

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 trois leçons (6 heures) faites au Collège de France, a porté sur le « *Contrôle génétique du développement du système axial et, en particulier, du système nerveux chez les Vertébrés* ».

La seconde partie du cours (4 heures) a été délivrée à l'Université de Milan à la suite d'un accord passé entre le Collège de France et cette institution. Le titre en était : « *Développement du système nerveux* » dont deux conférences intitulées « *Migrations cellulaires pendant le développement neural* » et « *Influences de l'environnement sur la différenciation neuronale et gliale* ».

CONTRÔLE GÉNÉTIQUE DU DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME AXIAL ET, EN PARTICULIER, DU SYSTÈME NERVEUX CHEZ LES VERTÉBRÉS

L'organisation du corps à partir de la cellule œuf commence par la mise en place des deux axes de polarité antéropostérieure (AP) et dorsoventrale (DV). Les travaux réalisés sur la *Drosophile* ont mis en lumière la cascade des gènes qui interviennent dans cet événement essentiel du développement embryonnaire. Un modèle rendant compte des interactions moléculaires qui conduisent à la polarisation de l'œuf de *Drosophile* est ainsi proposé (voir revue de Johnston et Nüsslein-Volhard in *Cell*, 68, p. 201-208, 1992) dans lequel sont mis en évidence une série de gènes codant pour des facteurs de transcription ou pour des récepteurs cellulaires et leurs ligands c'est-à-dire pour des molécules responsables de la transmission de signaux intercellulaires.

Les recherches réalisées au cours de ces dernières années ont révélé que les homologues de la plupart des gènes intervenant dans le développement chez la

Drosophila existent aussi chez les Vertébrés où ils remplissent des fonctions, sinon similaires, du moins du même ordre. Il est ainsi apparu que les mécanismes du développement des organismes métazoaires ont été très largement conservés au cours de l'évolution. Ainsi, bien que la transformation de l'œuf en un organisme pluricellulaire organisé s'effectue selon des programmes et des modalités apparemment très divers, les molécules qui contrôlent les processus fondamentaux du développement sont les mêmes dans les diverses espèces étudiées. Quelques exemples le montrent bien : la différenciation de l'œil de *Drosophila*, l'induction de la vulve chez *Cænorhabditis elegans* et celle du mésoderme par le FGF (Fibroblast Growth Factor) chez le Xénope impliquent un récepteur membranaire à activité tyrosine-kinase dont l'activation par un ligand spécifique génère des signaux intracellulaires qui font intervenir l'oncogène *ras*. De même, des récepteurs à activité sérine-thréonine-kinase jouent un rôle crucial dans l'induction du mésoderme chez les Vertébrés, le développement de la larve de *C. elegans* et la mise en place de l'axe DV de l'embryon de *Drosophila*.

Des progrès importants ont été réalisés au cours des dix dernières années marquées par la découverte en 1985 des gènes à homeobox chez la *Drosophila* (par les laboratoires de Walter Gehring et de Mathew Scott) et par la démonstration qu'ils jouent un rôle dans le contrôle du développement embryonnaire. Le ver *Cænorhabditis elegans* a permis de mettre en évidence plusieurs systèmes de régulation génique qu'on a pu ensuite généraliser à d'autres organismes.

Ces modèles expérimentaux appartenant au monde des Invertébrés ont l'avantage de se prêter à l'analyse génétique qu'il est plus difficile de mettre en œuvre chez les Vertébrés. De nombreux gènes importants contrôlant le développement chez les Vertébrés ont été isolés, par analogie, à l'aide de sondes nucléiques de *Drosophila*. Cette approche a été extrêmement féconde mais n'est pas seule à être responsable des progrès actuels. Ainsi plusieurs gènes du développement tels que ceux qui codent pour les membres de la famille *Wnt* avaient été auparavant identifiés comme des *oncogènes*. D'autres, comme les membres de la famille des TGF β (Transforming Growth Factor) et des FGF, ont été identifiés grâce à leur action sur des cellules de mammifères cultivées *in vitro*.

A cause de l'importance des résultats obtenus chez la *Drosophila*, le premier cours a été consacré aux modèles proposés pour rendre compte de la mise en place de la polarité AP et DV dans cette espèce.

La mise en place des axes de polarité dans l'embryon de Drosophila

Un principe important a émergé des recherches réalisées dans ce domaine : les axes AP et DV sont établis indépendamment l'un de l'autre et chacun des gènes impliqués agit sur une partie déterminée de l'embryon de sorte que les mutations affectant ces gènes n'affectent en général que ces territoires.

Il n'y a pas d'organisation métamérique préformée dans l'ovocyte au moment de la fécondation, mais au cours de l'ovogenèse des déterminants morphogéné-

tiques maternels sont déposés aux deux pôles de l'œuf. Ainsi quatre systèmes de signaux d'origine maternelle définissent le plan d'organisation et les axes de polarité AP et DV de l'embryon. Les gènes maternels qui sont à l'origine de ces signaux sont au nombre de 30 et sont actifs dans les « *cellules nourricières* » haploïdes du follicule ovarien. Le nombre de phénotypes mutants observés et qui ont permis de les découvrir, est inférieur au nombre de gènes ; ceci signifie que plusieurs gènes concourent à la genèse d'un phénotype mais à des étapes différentes d'une cascade de réactions. Les produits des gènes maternels agissent sur des gènes zygotiques situés en aval de cette cascade de réactions.

La spécification de l'axe AP nécessite l'intervention de 3 classes de gènes maternels : **les gènes antérieurs** dont la mutation entraîne l'absence ou la réduction de la tête et du thorax, **les gènes postérieurs** dont la perte de fonction a pour effet des délétions de l'abdomen et **les gènes terminaux** nécessaires à la formation des deux extrémités terminales de l'embryon.

Chacun de ces groupes de gènes maternels a fait l'objet d'une étude particulière.

Le système dorso-ventral est le plus complexe des 4 systèmes maternels car il fait intervenir un grand nombre de gènes.

Les cellules folliculaires diploïdes de l'ovariole qui entourent l'ovocyte produisent un signal localisé ventralement dont le récepteur (qui est le produit du gène *Toll*) se trouve distribué uniformément sur toute la surface de l'embryon. L'activation de ce récepteur déclenche un signal intracellulaire qui contrôle l'expression spatiale de gènes zygotiques.

La protéine Toll comprend un domaine extracellulaire caractérisé par deux blocs riches en leucine et des domaines riches en cystéines, semblables à ceux qu'on trouve dans d'autres récepteurs tels que les chaînes a et b de la glycoprotéine Ib portée par les plaquettes humaines (récepteur du facteur de von Willebrand et de la thrombine). La partie intracellulaire de la protéine Toll comprend une séquence de 217 AA qui partage 26 % d'identité avec le récepteur de l'interleukine 1.

La perte de fonction du gène *Toll* produit des phénotypes « *dorsalisés* », c'est-à-dire des embryons dépourvus de face ventrale. Le gain de fonction de ce gène entraîne la formation d'embryons « *ventralisés* » (sans face dorsale). Les gènes responsables de la production du ligand de *Toll* ne sont activés que ventralement. Il s'agit de *Pipe*, *Nudel*, *Windbeutel*, *Snake*, *Easter*. En aval du récepteur Toll les gènes *Tube*, *Pelle* et *Dorsal* (*dl*) sont responsables de la transduction du signal déclenché par la liaison de la protéine Toll et de son ligand. Ainsi, le produit du gène *dl* agit à la fin de la cascade qui prend naissance lors de l'activation du récepteur codé par *Toll*.

Le signal ventral émis par la protéine Toll contrôle la répartition du produit du gène *dl* dans les noyaux de l'embryon. L'ARNm du gène *dl* et sa protéine sont

synthétisés pendant l'ovogenèse et initialement distribués d'une manière uniforme dans le cytoplasme de l'œuf. Lorsque les noyaux issus de la division du zygote se répartissent autour de l'œuf (stade syncitial), la concentration de la protéine dl devient plus grande ventralement dans les noyaux et disparaît dans le cytoplasme, alors que latéralement la protéine dl est distribuée également dans le cytoplasme et les noyaux. Dorsalement elle est exclusivement dans le cytoplasme et absente dans les noyaux.

La mutation des gènes qui régulent la localisation nucléaire de la protéine dl permettent de modifier cette distribution normale. Il en résulte des phénotypes cuticulaires qui sont corrélés avec la localisation du produit du gène *dl* selon l'axe DV.

Les gènes situés en aval de *dl* sont *Zen* et *decapentaplegique (dpp)*. Le gène *dpp* code pour un facteur de la famille des TGF β dont l'homologue chez les Vertébrés est la protéine BMP-4.

Ainsi, les deux systèmes « *terminaux* » et DV sont caractérisés par la mise en œuvre d'un processus inducteur dans lequel les cellules folliculaires fournissent un signal produit pendant l'ovogenèse d'une manière polarisée. Ensuite, les cellules folliculaires dégénèrent, l'œuf est fécondé et les cellules de l'embryon acquièrent la capacité de répondre au signal en produisant un récepteur distribué sur la totalité de l'embryon.

Le cas du gène *dl* est intéressant en ce que la quantité de la protéine dl qui se localise dans les noyaux le long de l'axe DV évoque des réponses différentes en fonction de sa concentration. On peut ainsi définir en fonction de la concentration nucléaire de dl 5 valeurs positionnelles responsables d'autant de phénotypes différents.

La détermination des axes de polarité chez les Vertébrés

Chez les Vertébrés, le modèle expérimental qui s'est révélé le plus fécond pour l'étude de la détermination des axes de polarité et la mise en place des feuilletts embryonnaires est l'embryon d'Amphibien et en particulier du Xénope.

Comme c'est le cas chez la Drosophile, la détermination de l'axe AP a lieu pendant l'ovogenèse. Ainsi la distribution asymétrique du matériel ovocytaire dans la moitié animale et végétative de l'œuf d'Amphibien a fait l'objet d'une analyse détaillée car elle est à l'origine de la détermination de l'axe AP.

La découverte récente d'ARNm à localisation corticale dans la moitié végétative de l'œuf a fait l'objet d'une attention particulière. Il en est ainsi de Vg1 découvert par D. Melton, qui code pour un membre de la famille des TGF β et dont le rôle dans l'induction du mésoderme paraît déterminant. Les ARNm de XCat₂ découverts par Mosquera et al. en 1993, sont également remarquables car ils codent pour un facteur de transcription « à doigt de Zn » proche du gène

Nanos déterminant le développement de la partie abdominale (postérieure) de la *Drosophile*.

Le plan de symétrie bilatérale de l'embryon est établi lorsque le spermatozoïde pénètre dans l'œuf. Les phénomènes de rétraction et de rotation du cytoplasme cortical ainsi que les mécanismes qui les sous-tendent ont été décrits et analysés.

Les conceptions du phénomène d'induction neurale et d'induction mésodermique telles qu'elles se sont succédées depuis les travaux des embryologistes du début du siècle ont été rappelées car elles ont grandement influencé la démarche suivie par les chercheurs dans la période moderne.

Après que Spemann et Mangold (1924) aient découvert l'induction neurale qu'ils considéraient comme la première étape importante du développement embryonnaire (d'où le terme d'*induction primaire* qui a aussi été utilisé pour désigner ce phénomène), le point de départ des conceptions modernes est à rechercher dans les travaux de Nieuwkoop. En 1969 ce dernier mettait en évidence que le *centre organisateur* défini par Spemann comme étant le point de départ de l'induction neurale est lui-même le résultat d'une induction provenant des cellules endodermiques. Les cellules endodermiques situées sur la face dorsale de l'œuf induisent le mésoderme dorsal à acquérir les propriétés du centre organisateur. Elles ont été pour cette raison appelées « Centre de Nieuwkoop ».

L'ère nouvelle se caractérise par la recherche des molécules responsables de l'induction mésodermique.

Le FGFb a été la première molécule dont le rôle dans l'induction mésodermique a été démontré. Il n'a cependant compétence qu'à induire les structures mésodermiques les plus ventrales telles que le sang et le mésothélium mais, bien que présent dans l'œuf, (il s'agit du FGF₄ encore appelé FGFe et non du bFGF ou FGF₂) au stade blastula, il ne peut rendre compte de la formation des structures mésodermiques dorsales et des propriétés dorsalisantes du centre organisateur. Les expériences de Kirschner basées sur l'utilisation d'une forme inactive dominante du récepteur au FGF dont on induit la synthèse dans l'œuf en y injectant l'ARNm tronqué de sa partie cytoplasmique, confirment le rôle du FGF dans le développement de l'embryon. En effet, l'inhibition de l'action du FGF par le récepteur dominant négatif provoque des tronctions postérieures de l'embryon. Ainsi le FGFe paraît être un inducteur des structures ventrales et postérieures.

L'existence dans l'œuf d'autres facteurs appartenant à la famille des TGFβ a été démontrée par D. Melton qui a découvert le facteur Vg1 en 1987. Les travaux récents poursuivis par cet auteur suggèrent que Vg1 est le véritable inducteur du mésoderme dorsal, c'est-à-dire du « Centre de Nieuwkoop » qui lui-même est responsable de l'induction du centre organisateur de Spemann.

Ainsi, l'injection ectopique d'ARNm de *Vgl* dans des blastomères à destinée mésodermique ou même ectodermique permet de les transformer en cellules endodermiques qui elles-mêmes deviennent inductrices de structures mésodermiques dorsales et d'un axe embryonnaire secondaire.

L'activine, proposée par J. Smith pour jouer ce rôle ne remplit pas aussi bien que *Vgl* les conditions requises. Ainsi, l'ARNm d'activine n'est pas présent dans l'œuf au stade de l'induction mésodermique et dans les divers paradigmes expérimentaux utilisés, elle ne se montre capable d'induire que des structures embryonnaires incomplètes.

L'importance des membres de la famille des TGF β dans l'induction embryonnaire m'a amenée à traiter avec quelque détail de ces protéines et de leurs récepteurs. Il s'agit de protéines dont on connaît plus de vingt formes différentes et qui sont actives sous forme de dimères liés par des ponts disulfures. Chaque sous-unité de 110 à 140 AA correspond à la partie C-terminale de précurseurs plus grands. Après dimérisation, les précurseurs sont clivés par une peptidase et les domaines actifs sont ainsi libérés. D. Melton a montré que ce processus de clivage s'effectue dans l'œuf d'une manière limitée dans le temps et l'espace et paraît être responsable de la libération du principe actif exclusivement dans la zone endodermique dorsale où se produit l'induction du centre de Nieuwkoop.

Parmi les membres de la famille des TGF β qui jouent un rôle important dans l'induction de l'axe DV et AP des Amphibiens se trouvent des facteurs de croissance découverts par Marshall Urist en 1965 pour leur rôle dans l'induction de cartilage et d'os à partir du tissu conjonctif chez les Mammifères. Ils ont été désignés pour cette raison « Bone morphogenetic proteins » (BMP). Les BMP sont proches de la protéine codée par le gène *decapentaplégique* de *Drosophile* (*dpp*) mentionné plus haut. Il en existe plusieurs formes chez les Vertébrés et les premiers gènes clonés ont été ceux du BMP2 et du BMP4 humain en 1988.

BMP2, 4 et 7 ont été identifiées chez le Xénope et la première indication qu'elles ont un rôle d'inducteur végétalisant (ou ventralisant) revient à Koster en 1991. Brigid Hogan a montré en 1992 que le BMP4 humain a une activité inductrice sur l'œuf de Xénope identique à celle de la molécule endogène explorée indépendamment par J. Smith. Celle-ci se caractérise par son effet ventralisant qui domine l'activité antériorisante-dorsale de l'activine dans tous les systèmes expérimentaux utilisés (test de la cape apicale, « Einsteck method »). De plus, l'injection d'ARNm de BMP4 dans les blastomères dorsaux au stade de 32 cellules a pour effet d'inhiber les structures antérieures. L'expérience la plus spectaculaire a consisté à utiliser des récepteurs dominant-négatifs de BMP4. Ceux-ci, injectés dans les blastomères ventraux au stade 4 cellules, provoquent une duplication de l'axe embryonnaire (sans structures antérieures : œil, glande cémentaire) révélant ainsi la présence dans la zone marginale ventrale de potentialités organisatrices normalement inhibées par le BMP4 endogène.

De plus, l'injection de l'ARNm du récepteur tronqué par BMP4 à des embryons ventralisés par une irradiation aux rayons ultraviolets provoque la formation d'un axe embryonnaire secondaire. On peut en déduire que l'inactivation du BMP4 endogène par l'intermédiaire du récepteur inactif révèle des potentialités dorsales dans le mésoderme ventral de l'embryon.

Par conséquent, un fait nouveau apparaît dans les mécanismes qui sous-tendent l'établissement de l'axe DV de l'embryon : un signal actif est nécessaire pour que les structures ventrales se différencient. Le mésoderme de toute la zone marginale est capable de fournir des structures dorsales mais le BMP4 domine cette capacité en lui substituant celle de former des structures ventrales. Celles-ci résultent donc d'un phénomène d'induction actif et ne constituent pas une voie de différenciation s'établissant par *défaut* d'induction dorsalisante.

Contrairement à la conception précédemment admise (voir notamment J. Slack et J. Smith) l'état basal du mésoderme ne résulte pas dans la formation de structures ventrales et pour expliquer la différenciation du mésoderme dorsal on doit invoquer ou l'absence de BMP dans la partie dorsale de l'œuf ou la présence d'un signal capable de dominer l'effet du BMP.

Les gènes de la famille Wnt et l'induction du mésoderme

D'autres facteurs ont été découverts qui agissent aussi sur la différenciation du mésoderme et la mise en place des grandes lignes du plan d'organisation de l'embryon. Il s'agit de facteurs sécrétés produits par des gènes de la famille *Wnt* à laquelle appartient le gène de polarité segmentaire de *Drosophile* *Wingless*.

Le premier membre découvert de la famille *Wnt* a été le proto-oncogène *int1* qui, chez la souris, est apparu comme un oncogène activé par l'insertion d'un provirus dans les tumeurs mammaires (Nusse et Warmus, 1982). L'expression inappropriée de ce gène induit un phénotype transformé dans les cellules de l'épithélium mammaire comme on l'a montré en culture de tissu et chez des souris transgéniques.

Pendant les dix dernières années des preuves se sont accumulées qui ont impliqué les proto-oncogènes dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

Les produits des proto-oncogènes se classent en quatre catégories : • facteurs de croissance sécrétés ; • récepteurs membranaires pour ces facteurs ; • constituants cytoplasmiques des voies métaboliques qui conduisent de ces récepteurs au noyau cellulaire et qui permettent d'interpréter les signaux déclenchés par l'activation des récepteurs ; • facteurs nucléaires qui exécutent les commandes transmises par les signaux intracellulaires par le moyen de la régulation transcriptionnelle des gènes.

Il apparaît de plus en plus clairement que les gènes importants dans la carcinogenèse sont aussi des régulateurs de l'embryogenèse. Ils interviennent dans la

mise en place du plan du corps et des organes et aussi dans la ségrégation des lignages cellulaires.

Les relations étroites entre oncogenèse et développement sont particulièrement bien illustrées dans le cas de la famille des gènes *Wnt*.

Après la découverte de *int1* chez la souris (1982), on identifie en 1987 chez la *Drosophile* un gène de la même famille appelé *wingless* qui contrôle la segmentation. On voit aussi que *int1* est exprimé transitoirement chez le Xénope, la souris et le poulet pendant la neurulation. Chez la souris, *int1* est exprimé dans la moelle épinière et cerveau et la mutation ciblée de ce gène provoque l'absence de cervelet. La première indication qu'*int1* joue un rôle dans les phases précoces de l'embryogenèse chez le Xénope provient des expériences de McMahon et Moon (1989). Ces auteurs ont injecté dans l'œuf fécondé de l'ARNm synthétique de *int1* et ont obtenu des duplications de l'axe embryonnaire. Depuis, la dénomination du gène a changé pour *Wnt1* et plusieurs autres membres de la même famille ont été clonés et identifiés chez les Mammifères et chez le Xénope. Par PCR, plus de dix séquences ont été obtenues dans de nombreuses espèces de vertébrés et d'invertébrés et toutes les formes de la famille *Wnt* ne sont sûrement pas encore isolées. Ils codent pour une protéine sécrétée qui possède un ou plusieurs sites de N-glycosylation ; 23 à 24 cystéines dans des positions parallèles qui sont conservées dans tous les membres connus jusqu'ici.

Les ARNm des gènes *XWnt1* et *XWnt8* de Xénope injectés dans un blastomère de la zone marginale ventrale produisent une duplication de l'axe embryonnaire. Ils n'ont pas d'effet s'ils sont injectés dans la zone dorsale (centre de Nieuwkoop).

Pendant ni *XWnt1* ni *XWnt8* ne sont exprimés dans l'embryon au stade où a lieu l'induction. *XWnt1* apparaît au stade neurula et *XWnt8*, bien que présent au stade midblastula, se trouve sur la face ventrale de l'œuf où il ne se forme pas de structures axiales dorsales. En fait ces protéines étant sécrétées, on peut supposer que le produit d'un autre membre de la famille capable de se lier au même ligand que *XWnt1* et *XWnt8*, mais non encore identifié, est probablement présent dans le centre de Nieuwkoop où le récepteur se trouve également. Le gène *Wnt11* identifié récemment par Douglas Melton remplit les conditions pour produire l'effet physiologique mimé par *Wnt1* et *Wnt8*. Il aurait un rôle dorsalisant et antériorisant venant s'ajouter à celui d'autres facteurs tels que *Noggin*.

Les gènes du centre organisateur de Spemann

Ces gènes sont en principe exprimés dans la lèvre dorsale du blastopore, c'est-à-dire dans les cellules destinées à fournir le mésoderme dorsal et la notocorde de l'embryon. On s'attend à ce qu'ils fournissent des transcrits zygotiques, induits dans la cape animale par les inducteurs mésodermiques (*vg1*, activine ou les gènes *Wnt*) et qu'ils soient des gènes régulateurs.

Le gène *Gooseoid* découvert par E. De Robertis et le gène *Xlim-1* identifié par Igor Dawid remplissent ces conditions. Ils constituent l'un et l'autre des gènes de la réponse primaire à l'induction mésodermique. Injectés dans l'œuf les ARNm correspondants induisent un axe secondaire. Ils pourraient donc agir en coordination dans le centre organisateur de Spemann.

L'induction neurale

Le fait que l'induction neurale est le résultat de la transmission d'un signal inducteur du mésoderme vers l'ectoderme au moment de la gastrulation a été bien établi par H. Spemann et ses collaborateurs. Spemann lui-même proposait deux voies de transmission pour ce signal : verticalement du mésoderme sous-jacent à l'ectoderme superficiel ou horizontalement dans le plan de l'ectoderme lorsque celui-ci est en continuité avec le mésoderme au niveau de la lèvre ventrale du blastopore (induction planaire). Les travaux de Holtfreter en 1933 montraient que, dans les exogastrulas, l'ectoderme n'est jamais neuralisé. Or, il n'entre pas en contact avec le mésoderme puisque l'invagination mésodermique n'a pas lieu. L'idée que l'induction neurale est exclusivement transmise verticalement s'est alors imposée. Les expériences de Nieuwkoop en 1952 et d'Eyal Giladi en 1954 ont fait cependant resurgir la notion que l'induction neurale peut aussi se transmettre dans le plan du neuroépithélium. Selon Nieuwkoop, un premier effet neuralisant assure le développement de phénotypes antérieurs (cerveau) alors qu'un second signal « planaire » est nécessaire pour la formation des structures postérieures.

Cette notion a été confirmée par des auteurs modernes tels que T. Doniach et A. Ruiz i Altaba qui ont utilisé des marqueurs moléculaires pour identifier des tissus nerveux formés le long de l'axe AP dans diverses conditions expérimentales.

La nature de l'inducteur neural

• *Noggin*

William Smith et Richard Harland ont publié en 1992 puis en 1994 la découverte d'une molécule sécrétée, n'appartenant à aucune famille connue de facteurs de croissance ou de différenciation, qu'ils ont appelée *Noggin*. Il s'agit d'un nouveau polypeptide de 222AA dont l'ARNm est présent dans l'œuf puis chez la gastrula dans la lèvre dorsale du blastopore et enfin dans le mésoderme pré-cordal et la notocorde. *Noggin* se présente, dans tous les tests expérimentaux utilisés, comme un inducteur neural du système nerveux antérieur.

• *Activine/Follistatine et induction neurale*

Une autre voie conduisant à l'induction neurale a été révélée par les travaux de Douglas Melton. Ce dernier fit la surprenante observation que l'injection dans

un œuf fécondé de Xénope de l'ARNm du récepteur inactif dominant de l'activine a un effet neuralisant sur le développement ultérieur de la cape apicale isolée.

Tout se passe donc comme si l'activine agissait comme un inhibiteur de la différenciation neurale de l'ectoderme. Celle-ci résulterait donc d'une tendance spontanée de l'ectoderme, dite « différenciation par défaut ». L'activine, dont l'ARNm et la protéine sont largement répandus dans les cellules ectodermiques au stade gastrula, aurait pour rôle d'inhiber cette différenciation spontanée. Pour que du tissu nerveux se développe, il faut donc inhiber localement l'effet de l'activine. D. Melton met en évidence un ligand de l'activine capable de bloquer son action, il s'agit de la follistatine (FS).

La follistatine est une protéine monomérique originellement isolée (en 1990) du fluide ovarien pour sa capacité de bloquer la production de FSH (Follicle stimulating hormone) par la glande pituitaire. En fait, cette action est due à la propriété de la follistatine de se lier à la chaîne b d'activine et de l'inactiver. Elle existe sous deux formes dans toutes les espèces, l'une possédant 344 et l'autre 317 AA. La forme la plus courte est la plus efficace dans l'inhibition de l'activine.

D. Melton et Hemmati-Brivanlou (1994) ont cloné le cDNA de la follistatine de Xénope par RT-PCR au stade gastrula. Le transcrit est présent dans l'ovocyte et ensuite localisé dans la région de l'organisateur de Spemann puis, chez le jeune embryon, dans le mésoderme précordal et les 2/3 antérieurs de la notocorde.

Les expériences classiques (culture de cape apicale, injection d'ARNm de follistatine dans l'œuf, etc...) ont confirmé le rôle d'inducteur neural de la follistatine ainsi que son mécanisme d'action.

En conclusion, l'induction neurale fait intervenir plusieurs voies moléculaires. Le rôle exact de chacune d'elle n'est pas encore élucidé et une certaine redondance de leurs effets n'est pas à exclure. Ainsi l'inactivation expérimentale du gène de follistatine chez la souris n'entraîne pas d'anomalies du développement du système nerveux.

COURS DÉLIVRÉ À L'UNIVERSITÉ DE MILAN

Dans le premier cours délivré à l'Université de Milan, l'importance des migrations cellulaires au cours de la neurogenèse a été souligné. Les méthodes d'étude (marquage cellulaire par un précurseur de l'ADN, la thymidine tritiée, par l'incorporation de rétrovirus porteurs du gène de la β -galactosidase, par la construction d'embryons chimères chez l'oiseau entre caille et poulet, par des

colorants vitaux tels que le DiI) permettant de suivre le devenir des cellules pendant des temps plus ou moins longs du développement ont été envisagées et leurs avantages respectifs décrits.

On a indiqué les périodes du développement du système nerveux au cours desquelles se produisent les migrations cellulaires. L'exemple de la genèse du cortex cérébelleux bien étudié dans le modèle aviaire par la méthode des chimères embryonnaires entre caille et poulet a été analysé.

Enfin, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les déplacements cellulaires observés ont été discutés.

Dans le deuxième cours, une analyse critique des travaux portant sur le rôle respectif de l'environnement et d'un déterminisme génétique préexistant sur la différenciation des types cellulaires constituant le système nerveux a été présentée.

N.L.D.

SÉMINAIRES

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

Le thème choisi a été le suivant : « *Aspects moléculaires et cellulaires de la Neurogenèse* ».

Les séminaires se sont déroulés pendant deux jours consécutifs, les 30 et 31 Mars 1995. La formule adoptée a obtenu un vif succès et les séminaires ont attiré un public nombreux et assidu de chercheurs et d'étudiants de Paris, de la région parisienne et même de province.

Les exposés ont porté plus précisément sur les sujets suivants :

D^r CHRISTINE DAMBLY-CHAUDIER, de l'Université de Montpellier II :
« L'origine de la diversité des organes sensoriels chez la drosophile ».

D^r ALAIN GHYSEN, de l'Université de Montpellier II :
« Contrôle de l'identité neuronale chez la drosophile ».

D^r PATRICIA SIMPSON, de l'Université de Strasbourg :
« Le rôle du récepteur Notch dans la communication intercellulaire et la ségrégation des précurseurs nerveux chez la drosophile ».

D^r ANGELA NIETO, de l'Institut Cajal de Madrid :
« Aspects moléculaires de la migration des cellules de la crête neurale chez l'embryon de poulet ».

D^r ELISABETH DUPIN, de l'Institut d'Embryologie cellulaire et moléculaire du Collège de France et du CNRS, Nogent-sur-Marne :

« La différenciation des cellules de la crête neurale étudiée *in vitro* ».

D^r CHAYA KALCHEIM, de la Hadassah Medical School de Jérusalem :

« Rôles multiples des neurotrophines et de leurs récepteurs dans le développement du tube neural et des cellules de la crête neurale ».

D^r CATHERINE DULAC, de l'Institut d'Embryologie cellulaire et moléculaire du Collège de France et du CNRS, Nogent-sur-Marne :

« Biologie moléculaire de l'odorat ».

D^r CHRISTIANE AYER, de l'Institut d'Embryologie cellulaire et moléculaire du Collège de France et du CNRS, Nogent-sur-Marne :

« Neurogenèse et différenciation olfactive ».

D^r LUIS PUELLES, de l'Université de Murcie :

« Le modèle prosométrie du développement du cerveau antérieur ».

P^r PETER GRUSS, du Max-Planck-Institute of Biophysical Chemistry de Göttingen, Allemagne :

« Le rôle des gènes Pax dans le développement du système nerveux ».

D^r PIETRO CALISSANO, de l'Institut de Neurobiologie de Rome :

« Différenciation terminale *in vitro* et mort programmée des cellules granulaires du cervelet : rôle du calcium et de facteurs épigénétiques ».

D^r PIERRE ROUGET, du Laboratoire de Biologie Moléculaire et de Différenciation du Collège de France :

« Identification du gène NPDC-1 qui intervient dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules neurales ».

P^r HERMONA SOREQ, de l'Université de Jérusalem :

« Etude de la neurogenèse *in vivo* et *ex vivo* : surexpression et inhibition de l'acétylcholinestérase par transgénèse ».

D^r MARIE-MADELEINE PORTIER, du Collège de France et du CNRS :

« Régulation de l'expression de la périphérine, protéine neuronale des filaments intermédiaires ».

D^r PHILIPPE DENOULET, du Collège de France et du CNRS :

« Polymorphisme de la tubuline neuronale et régulation de la liaison des MAP's ».

D^r OLAF PONGS, du Centre de Neurobiologie Moléculaire de Hambourg :

« Signalisation calcique et activité des canaux potassiques en relation avec l'activité synaptique ».

D^r YOHEVED BERWALD-NETTER, du Collège de France et du CNRS :

« Les isoformes des canaux sodiques voltage-sensibles des cellules neuronales et gliales : polymorphisme, spécificité cellulaire et développement ».

Le Pr Judah FOLKMAN, de l'Université de Harvard à Boston a donné une leçon dans le cadre d'une invitation sur une Chaire d'Etat sur le sujet suivant :

« The regulatory mechanisms of angiogenesis and their role in neoplastic and non-neoplastic diseases ».

Le Pr Edoardo BONCINELLI, Directeur du Laboratoire de Biologie Moléculaire du Développement de l'Institut San Raffaele à Milan, a donné deux leçons dans le cadre d'une invitation sur une Chaire d'Etat sur les sujets suivants :

« The *Hox* gene family » et « Homeobox genes in head development ».

RÉSUMÉ DE L'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE

NEUROEMBRYOLOGIE

NEUROEMBRYOLOGIE ET DÉVELOPPEMENT DES ORGANES AXIAUX

Les recherches que nous poursuivons dans ce domaine ont été exposées en détail dans le compte-rendu d'activité de l'année 1993-1994. Ces travaux sont poursuivis actuellement et nous nous contenterons d'indiquer la liste des publications parues ou à paraître des années 1994 et 1995.

LISTE DES PUBLICATIONS

1994

LAHAV R., LECOIN L., ZILLER C., NATAF V., CARNAHAN J.F., MARTIN F.H. and LE DOUARIN N.M. (1994). Effect of *steel* gene product on melanogenesis in avian neural crest cell cultures. *Differentiation*, 58, 133-139.

LE DOUARIN N.M., DUPIN E. and ZILLER C. (1994). Genetic and epigenetic control in neural crest development. *Curr. Op. Gen. Dev.*, 4, 685-695.

LECOIN L., MERCIER P. and LE DOUARIN N.M. (1994). Growth of neural crest cells *in vitro* is enhanced by extracts from Silky Fowl embryonic tissues. *Pigment Cell Res.*, 7, 210-216.

MONSORO-BURQ A.-H., BONTOUX M., TEILLET M.-A. and LE DOUARIN N.M. (1994). Heterogeneity in the development of the vertebra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10435-10439.

ZILLER C. (1994). Differentiation of the neural crest. In « Developmental Endocrinology », P.C. Sizonenko, M.L. Aubert and J.-D. Vassalli eds, Ares-Sero-no Symposia Publications, Rome, pp. 161-168.

1995

CATALA M., TEILLET M.-A. and LE DOUARIN N.M. (1995). Organization and development of the tail bud analyzed with the quail-chick chimaera system. *Mech. Dev.* 51, 51-65.

CHÉDOTAL A., POURQUIÉ O. and SOTELO C. (1995). Initial tract formation in the brain of the chick embryo : selective expression of BEN/SC1/DM-GRASP cell adhesion molecule. *Eur. J. Neurosci.*, 7, 198-212.

COULY G., COLTEY P., EICHMANN A. and LE DOUARIN N.M. (1995). The angiogenic potentials of the cephalic mesoderm and the origin of brain and head blood vessels. *Mech. Dev.* 53, 97-112.

DUPIN E. and LE DOUARIN N.M. (1995). Retinoic acid promotes the differentiation of adrenergic cells and melanocytes in quail neural crest cultures. *Dev. Biol.* 168, 526-548.

FADLALLAH N., GUY N., TEILLET M.-A., SCHULER B., LE DOUARIN N.M., NAQUET R. AND BATINI C. (1995). Brain chimeras for the study of an avian model of genetic epilepsy : structures involved in sound and light-induced seizures. *Brain Res.* 675, 55-66.

GRAPIN-BOTTON A., BONNIN M.-A., MCNAUGHTON L., KRUMLAUF R. and LE DOUARIN N.M. (1995). Plasticity of transposed rhombomeres : Hox gene induction is correlated with phenotypic modifications. *Development* 121, 2707-2721.

LECOIN L., LAHAV R., MARTIN F.H., TEILLET M.-A. and LE DOUARIN N.M. (1995). *Steel* and *c-kit* in the development of avian melanocytes : a study of normally pigmented birds and the hyperpigmented mutant Silky Fowl. *Dev. Dyn.* 203, 106-118.

LE DOUARIN N.M. (1995). From the APUD to the neuroendocrine systems. A developmental perspective. Voir infra in « The Electrophysiology of Neuroendocrine cells » H. Scherübl and J. Hescheler eds. *CRC Press*, Boca Raton pp. 3-10.

MONSORO-BURQ A.-H., BONTOUX M., VINCENT C. and LE DOUARIN N.M. (1995). The developmental relationships of the neural tube and the notochord : short and long term effects of the notochord on the dorsal spinal chord. *Mech. Dev.* 53, 157-170.

NATAF V., MERCIER P., DE NÉCHAUD B., GUILLEMOT J.C., CAPDEVIELLE J., LAPOINTE F. and LE DOUARIN N.M. (1995). Melanoblast/cyte early marker (MeEM) is a glutathione S-transferase subunit. *Exp. Cell Res.* 218, 394-400.

POURQUIÉ O., COLTEY M., BRÉANT C. and LE DOUARIN N.M. (1995). Control of somite patterning by signals from the lateral plate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3219-3223.

TEILLET M.-A., GUY N., FADLALLAH N., LE GAL LA SALLE G., SCHULER B., BATINI C., LE DOUARIN N.M. and NAQUET R. (1995). Reflex epilepsy of the fowl and its transfer to normal chickens by brain embryonic grafts. *J. Neurobiol. Sci.* 16, 83-91.

Sous presse ou Soumis

CAMERON-CURRY P. and LE DOUARIN N.M. Oligodendrocyte precursors originate from both the dorsal and the ventral parts of the spinal cord. (soumis).

DULAC C. and CAMERON-CURRY P. Cell progenitors in the neural crest. In « Stem cell handbook », C.S. Potteau ed., Academic Press (sous presse).

EICHMANN A., COULY G. and LE DOUARIN N.M. The avian vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor as an early determination marker of the angioblastic lineage (soumis).

GUY N., TEILLET M.-A., LE GAL LA SALLE G., FADLALLAH N., LE DOUARIN N.M., NAQUET R. and BATINI C. Genetic epilepsy in chicken, new approaches and concepts. C.R. Congrès Strasbourg (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 » (sous presse).

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

DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

LA DISCRIMINATION DU SOI ET DU NON-SOI : PRINCIPAUX RÉSULTATS ET PERSPECTIVES

ÉTUDE DES MÉCANISMES DE SUPPRESSION INDUITE PAR L'ÉPITHÉLIUM THYMIQUE

J. SALAÜN, V. THOMAS-VASLIN, M. COLTEY, N.M., LE DOUARIN, en collaboration avec A. COUTINHO, A. BANDEIRA et Y. MODIGLIANI de l'Institut Pasteur.

Nous avons montré que la tolérance induite par des greffes d'épithélium thymique n'est due ni à la délétion ni à l'inactivation des clones de cellules T autoréactives. Nous venons de mettre en évidence que la tolérance induite de façon centrale par des greffes d'épithélium thymique allogénique (EpT) dépend de phénomènes de suppression qui contrôlent les lymphocytes autoréactifs présents à la périphérie. De plus nous avons pu préciser que les cellules suppressives sont des lymphocytes T CD4⁺, également sélectionnés par l'EpT. Ces observations montrent que ce phénomène de tolérance peut avoir une origine centrale et pas seulement périphérique comme on le pensait auparavant et que de plus elle peut être dominante. Ainsi le fait qu'il existe des cellules T régulatrices sélectionnées par l'épithélium thymique ouvre de nouvelles perspectives pour la compréhension des phénomènes de sélection positive du répertoire des cellules T, et de tolérance vis-à-vis des antigènes non présents dans le thymus.

Nous proposons maintenant de caractériser la ou les populations cellulaires responsables de la suppression. Nous envisageons d'étudier en particulier le rôle des cytokines dans ce processus. On sait que les cellules CD4⁺ se divisent en deux groupes : les cellules Th1 responsables de la sécrétion d'IL-2, IFN γ , TNF β et impliquées dans les réponses inflammatoires, et les Th2 qui produisent de l'IL-4, 5, 6, 10 nécessaires à la réponse anticorps. Ces deux sous-populations se régulent l'une et l'autre par l'intermédiaire des cytokines qu'elles produisent. Si le rôle des Th1 dans l'élimination de parasites a été démontré, il n'existe que des preuves indirectes attribuant un rôle préférentiel aux Th2 dans le maintien de la tolérance périphérique. Nous utilisons plusieurs stratégies permettant d'analyser les mécanismes mis en jeu, dans la suppression induite centralement.

Test de suppression in vivo

Le transfert de cellules T provenant de souris euthymiques syngéniques (B6.THY1.1) à des souris nude (B6) ayant reçu des lymphocytes de chimères nude B6 rendues tolérantes par des greffes d'épithélium thymique allogénique (BALB/c) est actuellement en cours. Les premiers résultats indiquent un retard significatif du rejet de greffe de peau de l'haplotype du thymus BALB/c. Des cellules T du donneur B6.THY1.1 ayant séjourné avec les cellules tolérantes seront triées et injectées à des souris B6 nude naïves afin de voir si ces cellules pourront à leur tour réguler des lymphocytes T matures. Des résultats récents nous indiquent que ce type de tolérance infectieuse peut être mis en évidence dans ce système expérimental.

Caractérisation des populations cellulaires responsables du transfert de la tolérance

L'injection de populations de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ (purifiées au trieur de cellules, FACSstar plus) à partir de chimères tolérantes, chez des nude naïves est actuellement en cours.

Étude des interactions cellulaires et de la dynamique des mécanismes de suppression

Nous proposons d'étudier la cinétique des infiltrations lymphocytaires dans des greffes allogéniques chez des receveurs nude ou irradiés après le transfert de cellules T de chimères tolérantes. Cette étude sera menée grâce à une batterie de marqueurs permettant d'identifier les sous-populations lymphocytaires. De plus nous nous proposons de caractériser le profil d'interleukines produites par les populations Th1 ou Th2 (IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ) sécrétées par les cellules T des chimères tolérantes et non tolérantes soit *ex vivo* soit après stimulation spécifique par des techniques qualitatives et quantitatives de détection des mRNA, soit à partir des lymphocytes extraits des greffons ou des ganglions drainants.

Enfin nous espérons obtenir des clones de cellules T issus des populations infiltrant les greffons, aussi bien régulatrices, qu'effectrices.

Identification des ligands reconnus par les cellules T régulatrices

La réactivité des clones obtenus ci-dessus sera étudiée *in vivo* après transfert, et *in vitro* vis-à-vis des cellules présentatrices des antigènes spécifiques, issues de différents tissus. La recherche des ligands des cellules T régulatrices ainsi clonées sera entreprise par le screening d'une banque de peptides naturels ou synthétiques.

Caractérisation de la seconde génération de cellules T régulatrices

Les cellules T régulatrices de 2^e génération (obtenues dans les cas de tolérance « infectieuse »), semblent être spécifiques de tissus. En effet, elles contrôlent le rejet de greffe de tissus reconnus durant leur éducation mais pas celui d'autres tissus du même haplotype. Ce point sera étudié lors de la réalisation de greffes primaire et secondaire de tissus différents (peau, cœur) mais de même haplotype, lors du transfert de cellules T rendues tolérantes par « infection ».

LISTE DES PUBLICATIONS

1994

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.

1995

MODIGLIANI Y., PEREIRA P., THOMAS-VASLIN V., SALAÜN J., COUTINHO A., LE DOUARIN N.M. and BANDEIRA A. (1995). Regulatory T cells in thymic epithelium induced tolerance. I. Suppression of mature peripheral non-tolerant T cells. *Eur. J. Immunol.* 25, 2563-2571.

MODIGLIANI Y., THOMAS-VASLIN V., BANDEIRA A., COLTEY M., LE DOUARIN N.M., COUTINHO A. and SALAÜN J. (1995). Lymphocytes selected in allogeneic thymic epithelium mediate dominant tolerance towards tissue grafts of the thymic epithelium haplotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7555-7559.

THOMAS-VASLIN V., SALAÜN J., GAJDOS B., LE DOUARIN N.M., COUTINHO A. and BANDEIRA, A. (1995). Thymic epithelium induces full tolerance to skin and heart but not to B lymphocytes grafts. *Eur. J. Immunol.*, 25, 438-445.

Sous presse ou Soumis

DIETERLEN-LIÈVRE F., PÉAULT B. et LE DOUARIN N.M. Développement embryonnaire du système hématopoïétique. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* (sous presse).

CORBEL C., POURQUIÉ O., CORMIER F., VAIGOT P. and LE DOUARIN N.M. BEN/SC1/DM-GRASP, a homophilic adhesion molecule, required for *in vitro* myeloid colony formation by avian hemopoietic progenitors (soumis).

DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DES GONADES

(S. MAGRE, A. APPERT, J. HOFFBECK, O. LOCQUET, S. PERLMAN).

Au cours de cette année, nous avons poursuivi notre étude sur l'expression des cytokératines dans les cellules somatiques des gonades et nous avons entrepris l'analyse de l'expression du facteur de transcription c-Ets-1 au cours de la gonadogenèse.

1. ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES CYTOKÉRATINES

— durant le développement *in vivo*

Les études effectuées, chez le rat, avaient montré qu'il existe une expression différentielle des cytokératines (CKs) acides 18 et 19 en fonction du sexe et du stade de développement de la gonade foetale. L'analyse par Northern Blotting, RT-PCR et hybridation *in situ* des ARNm codant pour les CKs 18 et 19 a mis en évidence que la régulation de l'expression de ces deux CKs s'établit au niveau transcriptionnel et que le changement (switch) dans l'expression des gènes de la CK 18 et de la CK 19 qui se produit très précocement au cours de la différenciation testiculaire est, dans l'état actuel de nos connaissances, outre l'activation

du gène de l'AMH, l'événement régulé le plus précoce de l'organogenèse testiculaire en aval de SRY (Fridmacher et al., 1995).

Dans le but d'identifier les éléments impliqués dans la régulation de l'expression différentielle des CKs nous avons envisagé une étude par transgénèse des régions promotrices des gènes des CKs. L'étape préliminaire de ce projet a consisté à vérifier s'il existe, chez la souris, la même régulation de l'expression des CKs que chez le rat. Cette étude faite en RT-PCR et hybridation *in situ* a mis en évidence des différences et des similitudes entre ces deux espèces. La CK18 absente de l'ovaire foetal de rat est présente chez la souris. En revanche, dans les deux cas, les transcrits de la CK 19 détectés dans la gonade indifférenciée, quel que soit le sexe, disparaissent au cours de la différenciation testiculaire, alors qu'ils continuent d'être exprimés dans l'ovaire foetal et postnatal.

Nous avons entrepris avec l'aide du D^r M. G. Stinnakre (INRA, Jouy-en-Josas) et en collaboration avec le laboratoire du D^r M. Royal (Montréal, Canada) des expériences de transgénèse de la région promotrice du gène de la CK 19 associée au gène rapporteur β -galactosidase. Les premières gestations se déroulent actuellement.

— en culture organotypique *in vitro*

Les expériences antérieures du laboratoire avaient montré que la morphogenèse testiculaire s'établit *in vitro* si les ébauches gonadiques indifférenciées sont cultivées dans un milieu de culture synthétique an hormonal. En revanche, en présence de sérum dans le milieu de culture, la morphogenèse testiculaire ne se produit pas, les cellules de Sertoli se différencient morphologiquement et fonctionnellement mais ne s'associent pas pour former les cordons séminifères. Un résultat, semble-t-il, identique est obtenu si un inhibiteur de la synthèse de collagène, l'acide L-Azétidine-2-Carboxylique (LACA) est ajouté au milieu de culture. Toutefois, ces deux modèles diffèrent en ce qui concerne les interactions épithélio-mésenchymateuses qui se produisent au cours de ces morphogenèses anormales. Dans les cultures faites en présence de LACA, on ne détecte la présence ni de fibronectine ni de laminine, alors qu'en présence de sérum, ces deux constituants sont présents. Nous avons entrepris l'étude de l'expression des CKs comparativement dans ces deux modèles expérimentaux et au cours de la morphogenèse normale *in vitro*. Les premiers résultats, obtenus par hybridation *in situ*, montrent l'existence d'une différence dans le profil d'expression des CKs, en fonction des différents traitements. L'analyse des relations existant entre l'état de la morphogenèse, la matrice extracellulaire, et le cytosquelette est l'objectif de nos futures recherches.

2. ÉTUDE DE L'EXPRESSION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION C-ETS-1

Le proto-oncogène *c-Ets-1*, appartenant à la famille des facteurs de transcription Ets, s'exprime dans certains dérivés mésodermiques. Son expression a été associée avec l'angiogenèse, les migrations cellulaires; elle est détectée, de

manière caractéristique, dans les mésenchymes au contact des épithéliums soumis à une morphogénèse. Les épithéliums, quelle que soit leur origine embryonnaire, sont dépourvus d'activité *c-Ets-1*.

L'étude que nous avons entreprise, en hybridation *in situ*, montre que comme cela a été démontré pour d'autres organes, l'expression de *c-Ets-1* dans la gonade est transitoire et qu'elle n'est détectée que dans le tissu mésenchymateux. Dans l'ébauche gonadique indifférenciée, à 12,5 jours de gestation, quel que soit le sexe, les transcrits de *c-Ets-1* sont présents dans le mésenchyme sous-jacent à l'épithélium coelomique en cours de prolifération. Au fur et à mesure de l'édification et de la sexualisation de la gonade, l'expression de *c-Ets-1* est détectée au sein du mésenchyme présent à l'extérieur des cordons séminifères chez le mâle et ovigères chez la femelle. A partir de 16,5 jours de gestation, l'expression est moins largement répandue et n'est présente que dans de rares cellules à 18,5 jours de gestation. L'analyse détaillée de l'expression de *c-Ets-1* au cours des stades initiaux de la gonadogénèse devrait nous apporter des indications essentielles sur la part prise par le mésenchyme dans l'édification de la gonade.

PUBLICATIONS

MAGRE S et FRIDMACHER V. (1994). Stades initiaux de la différenciation gonadique. *Contracept. Fertil. Sex.*, 22, n° 9 : 535-538.

FRIDMACHER V., LE BERT M., GUILLOU F. and MAGRE S. (1995). Switch in the expression of the K19/K18 keratin genes as a very early evidence of testicular differentiation in the rat. *Mech. Dev.* (sous presse)

APPERT A., FRIDMACHER V. and MAGRE S. (1995). *In situ* hybridization analysis of the expression of c-Ets1 mRNA during gonadogenesis in the fetal rat. *Congress of the European Developmental Biology Organisation, Toulouse* (July 9-13, 1995).

ACTIVITÉS DIVERSES

S. Magre a été invitée à la 33^e Réunion de la Société Française pour l'Etude de la Fertilité (Paris, 29-30 Septembre - 1^{er} Octobre 1994) et à la Seconde Réunion du « Club Français du Testicule » (Nouzilly, 23 Juin 1995). Elle a participé à l'enseignement du Module de Biologie de la Reproduction de l'Université Paris 6 (8 heures de cours) et a donné un séminaire au Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire, CNRS UPR 9008 (Montpellier).

Valérie Fridmacher qui a soutenu sa thèse à l'Université Paris 6 (Expression de cytokératines au cours de la différenciation sexuelle des gonades chez le foetus de rat), effectue actuellement un stage postdoctoral à Harvard Medical School, Department of Cell Biology, Boston USA. Alexandre Appert a obtenu, à l'issue de son DEA, une bourse MESR et prépare sa thèse de l'Université Paris 11.

Le Docteur P. van der Schoot (Université Erasme de Rotterdam), a effectué plusieurs séjours au laboratoire. Dans le cadre de ses recherches sur le développement du *gubernaculum testis*, il a étudié d'une part les coupes histologiques réalisées, dans les années 1945-1947, par le Prof. Jost au cours de ses expériences de décapitation foetale *in utero*, d'autre part les collections de lames histologiques du laboratoire sur le développement des foetus freemartins. Les résultats de ses observations ont été publiés dans *Anat. Rec.*, 1995, 241 : 211-214.

Le laboratoire a accueilli trois étudiantes de Maîtrise de la Reproduction de l'Université Paris 6 pour un stage d'une semaine et une étudiante de BTS pour un stage de 5 semaines.

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

Rien de nouveau n'est intervenu dans l'activité de M. Régis Dubois. On peut donc se reporter au rapport de 1993-1994.

ACTIVITÉS DIVERSES

Nicole LE DOUARIN

Conférences honorifiques :

1994 :

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

Lecture Plénière de la 8^e Conférence Internationale de l'International Society of Differentiation (ISD), Hiroshima, Japon.

1995 :

Lamport Lecture at the University of Washington, Seattle, USA.

Cajal Club Twenty-Seventh Annual Pinckney J. Harman Memorial Lecture, Atlanta, USA.

Lecture plénière au Congrès de l'International Brain Research Organization (IBRO). Kyoto, Japon, juillet 1995.

Séminaires :

1994 :

- Séminaire au Centre de Biologie Moléculaire de l'Université de Madrid, Espagne,

Invitation P^r A.R. Marcos.

- Boehringer Ingelheim Fonds, International Titisee Conferences, Titisee, Allemagne,

Invitation P^r H. Frölich, 5-9 octobre.

- Séminaire au Max-Planck-Institut für Hirnforschung de Francfort, Allemagne,

Invitation du P^r U. Ernsberger, le 7 novembre.

1995 :

- Séminaire au Department of Biological Chemistry, Howard Hughes Medical Institute, University of California, Los Angeles,

Invitation du P^r E. De Robertis, le 7 avril.

- Séminaire au Department of Anatomy and Cell Biology, Emory University School of Medicine, Atlanta, USA,

Invitation du P^r R. DeHaan.

Activités d'enseignement :

1993-1994 :

- Cours au Collège de France, Paris.

- Six Cours à la Fondation Gulbenkian, Portugal, dans le cadre du cours du Collège de France, 16-18 mai.

- Advanced Level Summer School on the « Organization of the early vertebrate embryo », Spetsai, Grèce, 16 au 28 septembre.

- Cours dans le cadre du DEA « Bases Génétiques et Moléculaires du Système Immunitaire Normal et Pathologique » (Invitation du P^r J.-F. Bach), à l'Hôpital Necker-Enfants Malades, 14 novembre.

1995 :

- Symposium « Aspects moléculaires et cellulaires de la neurogenèse » organisé conjointement avec la chaire de Biochimie cellulaire, dans le cadre de l'ensei-

nement de la chaire d'Embryologie cellulaire et moléculaire du Collège de France, 30 et 31 mars.

- Cours à l'Université de Milan, 29 et 30 mai.

Conférences sur invitation à des Colloques, Symposiums, Congrès :
1994 :

- 5th International Symposium on « Neural Transplantation », Châtenay-Malabry, 25-29 juin.
- Workshop on « Roles of growth and cell survival factors in vertebrate development », Juan March Institute, Madrid, 4-6 juillet.
- Taniguchi Symposium on « Developmental Biology VI, Inductive Tissue Interactions », Tokyo, Japan, 21-25 septembre.
- Colloque Roger Monier « Du ribosome à la biologie moléculaire du cancer », Paris, 8 et 9 octobre.
- The Seventh Ringberg, Workshop on « Gene Regulation and Development », Göttingen, Allemagne, 14-17 décembre.

1995 :

- Symposium on Uniqueness and Universality in the Biological World, UNESCO Headquarters, Paris, 10-12 janvier.
- Cologne Spring Meeting, Cologne, Allemagne, 8 au 10 mars.
- FASEB Meeting 95 « Experimental Biology », Atlanta, USA, 9-13 avril.
- Colloque de la Fondation des Treilles (Centre d'Etudes du Bassin Méditerranéen) « Neural grafts : new perspectives on the development and repair of the nervous system », organisé par N.M. Le Douarin, C. Sotelo et E. Balaban.
- Third International Duodecim Symposium « Embryonic induction models and molecules », Marienhamn, Åland, Finlande, 14-17 juin.

Organisation de colloques, congrès et symposium :

- Symposium « Aspects moléculaires et cellulaires de la neurogenèse » organisé conjointement avec la chaire de Biochimie cellulaire, dans le cadre de l'enseignement de la chaire d'Embryologie cellulaire et moléculaire du Collège de France, 30 et 31 mars 1995.
- Coorganisation d'un symposium sur « The Neural Crest » avec le P^r M. Gershon. Columbia University New York au FASEB Meeting 1995.
- Colloque de la Fondation des Treilles (Centre d'Etudes du Bassin Méditerranéen) « Neural grafts : new perspectives on the development and repair of the nervous system », organisé par N.M. Le Douarin, C. Sotelo et E. Balaban, 9-14 mai 1995.

Direction de thèses :

1994 :

« Etude *in vitro* des potentialités de différenciation de cellules dérivées de la crête neurale chez l'Oiseau », Françoise Sextier-Sainte-Claire Deville, Thèse de Doctorat de l'Université Paris VII.

« Etude de l'expression des potentialités mélanocytaire et adrénérergique des cellules dérivées de la crête neurale chez l'oiseau », Valérie Nataf, Thèse de Doctorat de l'Université Paris XI.

« Mise en évidence, clonage et étude de gènes codant pour des protéine-kinases impliquées dans le développement de la crête neurale, du mésoderme et du système vasculaire chez l'embryon d'oiseau », Anne Eichmann, Thèse de Doctorat de l'Université Paris XIII.

Distinctions :

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

Membre du Comité de Direction de la Revue Neurologique, 1994.

Membre de l'International Society for Autonomic Neuroscience, 1994.

Présidente du Conseil d'Administration de l'Etablissement Français des Greffes, novembre 1994.

Grand Officier de l'Ordre National du Mérite, 1995.

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.

Recrutement sur le poste de Maître de Conférences (n° 0138) de Madame Anne-Hélène MONSORO-BURO.