend hasardeuse toute interprétation des résultats obtenus sur des systèmes vivants. Des concentrations infinitésimales de l'ordre du $1/10^6$ de $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ provoquent en quelques heures l'arrêt cardiaque et l'atrophie du réseau vasculaire des blastoderms expérimentés. Les CGP des Oiseaux transitant obligatoirement pas la circulation embryonnaire avant d'aborder l'ultime étape chimiotactique de leur migration, toute mesure est dans ces conditions falsifiée.

Nos efforts ont été dirigés vers la culture organotypique qui permet de construire des associations hétérochroniques et d'étudier l'intensité de la migration en l'absence du réseau vasculaire (5). A des concentrations égales ou inférieures au $1/10^6$ de $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ du milieu de culture, la Tunicamycine désorganise totalement des explants. La puissance toxique de cette substance est telle que tissus et épithéliums subissent en quelques heures une sévère dilacération biochimique accompagnée de nécroses. Ainsi, toute action spécifique au niveau des glycosylations est masquée par des effets toxiques drastiques et les résultats sont inexploitable. Par cet exemple on voit comment une substance dont l'action chimique spécifique est précisément connue dès lors qu'elle concerne un mécanisme biomoléculaire pur et isolé dans une éprouvette, se révèle être d'un emploi périlleux lorsqu'elle est introduite dans un système biologique de grande complexité. Malgré l'aspect décevant d'un ensemble expérimental qui s'est soldé par des échecs, il reste un acquis positif à retenir d'une impasse localisée à la frontière du biochimique et du vivant.

Des expériences préliminaires réalisées par S. Jakubowicz dans le cadre d'un DEA (8) ont montré que la Dexaméthasone inhibe la migration des CGP des Oiseaux. Bien que ces résultats aient été recueillis dans un contexte statistique qui manque de robustesse, leur analyse nous a paru suggérer qu'il existe une **relation simple** entre l'intensité de l'inhibition et la concentration de la Dexaméthasone dans le milieu de culture. Nous tentons actuellement d'établir l'expression mathématique qui décrit cette loi d'inhibition et de préciser le rôle inhibiteur en termes d'interactions moléculaires.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) CUMINGE D. et DUBOIS R. (1987). La lignée germinale de la Cistude d'Europe. I. Origine et localisation primaire des cellules germinales. *Arch. Biol.* (Bruxelles), 98 : 407-440.
- (2) DUBOIS R. et CUMINGE D. (1990). La lignée germinale de la Cistude d'Europe. II Interprétation mathématique des modalités cinétiques de la migration et de la prolifération des cellules germinales. *Arch. Biol.* (Bruxelles), 101 : 411-445.
- (3) CUMINGE D. et DUBOIS R. (1992). L'origine de la lignée germinale des Oiseaux : étude expérimentale chez le Poulet. *Eur. Arch. Biol.*, 103 : 195-209.
- (4) CUMINGE D. et DUBOIS R. (1989). La localisation des cellules germinales dans le jeune blastoderme des Oiseaux : étude expérimentale chez le Poulet, le Canard et la Caille. *Arch. Biol.* (Bruxelles), 100 : 207-236.

- (5) CUMINGE D. et DUBOIS R. (1968). La colonisation des ébauches gonadiques par les cellules germinales de l'embryon de Poulet, en culture *in vitro*. *J. Embryol. exp. Morph.*, 20 : 109-213.
- (6) DUBOIS R. (1982). La migration des cellules germinales chez l'embryon de Poulet. III. Aspects hémodynamiques et déterminisme de l'asymétrie de répartition des gonocytes à l'avantage du côté gauche. *Arch. Biol.* (Bruxelles), 93 : 381-432.
- (7) Résultats non publiés.
- (8) JAKUBOWICZ S. (1978). Effets de la Dexaméthasone sur la colonisation des ébauches gonadiques par les cellules germinales primordiales chez l'embryon de Poulet. DEA Université Paris VII.

ACTIVITÉS DIVERSES

Nicole LE DOUARIN

Distinguished Lectures

Lecture at the Joint Meeting Anatomische Gesellschaft and Nederlandse Anatomen Vereniging, Düsseldorf, Germany, March, 1993.

Lecture at the XXI International Congress of Neurovegetative Research, Bologna, Italy, April 1993.

Lecture at the « Montagskolloquium » seminars, Max-Planck-Institut für Biologische Kybernetik, Tübingen, Germany, June 1993.

Lecture at the 14th Annual Philadelphia Regional Immunology Conference, Philadelphia, USA, November 1993.

Lecture as the Louisa Gross Horwitz recipient at the Columbia University of the City of New York, USA, December 1993.

Lecture at the Tomio Tada's Retirement Ceremony, Tokyo, February, 1994.

Conférence à la Consultation Nationale, « Recherche fondamentale : conforter les atouts de la France », Université de Bordeaux I, Talence, mars 1994.

Séminaires

— Laboratoire de Médecine Expérimentale, Inserm U. 289, Hôpital de la Salpêtrière, Invitation du P^r Y. Agid, le 12 février.

— Séminaire au Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Invitation des P^{rs} Peter Gruss et Guillermo Oliver, 27 janvier.

Activités d'enseignement

— Cours : « Tolérance allogénique » dans le cadre du DEA Bases Génétiques et Moléculaires du Système Immunitaire Normal et Pathologique (Invitation J.F. Bach), à l'Hôpital des Enfants Malades, 16 novembre.

— Cours dans le cadre de l'enseignement du P^r A. Pompidou, à l'Hôpital Cochin, 4 février.

— Cours « Chimères embryonnaires, une méthode pour étudier le développement du système nerveux » à l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière (Invitation P^r Yves Agid), 12 février.

Conférences sur invitation à des colloques, symposiums, congrès

1993 :

— Réunion Européenne de « Xénotransplantation », Fondation Marcel Mérieux et Institut des Sciences du Vivant, 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, Crète, 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.

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

1994 :

— 6th International « Workshop of Winter Advanced Course for Immunology and Infectious Disease », Furusato Village, Chiba, Japon, 13-16 février.

— Tomio Tada's Retirement Ceremony, Tokyo, Japon, 17-19 février.

— Journée « Malformations faciales et dysfonctionnement néonatal du tronc cérébral », Centre International de l'Enfance, Château de Longchamps, Paris, 1^{er} mars.

— First European Meeting on « Glial Cell Function in Health and Disease », Heidelberg, Germany, 24-27 mars, 1994.

— Meeting franco-japonais d'Immunologie, Château Cordeillan-Bages, Pauillac, 24-26 avril.

Direction de thèses

1993 :

« Etude de l'ontogenèse du cervelet au moyen de la technique de marquage cellulaire caille-poulet », *Marc Hallonet*, Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI.

« Caractérisation électrophysiologique et transfert de l'épilepsie réflexe du poulet Fayoumi par greffe d'épithélium neural chez l'embryon », *Nicolas Guy*, Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI.

1994 :

« La polarité dorsoventrale de la moelle épinière et de la vertèbre : implication du gène *Msx2* », *Anne-Hélène Monsoro-Burq*, Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI.

« Le bourgeon caudal et sa contribution à la formation de la queue embryonnaire chez l'oiseau », *Martin Catala*, Thèse de Doctorat de l'Université Paris XIII.

Distinctions

Expert au Comité Stratégique Recherche pour 1993.

Membre Honoraire Etranger de l'Académie Royale de Belgique, 1993.

Honorary Fellow of the Royal College of Pathologists, London, 1993.

Membre Titulaire de l'Académie Européenne des Sciences, des Arts et des Lettres, Paris, 1993.

Lauréate du Prix Louisa Gross Horwitz at the Columbia University in the City of New York, 1993.

Membre du Board of Directors of the International Society of Differentiation, 1994.

PRIX LACASSAGNE 1994

Gérard COULY, Professeur à la Faculté de Médecine de Paris V, Chef du Service de Stomatologie Pédiatrique à l'Hôpital Necker-Enfants Malades, chercheur libre à l'Institut d'Embryologie cellulaire et moléculaire du CNRS et du Collège de France, a reçu le Prix Lacassagne pour l'année 1994.

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

1993

CAMERON-CURRY P., DULAC C. and LE DOUARIN N.M. (1993). Negative regulation of Schwann cell myelin protein gene expression by the dorsal root-ganglionic microenvironment. *Eur. J. Neurosci.*, 5, 594-604.

CONRAD G.W., BEE J.A., ROCHE S.M. and TEILLET M.-A. (1993). Fabrication of microscalpels by electrolysis of tungsten wire in a meniscus. *J. Neurosci. Meth.*, 50, 123-127.

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.

DIETERLEN-LIÈVRE F. and LE DOUARIN N.M. (1993). The use of avian chimeras in developmental biology. In « Manipulation of the avian Genome », edited by Robert Etches and Ann M. Verrinder Gibbins, CRC Press, chap. 7, 103-119.

DULAC C. (1993). Le développement embryonnaire du système mélanocytaire et sa pathologie. *Médecine/Sciences*, 9, 417-424.

DUPIN E. and LE DOUARIN N.M. (1993). Culture of avian neural crest cells. In « Essential Developmental biology : a practical approach ». Eds : Claudio D. Stern and Peter W.H. Holland, Oxford University Press. 153-166.

DUPIN E., MAUS M. and FAUQUET M. (1993). Regulation of the quail tyrosine hydroxylase gene in neural crest cells by cAMP and β -adrenergic ligands. *Dev. Biol.*, 159, 75-86.

DUPIN E., SEXTIER-SAINTE-CLAIRE DEVILLE F., NATAF V. and LE DOUARIN N.M. (1993). The ontogeny of the neural crest. *C.R. Acad. Sci.*, 316, 1072-1081.

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. Dev.*, 42, 33-48.

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.

HALLONET M.E.R. and LE DOUARIN N.M. (1993). Tracing neuroepithelial cells of the mes- and metencephalic alar plates during cerebellar ontogeny in quail-chick chimeras. *Eur. J. Neurosci.*, 5, 1145-1155.

LE DOUARIN N.M. (1993). From the neural crest to the ganglia of the autonomic nervous system. *J. Autonomic Nerv. System*, vol. 43 suppl., 25-26.

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

LE DOUARIN N.M. (1993). Introduction In « Essential Developmental biology : a practical approach ». Eds : Claudio D. Stern and Peter W.H. Holland, Oxford University Press.

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.

LE DOUARIN N.M. and ZILLER C. (1993). Plasticity in neural crest cell differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5, 1036-1043.

LE DOUARIN N.M., ZILLER C. and COULY G.F. (1993). Patterning of neural crest derivatives in the avian embryo : *in vivo* and *in vitro* studies. *Dev. Biol.*, 159, 24-49.

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., 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., USA*, 90, 5242-5246.

ROTHMAN T.P., LE DOUARIN N.M., FONTAINE-PÉRUS J.C. and GERSHON M.D. (1993). Colonization of the bowel by neural crest-derived cells remigra-

ting from foregut backtransplanted to vagal or sacral regions of host embryos. *Dev. Dyn.*, 196, 217-233.

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

TEILLET M.-A., GUY N.T.M., SCHULER B., LE GAL LASSALE G., BATINI C., LE DOUARIN N.M. and NAQUET R. (1993). Transfer of a genetic form of epilepsy in the chicken by embryonic brain grafts. *C.R. Acad. Sci.*, 316, 1164-1169.

TEILLET M.-A., GUY N.T.M., SCHULER B., LE GAL LA SALLE G., BATINI C., LE DOUARIN N.M. et NAQUET R. (1993). Transfert d'une épilepsie photosensible d'origine génétique par greffes sélectives de vésicules cérébrales chez l'embryo de Poulet. *C.R. Soc. Biol.*, 187, 384-389.

XUE Z.-G., XUE X.J. and LE DOUARIN N.M. (1993). Quox-1, an Antp-like homeobox gene of the avian embryo : a developmental study using a Quox-1 specific antiserum. *Mech. Dev.*, 43, 149-158.

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.

1994

COULY G., COLTEY P., CHÉRON G., ABADIE V., MARTELLI H. et LE DOUARIN N.M. (1994). Rhombomères, code Hox, crête neurale et malformation de la face. *Médecine/Sciences*, 10, 151-162.

LE DOUARIN N.M., HALLONET M. and POURQUIÉ O. (1994). Cell migration and establishment of neuronal connections in the developing brain : a study using the quail-chick chimera system. *Prog. Brain Res.*, special issue, 100, 3-18.

MARCELLE C., EICHMANN A., HALEVY O., BRÉANT C. and LE DOUARIN N.M. (1994). A fifth member of the fibroblast growth factor receptor family cloned in birds : its expression pattern through gastrulation and in differentiating myotome-derived muscles. *Development*, 120, 683-694.

SEXTIER-SAINTE-CLAIRE DEVILLE F., ZILLER C. and LE DOUARIN N.M. (1994). Developmental potentials of enteric neural crest-derived cells in clonal and mass cultures. *Dev. Biol.*, 163, 141-151.

ZILLER C., MIRABEL A.M., VANDENBUNDER B. and FAUQUET M. (1994). The tyroxine hydroxylase gene is expressed in endoderm and pancreas of early quail embryos. *Anat. Embryol.*, 189, 307-315.

Sous presse ou Soumis

CHEDOTAL A., POURQUIÉ O. and SOTELO C. Initial tract formation in the brain of the chick embryo : selective expression of BEN/SC1/DM-GRASP cell adhesion molecule. *Eur. J. Neurosci.* (soumis).

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. *Differentiation* (sous presse).

LECOIN L., MERCIER P., and LE DOUARIN N.M. Growth of neural crest cells in vitro is enhanced by extracts from Silky Fowl embryonic tissues. *Pigment Cell Res.* (sous presse).

LE DOUARIN N.M. The Neural Crest (an overview). In Gray's Anatomy (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 » (contribution au livre de Ann Andrew).

LE DOUARIN N.M., DUPIN E. and ZILLER C. Genetic and epigenetic control in neural crest development. *Curr. Op. Gen. Dev.* (soumis).

MONSORO-BURQ A.-H., BONToux M., TEILLET M.-A. and LE DOUARIN N.M. Heterogeneity in the development of the vertebra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (sous presse).

Développement du système immunitaire

1993

CORBEL C., POURQUIÉ O., CORMIER F. and BLUESTEIN H.G. (1993). BEN, a surface glycoprotein of the immunoglobulin superfamily on avian hemopoietic progenitor cells and activated T lymphocytes shared with neural cells. In « Avian Immunology in Progress », Tours (France) August 31st - September 2nd. Ed. INRA, Paris , 293-299.

COUTINHO A., SALAÜN J., CORBEL C., BANDEIRA A. and LE DOUARIN N.M. (1993). The role of thymic epithelium in the establishment of transplantation tolerance. *Immunol. Rev.*, n° 133, 225-240.

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 », edited by Robert Etches and Ann M. Verrinder Gibbins, CRC Press, chap.7, 103-119.

DIETERLEN-LIÈVRE F. and LE DOUARIN N.M. (1993). Developmental rules in the hemopoietic and immune systems of birds : how general are they ? *Sem. Dev. Biol.*, 4, 325-332.

DIETERLEN-LIÈVRE F. and SALAÜN J. (1993). Development of the immune system. In « Methods of immunological analysis », edited by R.F. Masseyeff, W.H. Albert and N.A. Staines », (vol. III : Cells and Tissues), 418-431. VCH

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. Dev.*, 42, 33-48.

FEDECKA-BRUNER B., MARTIN C., LEHMANN A. and VAIGOT P. (1993). Immune reaction occurring against thymic grafts in embryos ? In « Avian Immunology in Progress », Tours (France) August 31st - September 2nd. Ed. INRA, Paris, 307-310.

LACOSTE-ELEAUME A.S., QUÉRÉ P., BLEUX C., CORBEL C., COUDERT F. and KANELLOPOULOS-LANGEVIN C. (1993). Detection and partial characterization of two new markers on the surface of chicken thrombocytes. In « Avian Immunology in Progress », Tours (France) August 31st - September 2nd. Ed. INRA, Paris, 43-48.

LE DOUARIN N.M. (1993). Rôle du thymus dans la reconnaissance du soi et du non-soi. Entretiens Science et Défense 93. Biotechnologies dans les Sciences de la Vie. Dunod, 307-320.

MARTIN C., BELO M., LE DOUARIN N.M. and CORBEL C. (1994). A study of peripheral tolerance through embryonic grafts of the bursal epithelial rudiment between MHC-distinct chick embryos. *Int. Immunol.*, 6, n° 6, 795-804.

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.

THOMAS J.-L., POURQUIÉ O., COLTEY M., VAIGOT P. and LE DOUARIN N.M. (1993). Expression of GRL1 and GRL2 antigens in chicken hematopoie-

tic cells. In « Avian Immunology in Progress », Tours (France) August 31st - September 2nd. Ed. INRA, Paris, 85-90.

1994

HLOZANEK I., CORBEL C. and DIETERLEN-LIÈVRE F. (1994). The major histocompatibility complex of chickens controls the infection of early chicken embryos with MC29 virus. *Virology*, 203, 29-35.

LACOSTE-ELEAUME A.-S., BLEUX C., QUÉRÉ P., COUDERT F., CORBEL C. and KANELLOPOULOS-LANGEVIN C. (1994). Biochemical and functional characterization of an avian homolog of the integrin GPIIb-IIIa present on chicken thrombocytes. *Exp. Cell Res.*, 213, 198-209.

Sous presse ou Soumis

CORBEL C., LACOSTE-ELEAUME A.-S., BLEUX C., QUÉRÉ P., COUDERT F., and KANELLOPOULOS-LANGEVIN C. Platelet integrin GPIIb-IIIa homolog identified on chicken thrombocytes. *Vet. Immunol. Immunopath.* (sous presse).

THOMAS J.-L., STEIBER A. and GONATAS N. GRL1 and GRL2 : two membrane proteins of secretory granules in chicken cells with regulated secretory function. *J. Cell Sci.* (sous presse).

THOMAS-VASLIN V., SALAÜN J., GAJDOS B., LE DOUARIN N.M., COUTINHO A. and BANDEIRA A. Thymic epithelium induces tolerance to skin and heart but not to B lymphocytes grafts (soumis).

Différenciation sexuelle des gonades

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

JOST A. and MAGRE S. (1993). Sexual differentiation. In : « Reproduction in Mammals and Man », Ellipses, Paris, pp. 197-212.

En préparation

FRIDMACHER V., GUILLOU F., LEBERT M. and MAGRE S. Switch in the CK18/CK19 gene expression as a very early evidence of testicular differentiation in the rat (en préparation).

Cellules germinales

1992

DUBOIS R. et CUMINGE D. (1992). L'origine embryologique de la lignée germinale des Oiseaux : étude expérimentale chez le Poulet. *Eur. Arch. Biol.*, 103, 195-209.