

Embryologie cellulaire et moléculaire

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

Aucun enseignement n'a été délivré au cours de l'Année Académique 1995-1996.

RÉSUMÉ DE L'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE

Le soutien institutionnel du CNRS à l'Institut d'Embryologie Cellulaire et Moléculaire dont le siège se trouve dans l'annexe du Collège de France (49 bis avenue de la Belle Gabrielle 94736 Nogent-sur-Marne Cedex) a été renouvelé pour quatre ans à compter du 1er Janvier 1996 sous la forme d'une **Unité Propre de Recherche** (UPR 9064).

Les travaux de recherche y sont effectués par quatre groupes.

- Neuroembryologie et développement des organes axiaux : Nicole Le Douarin
- Développement de la fonction immunitaire : Nicole Le Douarin
- Système sanguin chez l'embryon : Françoise Dieterlen
- Hématopoïèse humaine expérimentale : Bruno Péault

Le rapport établi ci-dessous correspond aux deux groupes travaillant sous la responsabilité de Mme Nicole Le Douarin, Professeur au Collège de France.

NEUROEMBRYOLOGIE ET DÉVELOPPEMENT DES ORGANES AXIAUX

Nos recherches ont porté sur le développement du système nerveux central (SNC) ainsi que sur la crête neurale dont dérive le système nerveux périphérique (SNP). Elles se sont étendues aussi à la différenciation du mésoderme paraxial dont le développement est étroitement lié à celui du système nerveux.

A — LA CRÊTE NEURALE

La crête neurale est une structure embryonnaire pluripotente et transitoire constituée de cellules douées de propriétés migratoires. Elle est à l'origine de types cellulaires remarquablement variés tels que : les ganglions du système nerveux périphérique (SNP) sensoriels et autonomes, les cellules gliales qui leur sont associées, les mélanocytes, des cellules endocrines (adrenomedulla, cellules C de la thyroïde) et le mésectoderme. Nous avons depuis de nombreuses années consacré des recherches actives à l'ontogenèse de cette structure qui pose nombre de problèmes intéressants en Biologie du Développement.

Le système de marquage cellulaire par les chimères caille-poulet a tout d'abord i) permis de découvrir quelles sont les structures dérivées de la crête neurale ; ii) d'établir de quel niveau du névraxe elles sont issues ; iii) de mettre en évidence les voies de migration que les cellules des crêtes neurales empruntent pour atteindre leur cible.

Nos travaux (réalisés dans les années 1970), avaient montré la participation massive de la crête neurale à la formation des structures squelettiques et dermiques de la face. Ils avaient aussi montré la coopération entre mésectoderme (i.e. mésenchyme issu de la crête neurale) et mésoderme dans la formation des muscles de la tête : le mésoderme fournit les myocytes et le mésectoderme les cellules conjonctives qui lui sont associées. Ce travail était cependant resté incomplet et plusieurs interrogations subsistaient quant à l'origine embryologique des os du crâne et à la participation du mésoderme aux structures céphaliques.

Nous avons entrepris une série de recherches mettant en œuvre une microchirurgie embryonnaire particulièrement fine appliquée à des embryons au stade neurula (5 somites). Les rôles respectifs du mésoderme céphalique et du mésectoderme issu de la crête neurale dans la genèse des structures céphaliques ont pu ainsi être précisément délimités.

1. — La crête neurale et la genèse de la tête : la triple origine du crâne des vertébrés

Le mésoderme céphalique est constitué du mésoderme précordial et paraxial. Ce dernier prolonge les somites dans le domaine céphalique. Nous avons pu montrer que les cellules du mésoderme précordial deviennent les myoblastes des muscles oculo-moteurs médio-ventraux ; celles du mésoderme paraxial médian fournissent les myoblastes des muscles latéro-dorsaux oculo-moteurs, les méninges du mésencéphale et le chondrocrâne basal (basipost-sphénoïde, orbito-sphénoïde, supra-occipital, pétreux partiellement). Les cellules du mésoderme paraxial latéral ont une destinée musculaire au niveau du plancher buccal (sauf la musculature linguale d'origine somitique) et des muscles masticateurs. Le mésoderme céphalique a, par ailleurs, des potentialités angiogénétiques.

Il apparaît ainsi que la contribution du mésoderme au squelette céphalique est modeste. Au contraire, celle de la crête neurale s'est révélée très importante.

Bien que l'origine des os de la face à partir de la crête neurale céphalique ait été établie par nos travaux antérieurs (voir l'ouvrage consacré à « The Neural Crest » par N. Le Douarin, 1982), celle de la voûte de la boîte crânienne constituée par les os frontaux et pariétaux restait incertaine. Les résultats de l'ensemble de nos travaux récents permettent désormais d'assigner à chaque os du crâne une origine embryologique précise et de montrer qu'ils ont une triple source : ectodermique par la crête neurale, mésodermique par le mésenchyme céphalique paraxial et par les cinq premiers somites qui fournissent l'occipital. Nous distinguons un crâne « acordal » ou « précordal » situé en avant de l'extrémité antérieure de la notocorde qui se trouve au niveau de la selle turcique du sphénoïde. L'origine du crâne précordal est entièrement ectodermique via la crête neurale. Cette région comprend l'os frontal dont l'origine à partir de la crête neurale est désormais démontrée. Le crâne « cordal » est d'origine mésodermique dans sa partie ventromédiane et ectodermique (crête neurale) en ce qui concerne le pariétal et une partie de la capsule otique. Un point important éclairci par ce travail concerne la double origine du corps de l'os sphénoïde dans lequel le basiprésphénoïde provient de la crête neurale et le basipost-sphénoïde provient du mésoderme céphalique.

Ces résultats mettent en évidence l'importance de la crête neurale dans l'évolution des Vertébrés. A mesure que le cerveau antérieur (télencéphalique) se développe en avant de l'extrémité de la notocorde, dans les formes les plus évoluées de ce phylum, la crête neurale antérieure est utilisée pour construire la voûte crânienne destinée à protéger les centres nerveux en expansion. Nous avons par ailleurs montré (voir ci-dessous) que le mésoderme paraxial ne peut se différencier en cartilage en l'absence de notocorde. Par conséquent une stratégie différente devait être mise en œuvre pour assurer la protection du cerveau précordal ; elle a consisté à utiliser les potentialités squelettogéniques de la crête neurale.

2. — Régulation génétique du développement de la région hypobranchiale par les gènes à homeobox

Nous avons, par le passé, consacré de nombreux travaux au développement de la région hypobranchiale qui est très largement dérivée de la crête neurale rhombocéphalique.

Nous avons récemment entrepris d'étudier le rôle des gènes *Hox* dans la mise en place des structures très complexes qui se développent dans la région faciale et hypobranchiale.

Des mutations affectant le développement chez la Drosophile ont conduit à la découverte et à l'isolement de gènes responsables de la mise en place du plan

d'organisation de la future mouche. Parmi ces gènes, la famille HOM-C regroupe 9 gènes dont la mutation provoque des transformations homéotiques. Des homologues des gènes de cette famille ont été clonés dans de nombreuses espèces d'Invertébrés et de Vertébrés. Chez ces derniers, il existe 4 groupes de gènes *Hox*, homologues au complexe HOM-C de Drosophile et situés sur 4 chromosomes différents chez la souris et chez l'homme. Comme chez la Drosophile, la position de ces gènes dans chaque complexe et la limite rostrale de leur expression obéissent au principe de colinéarité selon lequel les gènes situés en 3' sont ceux dont l'expression est la plus précoce, la plus rostrale et la plus sensible à l'induction par l'acide rétinoïque.

C'est au niveau du cerveau postérieur, du pharynx et du membre que l'expression des gènes *Hox* a été étudiée le plus en détail. Le cerveau postérieur est divisé en métamères appelés rhombomères. Les limites de ces métamères d'abord décrites comme des constriction du tube neural se sont avérées être des barrières à la migration cellulaire. De plus, ces limites correspondent à celle de l'expression des gènes *Hox*. Ainsi, nous avons établi que chez le poulet et la caille, de manière similaire à ce qui a été décrit chez la souris, la limite antérieure des gènes du groupe 4 se situe entre les rhombomères 6 et 7 (r6 et r7), celle de *Hoxa-3* et *b-3* entre r4 et r5 et celle de *Hoxa-2* entre r1 et r2. *Hoxb-1* est exprimé jusqu'à r6 exclu, plus une bande en r4. Chaque rhombomère est donc caractérisé par l'expression d'un ensemble de gènes et constitue un « code *Hox* ». Celui-ci est commun aux cellules d'un niveau donné du tube neural et à la crête neurale qui en dérive.

Nous avons cherché à déterminer par l'approche des chimères caille/poulet quels étaient les mécanismes de régulation de l'expression de ces gènes dans le tube et la crête. A cet effet nous avons transplanté ectopiquement au stade 5 somites, avant que les gènes *Hox* ne s'expriment dans cette région, les territoires présomptifs des futurs rhombomères et étudié la manière dont les gènes *Hox* se mettent en place. Au préalable, une cartographie des territoires présomptifs des rhombomères a été établie. Il apparaît que des territoires destinés à exprimer des gènes *Hox* expriment ces gènes même en position ectopique s'ils sont greffés rostralement. Au contraire, les rhombomères qui normalement n'expriment pas *Hoxb-1*, *a-2*, *a-3*, *b-3*, *a-4*, *b-4* ou *d-4* le font lorsqu'ils sont transplantés postérieurement en r8. Ces capacités d'induction et de compétence sont maintenues au moins jusqu'au stade de 26 somites. Nous avons de plus montré que cette induction est médiée par la propagation postéro-antérieure d'un signal dans le plan du tube neural et fait aussi intervenir le mésoderme latéral au tube neural. Ainsi, des somites exprimant les gènes *Hox* du 4ème groupe paralogue sont capables d'induire ces gènes dans l'épithélium neural du rhombencéphale antérieur. Ces observations posent de nombreuses questions que nous tentons actuellement de résoudre. Ainsi, il a été montré par d'autres auteurs que l'expression de *Hoxb-1* dans r4 est déterminée précocement et ne peut être induite ectopiquement. Nous étudions donc de manière systématique les restrictions du phénomène

d'induction que nous avons mis en évidence. Tous les gènes peuvent-ils être induits, peuvent-ils l'être sur tout leur territoire d'expression ? Quelles sont les limites de la compétence du neuroépithélium ? Concerne-t-elle en particulier le cerveau antérieur où les gènes *Hox* ne sont jamais exprimés ?

D'autre part, dans la mesure où les gènes *Hox* semblent contrôler le développement des tissus dans lesquels ils sont exprimés nous avons examiné si le phénotype des rhombomères transplantés est réorienté lorsque le code *Hox* est modifié.

Les résultats obtenus lors de la transplantation des rhombomères 5-6 postérieurement (en r8) ont été spectaculaires à cet égard. En effet, on observe une transformation homéotique complète des centres nerveux formés par le tissu transplanté. Ceux-ci sont conformes au niveau du névraxe dont ils ont adopté le code *Hox*.

3. — La ségrégation des lignées cellulaires issues de la crête neurale

Le problème fondamental posé par le développement de la crête neurale est celui de sa pluripotentialité. Comment des types cellulaires aussi variés émergent-ils à partir des quelques cellules indifférenciées qui la constituent à l'origine ?

Nous avons montré dans les années précédentes que l'environnement cellulaire dans lequel les cellules de la crête neurale migrent influence d'une manière décisive leur différenciation. En effet, en changeant l'emplacement d'un fragment de crête neurale le long du névraxe, on change non seulement les voies de migration empruntées par les cellules mais aussi les tissus cibles dans lesquels elles se localisent. La différenciation des cellules se produit alors toujours en accord avec leur nouvelle localisation et non avec leur devenir dans le développement normal. Ainsi, des cellules du niveau vagal du névraxe normalement destinées à fournir des ganglions entériques dont le neurotransmetteur principal est l'acétylcholine se différencient en cellules adrénérgiques si elles sont implantées au niveau brachial dont sont normalement issues les cellules de la médullo-surrénale.

Le problème se posait donc de connaître la nature des facteurs de l'environnement agissant sur la différenciation des cellules de la crête neurale et de savoir si leur rôle est instructif ou permissif. En d'autres termes, ces facteurs agissent-ils sur des cellules pluripotentes ou sur des cellules déjà déterminées sur lesquelles ils exerceraient une sélection. Nous avons donc cherché à répondre aux questions suivantes :

1. Quel est l'état de détermination des cellules de la crête neurale, au cours de leur migration et lorsqu'elles atteignent leur tissu cible ? Existe-t-il une cellule multipotente dans la crête neurale capable de fournir des dérivés neuraux, gliaux, mélanocytaires et mésenchymateux ?

2. Quels sont les facteurs qui influencent la différenciation des cellules de la crête neurale et sont responsables de leur diversification ?

J'exposerai ci-dessous les résultats acquis et les opérations de recherche engagées actuellement.

— *La détermination des cellules de la crête neurale*

Le problème de l'état de détermination des cellules de la crête neurale a été abordé *in vitro*. Nous avons d'abord mis au point un système permettant la culture clonale des cellules de la crête neurale prélevées lorsqu'elles effectuent leur migration et lorsqu'elles s'aggrègent pour former des ganglions du SNP.

Cette démarche est comparable à celle qui a été particulièrement féconde au cours de ces vingt dernières années pour la mise en évidence des différents types de précurseurs hématopoïétiques et des facteurs de croissance nécessaires à leur développement jusqu'au stade de cellules sanguines différenciées. La mise au point d'un système de culture permettant une telle analyse pour la crête neurale a été difficile, mais l'utilisation de cellules 3T3 traitées par la mitomycine a permis de faire des progrès considérables dans ce domaine. Nous avons ainsi pu démontrer, d'abord sur la crête céphalique puis sur la crête troncale, qu'au cours de sa migration, la crête neurale est composée de cellules diversement déterminées, certaines n'étant capables de fournir qu'un seul type de dérivés alors que d'autres donnent naissance à des colonies où plusieurs types cellulaires sont présents. Les cellules pluripotentes se sont révélées plus nombreuses que celles qui sont déjà déterminées. Ainsi des précurseurs communs à la glie, aux neurones, aux mélanocytes et même aux dérivés conjonctifs (més ectoderme, pour la crête céphalique uniquement) ont été trouvés. Les cellules capables de fournir des colonies contenant l'ensemble des principaux dérivés de la crête neurale peuvent être considérées comme des cellules souches totipotentes analogues à celles dont sont issues les différentes lignées de cellules sanguines. Comme ces dernières, elles sont très rares, la crête neurale en cours de migration étant essentiellement constituée de précurseurs intermédiaires pluripotentiels. Le répertoire des potentialités présentes dans chacun des précurseurs est étonnamment varié. Une étude statistique réalisée sur plus de quatre cent colonies amène à considérer que la ségrégation des différentes lignées cellulaires (c'est-à-dire la restriction progressive des capacités de différenciation des cellules issues de la cellule souche totipotente), obéit à un processus aléatoire plutôt qu'elle ne s'effectue selon une séquence définie.

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

— *L'évolution temporelle des capacités de différenciation des cellules de la crête neurale*

Les cellules issues de la crête ont été prélevées non seulement lorsqu'elles commencent à migrer comme je l'ai précédemment décrit mais lorsqu'elles ont atteint ou sont sur le point d'atteindre leur cible. Ainsi, elles ont été isolées à partir du sclérotome du somite lorsqu'elles migrent à travers cette structure ou à partir du mésoderme intestinal lorsqu'elles effectuent la colonisation de l'intestin. Leur isolement a été réalisé grâce à leur affinité pour l'anticorps monoclonal (Mab) HNK1/NC1. Des cellules dissociées de sclérotome ou d'intestin sont traitées par HNK1-Mab et les cellules HNK1⁺ sont prélevées à l'aide d'une micropipette sous le contrôle d'un microscope à fluorescence inversé et ensemencées isolément sur la couche nourricière de cellules 3T3. L'aptitude à produire des clones et les potentialités de différenciation des cellules de crête migrant à travers le mésoderme somitique d'embryons de 3 jours d'incubation (E3) ont été comparées à celles des cellules non-neuronales encore capables de se diviser provenant de ganglions rachidiens pris à E6-E14. Comme la plupart des cellules présentes à E3 dans les sclérotomes sont destinées à édifier les ganglions rachidiens, on peut considérer que ces deux populations cellulaires représentent les mêmes dérivés de la crête troncale à des stades de développement différents.

Après 10 jours de culture, les clones issus de cellules de crête neurale migrant à E3 dans les somites sont grands et contiennent à la fois des cellules neuronales et non-neuronales, au contraire de ceux issus des ganglions rachidiens qui sont plus petits et ne comportent que des phénotypes non-neuronaux.

Il avait été montré précédemment dans mon laboratoire que parmi les cellules non-neuronales des ganglions rachidiens se trouvent des précurseurs adrénériques capables de se différencier dans des cultures de masse de ganglions rachidiens dissociés. Nous constatons que ces cellules ne se différencient jamais dans les cultures clonales issues de cellules de ganglions rachidiens. Leur différenciation en fait n'a lieu que si la densité cellulaire dès le début de la culture atteint un seuil critique de 100 à 150 cellules ensemencées par puits de 20 μ l. Ceci suggère que les interactions entre cellules dérivées de la crête neurale sont un facteur important pour l'émergence du phénotype adrénérique. On retrouve ici un « effet de communauté » comparable à celui décrit par J. Gurdon pour les cellules du mésoderme primaire chez le xénope.

Dans le cas de la crête neurale vagale qui est à l'origine de l'innervation intestinale nous avons testé le pouvoir de différenciation des cellules HNK1⁺ des diverses parties du tractus digestif entre E4 et E12. L'analyse des clones obtenus a montré que l'efficacité de clonage des cellules entériques est de 28 % de E4 à E7 ; elle décroît brusquement à E8. La taille des clones et la diversité phénotypique des cellules composant les clones décroissent également pendant la période considérée. De plus, deux phénotypes, qui ne se rencontrent jamais *in situ* dans les plexus entériques, sont trouvés dans ces cultures : des cellules adrénériques

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 (voir ci-dessous). La capacité à produire des cellules adrénérergiques est mise en évidence dans les cultures clonales de cellules dérivées de la crête neurale prises dans le gésier de E4 à E6. A partir de E7, les cultures de gésier ne produisent plus de cellules contenant la tyrosine hydroxylase (TH⁺) enzyme clé de la biosynthèse des catécholamines. En revanche, à ce stade, les cultures d'intestin fournissent encore un grand nombre de cellules adrénérergiques. Ces données mettent en évidence un gradient cranio-caudal de disparition des précurseurs adrénérergiques dans le tractus digestif.

Cette étude montre que des précurseurs de cellules adrénérergiques 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 adrénérergique *in vivo*. De plus, une diminution progressive des capacités de prolifération des cellules de la crête neurale au cours de leur migration est ainsi mise en évidence.

En conclusion, il apparaît que l'environnement exerce un rôle de sélection des potentialités de différenciation des cellules de la crête neurale. Le fait que ces cellules constituent une population hétérogène quant à leurs potentialités de différenciation indique que les facteurs environnementaux peuvent exercer leur sélection à la fois en permettant la survie et la différenciation de cellules déjà déterminées (effet permissif) et en influençant le devenir de cellules pluripotentes vers une voie particulière de différenciation (effet instructif).

Afin d'aller plus loin dans l'analyse de la différenciation des cellules de crête neurale, nous avons orienté nos recherches dans deux directions : 1. La mise au point de marqueurs moléculaires destinés à étudier plus précisément la nature des dérivés de la crête neurale ; 2. La recherche *in vivo* et en culture des facteurs susceptibles d'influencer le devenir des cellules de la crête neurale ; 3. L'étude du contrôle génétique du développement de la crête neurale céphalique par les gènes *Hox*.

4. — Recherche de marqueurs moléculaires de la différenciation des cellules de la crête neurale et du système nerveux central

Nous avons très largement utilisé la stratégie des anticorps monoclonaux (Mabs). C'est ainsi qu'ont été découvertes plusieurs protéines nouvelles que nous avons immunopurifiées et dont les ADNc ont été clonés au laboratoire. Je développerai brièvement les caractéristiques de certaines d'entre elles : SMP : Schwann cell myelin protein ; BEN : Burso-epithelial and neuronal protein ; MeLEM : Melanocyte early marker.

D'autres Mabs reconnaissent des épitopes glucidiques restreints à des types cellulaires déterminés. Tel est le cas du Mab-4B3 caractéristique des cellules

gliales et des Mabs Mel1 et Mel2 spécifiques des mélanocytes et qui reconnaissent des résidus glycosylés portés respectivement par des molécules de 123 000 et 85 000 de Mr.

D'autres Mabs ont été produits au laboratoire tels que MB1 qui reconnaît une glycoprotéine spécifique des cellules endothéliales et sanguines de la caille et qui est très utile dans notre étude du développement du système immunitaire et vasculaire (voir ci-dessous); 13F4 est un autre Mab spécifique des cellules musculaires (lisses, striées et cardiaques) qui reconnaît un déterminant antigénique apparaissant précocement au cours de la différenciation musculaire.

L'ensemble de ces réactifs sont déposés dans des banques d'hybridomes et sont à la disposition de la communauté scientifique.

— Marqueurs des cellules gliales

Les Mabs 4B3 et SMP ont été obtenus après immunisation d'une souris par les glycoprotéines purifiées de myéline des nerfs de caille adulte. *In vivo*, SMP est exprimé d'une manière exclusive par les cellules de Schwann et les oligodendrocytes. Il constitue le marqueur le plus précoce connu des cellules gliales de l'oiseau.

En Western blot et en conditions non réductrices, SMP apparaît dans le SNP comme un doublet de masse relative (Mr) 75-80 000 et dans le SNC comme un singulet de Mr 80 000. L'anticorps anti-SMP reconnaît un épitope conformationnel de nature polypeptidique. Le traitement de SMP par la glycopeptidase F a montré que 20 % environ de la masse de la molécule était de nature glucidique. Après immuno-purification de SMP nous avons pu déterminer la séquence en acides aminés NH₂ terminale ainsi que plusieurs microséquences internes de la protéine. Des expériences d'amplification (PCR) réalisées entre des mélanges d'oligonucléotides correspondant à ces microséquences ont fourni deux sondes non-dégénérées dont l'une de 400 bases correspondant à l'extrémité 5' codante de l'ADNc. Le criblage d'une banque d'ADNc de moelle épinière de caille avec cette sonde a permis d'isoler l'ADNc complet codant pour SMP qui a une taille de 3Kb environ.

La séquence peptidique du messenger codant pour SMP révèle une phase ouverte de lecture de 620 acides aminés contenant deux séquences hydrophobes correspondant l'une au peptide signal en amont de la séquence NH₂-terminale identifiée précédemment, l'autre à un domaine transmembranaire. La partie extracellulaire de la séquence contient 5 sites de glycosylation ainsi que 15 cystéines et un site RGD. L'alignement de séquences centrées sur les cystéines démontre d'importantes homologies internes dont la disposition suggère l'existence de 5 domaines globulaires de type immunoglobuline C2. SMP présente de nombreuses homologies de séquences avec d'autres molécules de la superfamille des Ig telles que NCAM et surtout la « myelin associated glycoprotein » (MAG) clonée chez le rat.

La protéine purifiée a servi à préparer divers anticorps monoclonaux ou polyclonaux. D'une manière générale les anticorps reconnaissent les protéines de caille et de poulet alors que la sonde nucléique est spécifique de la caille. Ceci a été mis à profit dans un travail récent de P. Cameron-Curry sur l'origine des oligodendrocytes (voir ci-dessous).

— *La protéine BEN*

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 hématopoïétique aviaire. 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 certains 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 synaptogenèse : 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'ontogenèse du système nerveux.

La protéine BEN, purifiée par immunoaffinité, s'est révélée être un monomère dont la masse moléculaire relative varie entre 95 000 et 100 000 en fonction de sa N-glycosylation (25 à 30 %).

L'analyse de la structure de la protéine codée par l'ADNc révèle que BEN est une molécule originale de la superfamille des immunoglobulines (Ig) possédant une structure typique de protéine transmembranaire de type I, dotée d'un peptide signal hydrophobe, de 5 domaines de type Ig dont deux domaines de type variable et trois domaines de type constant suivis d'un domaine transmembranaire et d'un court domaine cytoplasmique.

L'étude de la distribution de BEN au cours de la mise en place des faisceaux d'axones dans le cerveau et particulièrement lors de la jonction entre l'olive inférieure et les cellules de Purkinje du cortex cérébelleux a été réalisée. Elle suggère fortement que BEN joue un rôle dans les phénomènes de reconnaissance axone-cible au cours de l'établissement des connexions nerveuses dans le SNC comme dans le SNP.

— *Le marqueur des mélanoblastes MeIEM*

Il a été obtenu à la suite de l'immunisation d'une souris par des cellules de crête neurale cultivées dans des conditions favorables à la différenciation mélanocytaire. Il est 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 MeIEM est une protéine de Mr 26000. Parmi les dérivés de la crête neurale, cette protéine n'est synthétisée que par la lignée mélanocytaire. L'antigène MeIEM n'est cependant pas un marqueur exclusif des mélanocytes. Il est aussi fortement exprimé par les hépatocytes. Ceci nous a permis d'en déterminer la nature biochimique.

Nous avons purifié la protéine MeIEM sur colonne d'affinité à partir d'extrait de foie embryonnaire de caille (E10). Cet organe a été choisi car le MA b MeIEM immunoprécipite dans le foie une protéine de même Mr que dans les mélanocytes. La séquence de cette protéine s'est avérée bloquée en NH₂terminal. Après digestion de la protéine et purification des fragments tryptiques par HPLC, trois peptides internes ont été séquencés. La recherche, dans une base de données, d'homologies de séquence entre ces peptides et d'autres protéines connues a révélé que la protéine MeIEM immunopurifiée à partir de foie est une sous-unité de classe a de la glutathion-S-transférase (GST). Cette enzyme impliquée dans la détoxification cellulaire est un dimère dont les sous-unités peuvent appartenir à quatre classes α , μ , π et τ . Des expériences d'hybridation *in situ* avec des oligonucléotides correspondant à deux des peptides séquencés ont confirmé l'identité de la protéine MeIEM dans les mélanocytes. En conclusion, le marqueur du lignage mélanocytaire MeIEM est une sous-unité a de la GST.

5. — Les facteurs de l'environnement influençant la différenciation des cellules de la crête neurale

— *Effet de l'acide rétinoïque sur la différenciation des cellules de la crête neurale in vitro*

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*. Il exerce, en effet, lorsqu'il est administré en excès au cours de la gestation un effet tératogène très marqué sur les structures faciales et diverses autres structures provenant de la crête neurale. D'autre part, des études récentes ont montré que les cellules de la crête neurale expriment différents types de récepteurs à l'acide rétinoïque. Nous avons donc décidé d'étudier l'effet de l'acide rétinoïque sur la différenciation des cellules de la crête neurale *in vitro*, en réalisant des cultures clonales de cellules de la crête neurale troncale et céphalique en présence d'acide rétinoïque à la concentration de 0,1 à 10 μ M. La composition des clones obtenus a été ensuite analysée à l'aide de différents marqueurs, puis comparée à celle des cultures témoins.

Nous mettons en évidence un effet très net 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.

— *Le système de l'endothéline 3 et de son récepteur de type B*

Les endothélines (ET) sont des peptides de 21 acides aminés agissant par liaison à des récepteurs cellulaires à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Chez les mammifères, 3 gènes (*ET-1*, *ET-2* et *ET-3*) ont été identifiés. Deux types de récepteurs aux endothélines, ET-A et ET-B ont été clonés. Ces récepteurs présentent des affinités différentes pour les 3 endothélines. Ainsi, l'affinité de ET-A pour ET-3 est très faible alors que ET-B lie les 3 endothélines avec la même affinité. Chez le xénope, un troisième type de récepteur, spécifique de ET-3 a été cloné à partir de mélanophores dermiques.

L'endothéline a été initialement décrite comme un facteur vasoconstricteur produit par les cellules endothéliales. Toutefois, le rôle biologique et l'expression des endothélines et de leurs récepteurs semblent beaucoup plus étendus. Actuellement, de nombreuses données ont montré que ET-3 et le récepteur ET-B sont impliqués dans le développement de 2 lignages issus de la crête neurale : les neurones ganglionnaires entériques et les mélanocytes. Ainsi les souris mutantes *piebald/lethal* (*s^l*) et *lethal spotting* (*ls*) présentent à l'état homozygote un mégacolon, par absence de ganglions entériques et des anomalies de la pigmentation du pelage. Une mutation complète du gène du récepteur ET-B a été mise en évidence chez la souris *s^l* tandis qu'une mutation ponctuelle de ET-3 a été identifiée chez la souris *ls*. L'inactivation ciblée des gènes *ET-B* et *ET-3* provoque chez les souris homozygotes un phénotype semblable à celui des souris *s^l* et *ls*. Ces données sont complétées chez l'homme par l'analyse de mutations dans la maladie de Hirschsprung qui a révélé dans certains cas une mutation de *ET-B*.

Nous avons isolé l'ADNc du ET-B de caille et nous étudions la distribution des ARN messagers dans les dérivés de la crête neurale. D'autre part, nous étudions *in vitro* l'effet de l'endothéline 3 sur la différenciation des cellules de crête neurale en culture de masse et clonale.

Les résultats obtenus jusqu'ici montrent que l'endothéline 3 exerce un effet spectaculaire sur la prolifération des cellules de la crête neurale en culture et sur leur engagement vers la voie de différenciation mélanocytaire.

Le système du facteur steel et de son récepteur c-kit

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 l'expression des gènes *c-kit* et *steel* au cours du développement de l'embryon d'oiseau, grâce aux sondes correspondantes clonées chez le poulet.

Dès le 4^e jour de développement embryonnaire (E4), *c-kit* est exprimé par des cellules isolées situées entre l'ectoderme et le dermomyotome, 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 montrer 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 d'en suivre la migration bien avant que la pigmentation de ces cellules n'en permette l'identification.

Steel (ou SCF), 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 d'entrer dans l'ectoderme. Chez l'oiseau, au contraire, les précurseurs des mélanocytes entrent précocement (à E5) dans l'ectoderme où ils continuent à proliférer et où ils se différencient. 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.

Afin d'approfondir le rôle du système *c-kit/steel* dans la différenciation des mélanocytes, nous avons réalisé une étude directe *in vitro* de l'effet du facteur *steel* sur la mélanogénèse.

Nous montrons que le SCF favorise la survie de l'ensemble de la population de cellules de la crête neurale et stimule le processus de différenciation mélanocytaire mais n'a qu'une action limitée sur leur prolifération.

En conclusion, l'étude de la différenciation de la lignée mélanocytaire montre que plusieurs facteurs interviennent pour assurer le développement de ces cellules. Le facteur Steel et l'endothéline 3 sont parmi ceux qui ont été identifiés. Le premier est actif sur la survie et la différenciation terminale des mélanoblastes. Le second l'est sur leur prolifération.

Il y a tout lieu de croire qu'il en existe d'autres. Le HGF (pour « hepatocyte Growth Factor ») encore appelé « scatter factor » pourrait être l'un d'entre eux. Nous effectuons des recherches sur une souche de poulet hyperpigmenté, appelée « Nègre Soie » dans laquelle les mélanocytes, très abondants, envahissent les tissus conjonctifs et musculaires. Nous avons cherché par Northern Blot à mettre en évidence l'hyperproduction de l'un des facteurs mélanogéniques connus. Nous n'avons jusqu'ici pu mettre en évidence aucune anomalie de la production de ces facteurs susceptible de rendre compte de la pigmentation anormale des poulets « Nègre Soie ». Il est donc probable que des facteurs mélanogéniques encore inconnus restent à découvrir.

B — UTILISATION DES CHIMÈRES EMBRYONNAIRES POUR L'ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

La construction de chimères entre caille et poulet permet d'étudier dans des conditions uniques les migrations des cellules neurales au sein même du neurectoderme pendant la neurogenèse. Elle permet aussi de connaître le devenir des différentes régions de l'ébauche neurale primitive. La réalisation de cerveaux et de moelles épinières chimériques ne perturbe le développement des structures nerveuses ni du point de vue morphologique ni du point de vue fonctionnel. Nous avons pu ainsi apporter des données nouvelles et modifier le schéma classique qui prévalait jusqu'alors sur l'ontogenèse du cervelet. D'autre part l'origine des oligodendrocytes, qui constitue actuellement un sujet controversé a été établie dans un système de greffes hétérospécifiques entre caille et poulet.

Un des résultats importants obtenu récemment concerne le mode de formation de la plaque neurale et l'origine de la floor plate (plaque du plancher).

Enfin, les recherches que nous menons depuis plusieurs années sur la crête neurale nous ont amenés à étudier les mécanismes qui interviennent dans la mise en place de l'axe de polarité dorso-ventrale dans le système nerveux.

Les phénomènes immunologiques de rejet du tissu nerveux greffé ne surviennent que plusieurs semaines après la naissance et permettent d'utiliser ces chimères interspécifiques pour étudier l'origine neurale génétique de certains traits comportementaux, tels que le chant. Ils sont totalement absents dans les combinaisons allogéniques entre différentes souches de poulet. Ceci a été mis à profit pour étudier l'origine d'une forme congénitale autosomique récessive d'épilepsie réflexe chez le poulet qui constitue un modèle animal de certaines épilepsies humaines.

1. — Étude de l'ontogenèse du cervelet

Nous avons montré que contrairement aux idées classiques, selon lesquelles le cervelet a pour origine la vésicule métencéphalique, le mésencéphale participe largement à cette structure. En effet entre 2 et 5 jours d'incubation, le 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 sous-jacent, (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. Nous avons pu déterminer de plus que seul le métencéphale rostral intervient dans la formation du cervelet.

Afin de délimiter l'extension dorso-ventrale du territoire cérébelleux nous avons pratiqué des échanges de territoires du mésencéphale caudal ou du métencéphale rostral au stade de 12 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 degrés dorso-latéraux de la vésicule més-métencéphalique. L'origine exacte et la mise en place de la couche granulaire externe ont pu être étudiées grâce à ces chimères. Au niveau métencéphalique, les futures cellules de la couche granulaire externe 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. — L'origine des oligodendrocytes de la moelle épinière

Les oligodendrocytes sont les cellules gliales qui produisent la myéline dans le système nerveux central (SNC). Leur origine dans la moelle épinière est controversée. Pour certains, ils dérivent comme tous les autres types cellulaires du SNC de précurseurs qui se multiplient dans la couche germinative de l'épithélium ventriculaire d'où ils se positionnent par migration radiaire. Pour d'autres, ils dérivent, comme les astrocytes, de la glie radiaire. Un autre modèle a été plus récemment proposé selon lequel les précurseurs des oligodendrocytes sont initialement groupés ventralement en deux zones médianes très limitées du neuroépithélium. Ils migreraient ensuite latéralement et dorsalement dans la substance blanche en formation. Toutefois, d'une part la migration des oligodendroblastes à partir de cette zone génératrice n'a pas été démontrée de façon directe, et d'autre part il n'est pas prouvé que tous les oligodendrocytes de la moelle épinière dérivent de cette population ventrale de précurseurs putatifs.

Nous avons donc entrepris de localiser précisément la zone d'origine des précurseurs des oligodendrocytes dans le neuroépithélium et de suivre leur mi-

gration en utilisant le système des chimères interspécifiques construites microchirurgicalement *in ovo*. Des secteurs dorsaux ou dorso-latéraux du primordium neural ont été échangés, unilatéralement, entre embryons de caille et de poulet de 2 jours, au niveau des derniers somites formés. La structure de l'hétérochromatine des noyaux des deux espèces étant différente, les cellules issues du greffon sont reconnues par une simple coloration histologique. De plus, les chimères ont été sacrifiées à 12-14 jours d'incubation, stades auxquels il est possible d'utiliser conjointement le marqueur caille et le marqueur des oligodendrocytes constitué par la protéine SMP que nous avons isolée. La sonde ADNc SMP est spécifique des cellules de caille et nous permet donc de reconnaître par hybridation *in situ*, parmi les oligodendrocytes totaux, ceux qui sont issus de précurseurs qui étaient présents dans les territoires de caille à l'exclusion de ceux du poulet. Ainsi nous pouvons évaluer l'étendue d'éventuelles migrations des oligodendrocytes ou de leurs précurseurs dans les territoires de type poulet.

Nous avons démontré que :

1) les deux parties ventrale et dorsale du tube nerveux ont des potentialités oligodendrogéniques. En effet, seules les zones de l'épithélium ventriculaire médian, les plaques du plancher et du toit, sont dépourvues de cette capacité ;

2) d'importantes migrations en direction ventro-dorsale et dorso-ventrale ont lieu, de sorte que les oligodendrocytes dérivés de précurseurs situés à chaque niveau dorso-ventral du neuroépithélium contribuent à la population des cellules gliales de tous les niveaux. Inversement donc, les oligodendrocytes de chaque niveau de l'axe dorso-ventral de la moelle, tels ceux des funicules dorsaux, dérivent de précurseurs d'origine à la fois dorsale et ventrale.

Nos résultats ne permettent pas de conclure si les précurseurs des différents niveaux sont générés aux mêmes stades pendant le développement, et si les différentes migrations ont lieu en même temps. Nos travaux actuels tendent à élucider ce problème.

3. — Mode de formation et origine de la partie ventrale de la plaque neurale (« floor plate ») et de la notocorde au cours de la neurulation :

La neurulation chez les vertébrés est considérée comme étant le résultat de l'induction de la plaque neurale à partir de l'ectoderme superficiel par la notocorde. En fait, la situation est plus compliquée et l'origine de la partie ventromédiane du tube neural appelée « floor plate » (ou plaque du plancher) est actuellement le sujet d'une controverse. La floor plate est considérée par certains comme résultant d'une induction qui prend son origine dans la notocorde et qui pourrait être médiée par le produit du gène *sonic hedgehog (shh)*. Les travaux récents de notre laboratoire tendent à infirmer cette interprétation. En réalisant des chimères entre caille et poulet, nous montrons que, dès le stade de la ligne primitive, l'ébauche de la floor plate est distincte de celle de la plaque neurale.

En fait, la floor plate et la notocorde dérivent d'un territoire commun situé dans le nœud de Hensen. Ce territoire est à l'origine des deux structures tout le long du névraxe : de l'adénohypophyse à l'extrémité caudale de l'embryon. La plaque neurale en fait est issue d'une ébauche double, bilatérale qui au cours de la neurulation constitue une plaque unique par suite de la fusion des deux ébauches latérales par la floor plate. Ce travail, en cours de publication, modifie d'une manière très importante les notions classiques que l'on a sur la neurulation chez les vertébrés supérieurs.

Notre programme sur ce point consiste à étudier les particularités intrinsèques de la floor plate : ce territoire est-il capable ou non de produire des neurones lorsqu'il est greffé en position ectopique ? Son origine commune avec la notocorde pose le problème de son identité par rapport à cette structure. Nous comptons étudier dans les ébauches de la floor plate et de la notocorde issues du nœud de Hensen l'expression de divers gènes actifs dans l'organisateur chez l'amphibien (*chordine* et *Cnot* notamment).

4. — Déterminisme génétique de la polarité dorso-ventrale de l'ébauche neurale

L'ébauche neurale est caractérisée par la différenciation de types cellulaires dont la distribution dorso-ventrale obéit à un ordre bien défini. Dans la moelle épinière ventrale, les cellules issues de la plaque basale se développent en motoneurones ; plus dorsalement l'épithélium ventriculaire des plaques alaires produit des interneurones puis dorsalement les neurones sensoriels périphériques, issus de la crête neurale.

Les recherches de plusieurs laboratoires ont montré que la notocorde et la floor plate jouent un rôle inducteur des motoneurones. Le facteur sécrété codé par le gène *sonic hedgehog* (*shh*) est impliqué dans ce phénomène. Ainsi, des études précédentes ont montré que la greffe ectopique de notocorde ou de floor plate en position latéro-dorsale par rapport au tube neural induit dans celui-ci la différenciation de motoneurones.

Certains gènes ont été découverts dont les territoires d'expression dorso-ventrale sont strictement délimités dans le tube neural. Il en est ainsi des gènes de la famille *Pax* (*Pax3* est dorsal, *Pax6* ventral) et de la famille *Msx* dont les deux membres connus chez l'oiseau, *Msx1* et *Msx2*, sont exprimés dans le tube neural dorsal.

Enfin des facteurs de la famille TGF β : Dsl1 et BMP4 (pour « Dorsalin 1 » et « Bone Morphogenetic Protein4 ») sont exprimés dorsalement à des stades du développement décisifs pour la détermination des types neuronaux dans le tube neural.

Nous avons montré jusqu'ici que la greffe d'une notocorde en position médio-dorsale a pour effet d'abolir l'expression des gènes dorsaux *Msx1*, *Msx2*, *Pax3*,

BMP4, *Dsll* sans induire l'expression des marqueurs ventraux (*shh* et BEN). Il en résulte une évolution aberrante de la roof plate qui est normalement à l'origine du septum dorsal.

Le tube neural présente alors une prolifération anormale des cellules dorsales à E7 suivie de leur dégénérescence à E9-E10. De part et d'autre de la zone opérée, nous observons d'importantes perturbations des connexions des fibres sensorielles traduisant l'absence de septum dorsal à distance de la greffe de notocorde. Cette étude montre que le tube neural dorsal ne peut être reprogrammé en tube neural de type latéral ou ventral par une greffe de notocorde ectopique aux stades de développement où les parties latérales de la moelle épinière sont encore modifiables. Cette détermination précoce des cellules dorsales fait que, lorsqu'on inhibe leurs caractères dorsaux tout en les laissant dans un environnement proche de l'ectoderme superficiel, elles restent essentiellement indifférenciées puis dégèrent.

Nous cherchons actuellement, à l'aide de cellules transfectées par des constructions rétrovirales comportant l'ADNc de facteurs tels que *shh*, *BMP2*, *BMP4*, à étudier plus précisément quelles sont les substances responsables de la détermination des divers types cellulaires qui se différencient à partir de l'ébauche neurale primitive.

5. — F.Epi un modèle d'épilepsie réflexe généralisée

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Pr. R. Naquet (Institut Alfred Fessard, CNRS-UPR 2212) et le Dr. C. Batini (Laboratoire de Physiologie de la Motricité, CNRS-URA 385).

— *Transfert de l'épilepsie photosensible par greffe d'épithélium neural d'un embryon de poulet génétiquement épileptique chez un embryon de poulet normal*

Une épilepsie généralisée réflexe, d'origine génétique a été découverte chez le poulet par R. Crawford (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 stimulation lumineuse intermittente (SLI) ou toute autre stimulation nerveuse (bruit, mouvement, fatigue musculaire ou stress). Les crises induites par la SLI se déroulent d'une manière stéréotypée en trois phases principales : alerte avec perte d'équilibre, clonies des muscles du cou et course, puis convulsions généralisées auto-entretenues.

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, E., Teillet, M.-A. and Le Douarin, N.M. 1988, *Science*, 241, 1339-1342), nous avons tenté de transférer l'épilepsie photique chez des poulets sains par la greffe isotopique de régions précises 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 photosensible caractérisée par les 3 phases précédemment décrites, 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 SLI (elles manifestent l'alerte et les pertes d'équilibre), ne développent jamais de convulsions. Les chimères ayant reçu des greffes autres que le *prosencephale* ne présentent pas les anomalies de l'EEG interictal et ne montrent généralement aucun comportement de type épileptique à la SLI, à l'exception de myoclonies du cou à la fréquence de la lumière chez les chimères qui ont reçu le *mésencéphale* épileptique.

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

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

L'activité électroencéphalographique est enregistrée sur des animaux paralysés par le flaxédyl ou immobilisés par des bandages afin d'éviter les artéfacts durant les crises. Qu'ils soient paralysés ou non, tous les homozygotes *F. Epi* et les chimères sensibles à la SLI du fait de la greffe d'un *prosencephale* et d'un *mésencéphale* « épileptiques » présentent, quelques secondes après le début de la SLI, 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 SLI. L'EEG ictal des poulets épileptiques rapproche le modèle aviaire de ceux fournis par les rats et souris présentant une épilepsie audiotogène qui montrent une désynchronisation identique durant les crises induites par le bruit. Ce type d'EEG paraît donc caractéristique des épilepsies du tronc cérébral.

— **Crisis photosensibles et audiosensibles chez les poulets *F. Epi* et chez les chimères. Étude comparative et mise en évidence des structures nerveuses impliquées**

Nous avons montré que d'un point de vue comportemental, les crises induites par une stimulation sonore intense (SSI) se distinguent des crises induites par la SLI par l'existence d'une vraie période de course entre la période d'alerte et les convulsions généralisées. L'expression EEG de la crise induite par la SSI, comme celle de la crise induite par la SLI est une désynchronisation suivie éventuellement d'un aplatissement. Plusieurs types de chimères ont été soumises consécutivement à la SLI et à la SSI :

a) Les chimères ayant uniquement le *prosencephale* *F. Epi* présentent au repos l'EEG *F. Epi* typique. La SLI déclenche la phase 1 de la crise (alerte) et une

réaction d'éveil mais jamais de myoclonies. Ces chimères ne présentent aucune réaction de type épileptique sous SSI.

b) Les chimères ayant le *proscéphale* et le *mésencéphale* F.Epi montrent les caractéristiques comportementales et électrophysiologiques de l'épilepsie F.Epi à la fois sous SLI et sous SSI.

c) Les chimères ayant le *mésencéphale* F.Epi, à l'exclusion du *proscéphale* bien qu'ayant un EEG interictal normal peuvent développer des crises complètes sous SSI. Lors de la SLI elles présentent des myoclonies du cou suivant la fréquence de la SLI, mais des convulsions généralisées sous SLI n'ont été observées qu'exceptionnellement chez quelques individus de cette série.

d) Les chimères ayant un *rhombencéphale* F.Epi, à l'exclusion du *mésencéphale* ne réagissent ni à la SLI ni à la SSI.

Le mésencéphale paraît donc indispensable pour l'apparition des convulsions que ce soit sous une stimulation lumineuse intermittente ou stimulation sonore intense. Cependant des structures autres que mésencéphaliques, en particulier le proscéphale pour les crises à la SLI, sont nécessaires pour le déclenchement des crises.

Un modèle est proposé pour rendre compte des voies nerveuses impliquées dans l'épilepsie réflexe au bruit et à la lumière. Ces études montrent que les épilepsies du tronc cérébral dont l'existence était contestée chez l'homme peuvent rendre compte des phénomènes observés dans les épilepsies réflexes tant chez l'homme que chez l'animal.

Ces recherches ont permis pour la première fois d'effectuer une étude cellulaire et comportementale d'un type d'épilepsie encore mal connu.

C — LA DIFFÉRENCIATION DU MÉSODERME

1. — Analyse de la régionalisation et de la différenciation du mésoderme somitique en structures squelettiques et musculaires

Nous avons étudié le rôle des organes axiaux (notocorde et floor plate) qui appartiennent à l'environnement immédiat des somites sur la différenciation de ces derniers et montré que ces structures produisent un facteur responsable de l'induction du sclérotome. En outre, en l'absence des inducteurs ventraux, tout le somite se différencie en dérivés dorsaux (muscle). Récemment, le gène *shh* a été impliqué dans ce processus, et pourrait correspondre à l'inducteur ventralisant du somite. Il apparaît ainsi qu'au cours du développement normal, la notocorde est essentielle à la formation du cartilage vertébral. Nous avons cependant observé que la partie dorsale du somite responsable de la fermeture de l'arc neural fait intervenir un système génétique particulier. Le mésenchyme sclérotomal qui migre

dorsalement au tube nerveux pour constituer l'apophyse épineuse exprime les gènes *Msx1* et *Msx2*. L'ectoderme superficiel à ce niveau et la plaque du toit (ou « roof plate ») expriment les gènes *Msx1*, *Msx2* et *BMP4*. On peut par diverses manipulations inhiber l'expression des gènes *Msx1* et *Msx2*. Dans ce cas, l'apophyse épineuse ne se forme pas. L'étude du rôle des gènes *Msx* dans la formation de la vertèbre nous a amenés à étudier le rôle des protéines BMP2/4 dans ce système, les protéines BMP2/4 étant connues pour induire l'expression des gènes *Msx* dans d'autres systèmes embryonnaires. Nous avons implanté *in vivo* des cellules produisant les protéines recombinantes BMP2 ou BMP4, et montré que ces facteurs induisent l'expression des gènes *Msx* dans le somite ; ceci est suivi par le développement de pièces de cartilage superficielles ectopiques ou l'hyper-trophie de l'apophyse épineuse. On remarque de plus que la différenciation du squelette superficiel de la tête (originaire du méssectoderme) exprime le même complexe génique *Msx1/Msx2/BMP4*. Il semble donc que ces gènes interviennent pour former les os de type dermique ou cartilagineux situés en position superficielle. Notre projet consiste à étudier la cascade génétique intervenant dans ces processus d'ossification et le rôle de chacun de ces gènes dans la morphogenèse du squelette superficiel.

La musculature striée du tronc des vertébrés se compose d'un groupe de muscle épaxiaux associés à la colonne vertébrale originaires de la partie médiane du somite, ainsi que d'un groupe de muscles hypaxiaux comprenant les muscles des membres et des ceintures, provenant de la partie latérale du somite. Ces deux groupes de muscles possèdent des cinétiques de différenciation très différentes, puisque les premières cellules musculaires sont dérivées de la partie médiane du somite et sont produites deux jours avant celles de la partie latérale. Malgré leur origine et leur cinétique de maturation différente, aucun marqueur permettant de différencier précocement ces deux lignages n'était connu. Nous avons étudié l'expression de l'homologue aviaire du gène *Single-minded* de drosophile, identifié par C.M. Fan et M. Teissier-Lavigne et démontré que ce gène, appelé *Sim1* constituait un marqueur spécifique et précoce du compartiment latéral des somites. Nous avons ensuite étudié le rôle de l'environnement dans la spécification des compartiments médian et latéral des somites en utilisant *Sim1* et les facteurs myogéniques *MyoD* et *myf5* comme marqueurs.

Nous avons démontré que la lame latérale produit un facteur diffusible responsable de l'activation de *Sim1* et de la répression de *MyoD* et *myf5* dans la partie latérale du somite. Nous montrons en outre que l'effet de ce facteur est antagonisé par un facteur diffusible produit par le tube neural qui empêche l'activation de *Sim1* dans la partie médiane du somite. Nous avons recherché parmi les facteurs de croissance connus d'éventuels candidats pour ces deux facteurs. Nous avons observé que le facteur BMP4 de la famille des TGF β , qui est impliqué dans plusieurs phénomènes d'induction au cours du développement des vertébrés, est exprimé dans la lame latérale pendant la somitogenèse. Nous avons greffé des cellules infectées par un rétrovirus produisant BMP4 en face de la partie médiane

du somite et montré que BMP4 pouvait induire *Sim1* et réprimer l'expression de *MyoD* dans ce territoire, de la même manière que des greffes de lame latérale. Par conséquent BMP4 correspond vraisemblablement au facteur produit par la lame latérale *in vivo*.

Notre projet consiste à poursuivre l'étude de BMP4 sur le développement du somite. Nous réaliserons des infections de somites avec un rétrovirus codant pour une version dominante-négative du récepteur de BMP4 afin de bloquer l'effet de cette molécule *in vivo*. Le deuxième aspect consiste à rechercher le facteur produit par le tube neural capable d'antagoniser l'effet de BMP4. Plusieurs facteurs répondant à ce critère ont été identifiés chez le xénope tels que Chordin ou Noggin. Nous testerons donc l'effet de ces facteurs sur le développement de la partie latérale du somite.

2. — Étude de l'expression des récepteurs à activité protéine kinase au cours du développement de l'oiseau

Une des idées directrices de nos recherches concerne l'étude des interactions cellulaires qui président au développement des structures différenciées chez l'embryon. Dans cette optique nous avons décidé de consacrer un effort particulier à la recherche de récepteurs membranaires dont l'expression serait spécifique d'une ébauche ou d'un tissu embryonnaire et limitée à un stade particulier du développement. C'est pourquoi j'ai chargé deux jeunes chercheurs (A. Eichmann, étudiante en thèse et C. Marcelle, chercheur postdoctoral) de cloner par la méthode PCR en utilisant des oligonucléotides dégénérés déduits de la séquence aminopeptidique de régions conservées de la partie intracytoplasmique de récepteurs à activité protéine kinase (PTKR), des récepteurs exprimés dans la crête neurale, le tube neural et les blastodisques d'embryons de caille et de poulet précoces.

— Clonage de PTKR aviaires

Vingt-trois molécules codant pour des fragments de protéines kinases ont été clonées à partir d'ARN messager isolé de la crête neurale, du tube nerveux et des blastodisques d'embryons de caille et de poulet. La Figure 1 montre leurs rapports phylogénétiques mutuels basés sur l'étude de leur séquence. 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'en étudier le rôle potentiel pendant le développement de l'embryon d'oiseau, nous avons mis en évidence leur expression dans l'embryon par la technique d'hybridation *in situ*. La plupart des kinases cytoplasmiques ont une expression ubiquitaire, tandis que celle des récepteurs des facteurs de croissance s'est révélée spécifique de différents tissus embryonnaires. Nous nous sommes ensuite concentrés sur quatre des récepteurs tyrosine kinase : deux récepteurs du VEGF (« vascular endothelial growth factor ») nommés Quek1 et Quek2 (pour « quail endothelial kinase »), un nouveau

récepteur du FGF (« fibroblast growth factor ») appelé FREK (pour « FGF-receptor-like embryonic kinase »), ainsi que le PDGFR (« platelet-derived growth factor receptor ») α .

— Récepteur au FGF

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

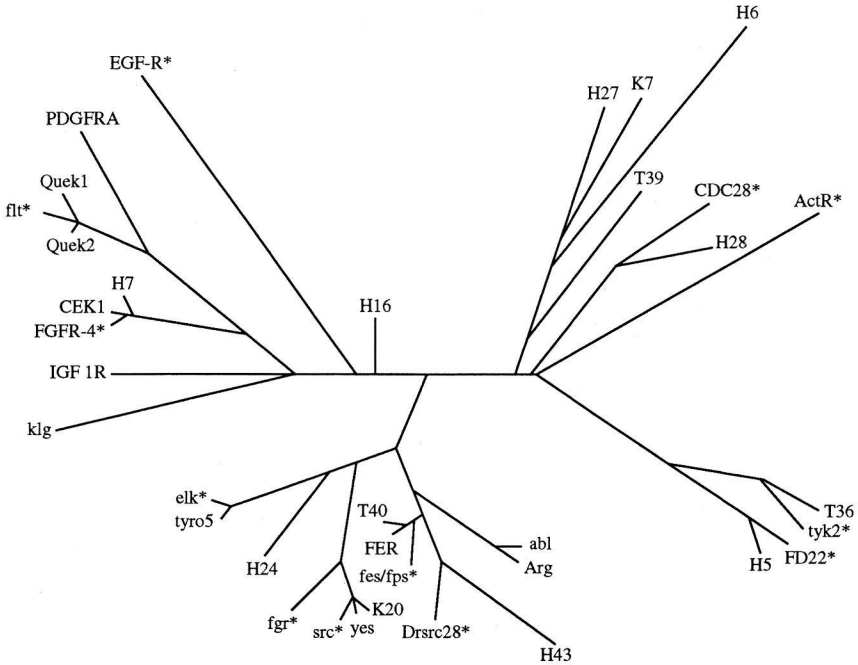


Figure 1

Arbre phylogénétique des protéines-kinases connues chez l'oiseau, comprenant 12 kinases de référence (*), et 23 kinases récemment identifiées par C. Marcelle et A. Eichmann

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. En culture, nous avons pu démontrer qu'après addition de FGFb le transcrite codant pour le récepteur est rapidement augmenté dans les cellules satellites musculaires,

suggérant que le FGFB joue un rôle dans la prolifération de ces cellules au cours de la myogenèse.

— *Étude des récepteurs du vascular endothelial growth factor (VEGFR)*

Nous avons réalisé le clonage de deux gènes qui se sont ensuite révélés être les homologues aviaires de gènes clonés en même temps chez la souris et l'homme et qui lient le VEGF. Ces VEGFR aviaires ont été appelés Quek1 et Quek2. Plus précisément, Quek1 et Quek2 sont les homologues des récepteurs du VEGF humain KDR et flt-4, respectivement.

Nous avons défini le patron d'expression de ces gènes au cours du développement précoce de l'embryon d'oiseau. L'hybridation *in situ* avec *Quek1* 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 préparé au laboratoire. Cependant, *Quek1* et *2* sont exprimés dans le mésoderme précoce environ 15 heures avant l'apparition de l'affinité pour MB1/QH1. Des expériences de greffes caille/poulet ont montré que ces précurseurs mésodermiques exprimant *Quek1* et *2* se différencient en cellules endothéliales. *Quek1* et *2* représentent donc des marqueurs pour des précurseurs endothéliaux à un stade très précoce de différenciation.

LISTE DES PUBLICATIONS

1995

CAMERON-CURRY P. (1995). Le lignage glial du système nerveux périphérique. *C. R. Soc. Biol.*, 189, 253-261.

CAMERON-CURRY, P. and LE DOUARIN, N.M. (1995). Oligodendrocyte precursors originate from both the dorsal and the ventral parts of the spinal cord. *Neuron*, 15, 1299-1310.

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.*, 128, 529-548.

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

GUY, N.T., FALDLALLAH, N., NAQUET, R., and BATINI, C. (1995). Development of epileptic activity in embryos and newly hatched chicks of the Fayoumi mutant chicken. *Epilepsia*, 36, 101-107.

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

LE DOUARIN, N.M. (1995). The Neural Crest (an overview). In « Gray's Anatomy » Peter L. Williams ed., Churchill Livingstone, New York, 220-228.

LE DOUARIN, N.M. (1995). What are the developmental relationships between the neural crest and the polypeptide hormone secreting cells ? In « Embryos, endocrine cells and the neural crest », a collection of essays in honour of Ann Andrew, edited by Beverley Kramer and Benjamin Rawdon, Witwatersrand, University Press, pp. 3-12.

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.

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 (MelEM) 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.

STIEBER A., MOURELATOS, Z., LE DOUARIN, N. and GONATAS, N. K. (1995). MG160, a membrane protein of the Golgi apparatus which is homologous to a fibroblast growth factor receptor and to a ligand for E-selectin, is found only in the Golgi apparatus and appears early in chicken embryo development. *Exp. Cell Res.* 219, 562-570.

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. *Ital. J. Neurol. Sci.*, 16, 83-91.

ZILLER, C. and LE DOUARIN, N.M. (1995). *In vivo* and *in vitro* studies on the differentiation of the neural crest in the avian model. In « Organization of the early vertebrate embryo », N. Zagris, A.-M. Duprat and A.J. Durston eds., Plenum Press, New York, Nato meeting / Nato ASI series volume, A : Life series, pp. 241-247.

1996

BATINI, C., TEILLET, M.-A., NAQUET, R. and LE DOUARIN, N.M. (1996). Brain chimeras in birds : application to the study of a genetic form of reflex epilepsy. *Trends Neurosci.* 19, 246-252.

CHÉDOTAL, A., POURQUIÉ, O., EZAN, F., SAN CLEMENTE, H. and SOTELO, C. (1996). BEN as a presumptive target recognition molecule during the development of the olivo-cerebellar system. *J. Neurosci.*, 16, 3296-3310.

DUPREZ, D.M., COLTEY, M., AMTHOR, H., BRICKELL, P.M. and WICKLE, C. (1996). Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) inhibits muscle development and promotes cartilage formation in chick limb bud cultures. *Dev. Biol.*, 174, 448-452.

LAHAV, R., ZILLER, C., DUPIN, E. and LE DOUARIN, N.M. (1996). Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 3892-3897.

LE DOUARIN, N.M., DIETERLEN-LIÈVRE, F., and TEILLET, M.-A. (1996). Quail-chick transplantations. *Meth. Cell Biol.*, 51, 23-61.

LE DOUARIN, N.M., GRAPIN-BOTTON, A. and CATALA, M. (1996). Patterning of the neural primordium in the avian embryo. *Sem. Cell Dev. Biol.*, 7, 157-167.

LECOIN, L., GABELLA, G. and LE DOUARIN, N.M. (1996). Origin of the *c-kit* positive interstitial cells in the avian bowel. *Development*, 122, 725-733.

POURQUIÉ, O., FAN, C.-M., COLTEY, M., HIRSINGER, E., WATANABE, Y., BRÉANT, C., FRANCIS-WEST, P., BRICKELL, P., TESSIER-LAVIGNE, M. and LE DOUARIN, N.M. (1996). Lateral and axial signals involved in avian somite patterning : a role for *BMP-4*. *Cell*, 84, 461-471.

WATANABE, Y. and LE DOUARIN, N.M. (1996) A role for *BMP-4* in the development of subcutaneous cartilage. *Mech. Dev.*, 57, 69-78.

Sous presse ou Soumis

CATALA, M., TEILLET, M.-A., DE ROBERTIS, E.D. and LE DOUARIN, N.M. A spinal cord fate map in the avian embryo : while regressing, Hensen's node lays

down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. Development (sous presse).

COULY, G., GRAPIN-BOTTON, A., COLTEY, P. and LE DOUARIN, N.M. The regeneration of the cephalic neural crest : a problem revisited (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).

DUPIN, E., ZILLER, C. and LE DOUARIN, N.M. Segregation of cell lineage in the avian neural crest. Colloques Médecine et Recherche Fondation Ipsen (18/9/95) : « Isolation, characterization and utilization of CNS stem cells » (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. Cell Res., (sous presse).

EICHMANN, A., MARCELLE, C., BRÉANT, C. and LE DOUARIN, N.M. Molecular cloning of Quek 1 and 2, two quail vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-like molecules. Gene, (sous presse).

MONSORO-BURQ, A.-H., DUPREZ, D., WATANABE, Y., BONTOUX, M., VINCENT, C., Brickell, P. and LE DOUARIN N.M. The role of bone morphogenetic proteins in vertebral development (soumis).

NATAF, V., LECOIN, L., EICHMANN, A. and LE DOUARIN, N.M. Endothelin-B receptor is expressed by neural crest cells in the avian embryo (soumis).

DÉVELOPPEMENT DE LA FONCTION IMMUNITAIRE : DISCRIMINATION DU SOI ET DU NON-SOI

Notre travail a porté essentiellement sur les mécanismes par lesquels s'établit la reconnaissance du soi et du non-soi au cours du développement du système immunitaire.

Nous avons montré par le passé que la composante épithéliale du thymus greffée chez l'embryon d'oiseau est colonisée par des cellules hématopoïétiques (HC) de l'hôte et induit une tolérance permanente à des greffes de peau, d'aile ou de bourse de Fabricius provenant de donneurs allogéniques et xénogéniques. Ces dernières associations concernent des greffes embryonnaires de caille chez le poulet. Nous avons observé que cette tolérance est obtenue même si seulement 1/3 du thymus de l'hôte contient un endoderme d'origine caille. Elle paraît donc être médiée par des cellules capables d'inhiber l'activation des lymphocytes T réactifs contre les antigènes de caille qui sont générés dans le compartiment thymique de l'hôte. Ainsi, la tolérance vis-à-vis du soi, loin de résulter seulement de l'élimination dans le thymus de clones potentiellement autoréactifs paraît bien être due aussi à la mise en œuvre d'un phénomène inhibiteur ou dominant qui aurait une origine thymique et dans lequel le rôle de l'épithélium est décisif. Afin d'étudier en profondeur la nature des cellules et des mécanismes moléculaires

mis en jeu dans le processus que nous avons ainsi découvert, nous avons mis au point un modèle expérimental murin dont l'étude s'est développée depuis 1988.

Nous montrions en 1990 que la greffe de l'ébauche thymique contenue dans l'épithélium de la 3e poche branchiale d'un embryon de souris de la souche C3H chez une souris nu/nu BALB/c permet la reconstitution de la fonction T chez la souris athymique qui devient ainsi capable de rejeter les greffes de peau allogéniques à l'exception de celles portant le MHC de l'haplotype de l'épithélium thymique greffé.

Ces résultats ont été à l'origine de nombreux travaux qui ont permis de montrer que l'épithélium thymique n'est pas impliqué d'une manière significative dans l'élimination des clones autoréactifs. On peut en effet mettre en évidence par diverses méthodes, l'existence chez l'hôte de cellules T réagissant contre les antigènes du type de l'épithélium thymique greffé. Ces cellules cependant ne sont pas activées *in vivo* alors qu'elles peuvent l'être *in vitro*. Les cellules inhibitrices responsables de cette inactivation constituent une population distincte des cellules réactives et sont générées au contact de l'épithélium thymique. Il est en effet possible de reconstituer la fonction T chez une souris nude naïve par les cellules T périphériques d'une chimère ayant reçu un épithélium thymique sans transférer la tolérance à l'égard du MHC de ce dernier.

Dans des travaux précédents réalisés chez le poulet, nous avons montré que la reconnaissance du soi et du non-soi comporte une composante post-thymique (ou « périphérique »). Ainsi, en situation allogénique, la greffe d'un bourgeon d'aile entre poulets MHC – incompatibles est suivie d'une tolérance à long terme de l'aile greffée qui s'étend à des greffes de peau. Nous montrons ici que ce mécanisme n'est pas général pour tous les tissus. Ainsi la bourse de Fabricius, d'origine splanchnopleurale, n'induit pas la tolérance à la peau. Une certaine spécificité tissulaire et antigénique intervient donc dans ce mécanisme.

Nos recherches actuelles consistent à rechercher les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la tolérance dominante mise en évidence par nos travaux précédents. Nous avons pour cela adopté le modèle de la souris qui offre des possibilités d'analyse génétique et moléculaire meilleures que l'embryon d'oiseau. Nous avons établi une collaboration étroite avec le laboratoire du Dr. Coutinho à l'Institut Pasteur pour réaliser ce programme.

LISTE DES PUBLICATIONS

1995

CORBEL, C., LACOSTE-ELEAUME, A.-S., BLEUX, C., QUÉRÉ, P., COUDERT, F. and KANELLOPOULOS-LANGEVIN, C. (1995). Platelet integrin GPIIb-IIIa homolog identified on chicken thrombocytes in « *Advances in Avian Immunology Research* », T.F. Davison, N. Bumstead, P. Kaiser eds. Carfax, U. K. pp. 57-64.

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.

1996

CORBEL, C. (1996). The avian model in the study of tolerance to self. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 212, 95-106.

CORBEL, C., POURQUIÉ, O., CORMIER, F., VAIGOT, P. and LE DOUARIN N.M. (1996). BEN/SC1/DM-GRASP, a homophilic adhesion molecule, required for *in vitro* myeloid colony formation by avian hemopoietic progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 2844-2847.

N. LE DOUARIN, C. CORBEL, A. BANDEIRA, V. THOMAS-VASLIN, Y. MODIGLIANI, A. COUTINHO and J. SALAÜN. (1996). Evidence for a thymus dependent form of tolerance that is not based on elimination or anergy of reactive T cells. *Imm. Rev.*, n° 149, 35-53.

THOMAS-VASLIN, V., COLTEY, M. and SALAÜN, J. (1996). On the mechanisms of thymic epithelium induced tolerance. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 319, 401-404.

Sous presse ou Soumis

MODIGLIANI, Y., COUTINHO, A., PEREIRA, P., LE DOUARIN, N., THOMAS-VASLIN, V., SALAÜN, J. and BANDEIRA, A. Establishment of tissue-specific tolerance is driven by regulatory T cells selected by thymic epithelium. *Eur. J. Immunol.*, (sous presse).

THOMAS-VASLIN, V., SALAÜN, J., COLTEY, M., VAIGOT, P. and FUCS, R. Kinetics and repertoire selection of T cells derived from the early waves of fetal thymus colonization, after thymus grafting in allogenic nude recipients (soumis).

DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DES GONADES

Equipe ayant quitté le Collège de France fin 1995.

CELLULES GERMINALES

MIGRATIONS CELLULAIRES : ÉTUDE DE LA COLONISATION
DES ÉBAUCHES GONADIQUES PAR LES CELLULES GERMINALES
CHEZ L'EMBRYON DE POULET

(R. DUBOIS, D. CUMINGE)

Propriétés caractéristiques du système étudié

Nos précédents travaux (1) ont montré que les propriétés moléculaires des différents compartiments dans lesquels s'effectue la migration des CGP (feuillet embryonnaire, mésenchymes...) de même que les paramètres de l'hémodynamique influent sur les modalités des déplacements cellulaires, mais ne déterminent pas leur orientation. Les théories actuellement en vogue qui attribuent à l'environnement un rôle directeur dans la canalisation des mouvements cellulaires ne s'appliquent pas à la lignée germinale des oiseaux (2). Il ne fait aucun doute que la migration des CGP est gouvernée par un mécanisme chimiotactique : ce sont les épithéliums germinatifs, et eux seuls, qui commandent à distance le chimio-guidage des CGP vers le but à atteindre.

Sur la base d'arguments fournis par l'observation des processus *in vivo* et par l'analyse de résultats expérimentaux il a été démontré que la **Concanavoline A (Con A)** inhibe la migration de la population des CGP en agissant par couplage à des complexes glycoprotéiques par ailleurs mis en évidence au niveau de la membrane plasmique des CGP (autoradiographies en microscopie électronique (3)).

La loi d'inhibition par la Con A est de la forme :

$$\text{Intensité de migration} = f(\exp.k.\text{concentration}), \text{ avec } k < 0$$

On sait que l'aspect contingent de cette loi conduit à définir une concentration de demi-inhibition estimée à 30 mg·ml⁻¹ dans nos conditions expérimentales. Cela signifie en particulier qu'il n'existe pas de concentration en lectine qui puisse inhiber la migration de toutes les CGP (voir plus loin notre étude sur les effets de la dexaméthasone).

L'interprétation de cette loi en langage embryologique conduit à énoncer les propriétés suivantes : c'est au niveau du mécanisme « signal-réponse » que la lectine agit selon une règle stochastique qui met en évidence l'hétérogénéité des CGP.

En d'autres termes, la loi d'inhibition par la Con A ne traduit nullement un ralentissement des motilités cellulaires, mais obéit à une logique binaire dans le cadre de laquelle certaines CGP, pour une concentration donnée en lectine, ne

déteignent plus les variations du potentiel d'attraction et, désorientées, cessent de participer à la fertilisation des ébauches gonadiques.

Cette introduction permet de situer nos activités actuelles.

1. — La Con A — peroxydase comme marqueur de la synthèse glycoprotéique dans les CGP à différents stades du développement
(CUMINGE et DUBOIS, note en préparation)

Nous avons souhaité apporter des preuves concrètes en faveur de déductions théoriques suggérées par l'expression mathématique en visualisant par une technique histochimique (DAB) les sites cellulaires riches en complexes glycoprotéiques. Nos résultats sont les suivants :

a) La Con A — peroxydase démontre une très nette affinité pour certaines CGP localisées dans le croissant germinatif. A ce stade, qui précède la migration, la population de CGP est cependant d'une grande hétérogénéité : certaines CGP sont fortement positives, d'autres moyennement colorées, d'autres négatives relativement au critère étudié.

b) **Les CGP en migration** à proximité des épithéliums germinatifs attractifs sont très intensément marquées par la lectine. A quelques rares exceptions près, la population des CGP migratrices est remarquablement homogène relativement au critère d'affinité pour le marqueur. Les épithéliums germinatifs ne montrent pas de réactivité particulière.

c) Les gonocytes primaires de la gonade du 6ème jour d'incubation ne lient pas préférentiellement la Con A — peroxydase. Il en va de même des spermatogonies et des ovogonies à partir du 8ème jour de l'incubation.

d) En revanche, les gonocytes localisés dans la gonade du 6ème jour d'incubation, expérimentalement associée en culture à un épithélium germinatif attractif, montrent une hétérogénéité d'un grand intérêt. Les gonocytes localisés au sein du stroma gonadique ne lient pas la Con A — peroxydase (similitude avec le paragraphe c) précédent). Les gonocytes directement exposés à l'attraction de l'épithélium, ou en migration dans l'espace cœlomique (4), montrent une grande affinité pour le marqueur.

Nos observations mettent donc en évidence une relation d'ordre spatio-chronologique entre la synthèse de complexes glycoprotéiques spécifiques aux CGP (vraisemblablement des motifs membranaires) et l'activité migratrice de ces cellules au cours du développement. De plus, un dispositif expérimental établit une étroite corrélation entre la proximité d'un épithélium germinatif attractif et la stimulation de la synthèse glycoprotéique dans certains gonocytes primaires de la gonade indifférenciée.

En conclusion, c'est bien en se conjugant à des complexes glycoprotéiques spécifiques des CGP que la lectine brouille le chimioguidage de ces cellules et enraye le processus de fertilisation des ébauches gonadiques.

2. — Étude des effets de la dexaméthasone sur la migration des CGP

(CUMINGE et DUBOIS, article en préparation)

Nous avons repris, ces dernières années, la description des aspects cinétiques de la colonisation des ébauches gonadiques en fonction du stade du développement, c'est-à-dire en fonction du temps mesuré en « unités-somites » (5).

Mais dans le cadre de notre nouveau projet nous avons introduit un paramètre supplémentaire, l'évolution de la somito-genèse dans le sens céphalo-caudal. La colonisation sera donc ici décrite d'un double point de vue (qualitatif et quantitatif) **dans une représentation à 3 dimensions**. Ce mode d'observation a permis de mettre en évidence des données nouvelles :

a) La colonisation de l'ébauche gonadique commence avec la formation du somite 20. L'extension anatomique des épithéliums germinatifs dont la différenciation est visualisée par la fixation des CGP comme marqueurs de cette différenciation, est bornée par l'intervalle [19^{ème} somite-29^{ème} somite].

b) C'est au niveau du 23^{ème} somite que l'effet attractif est le plus puissant et se traduit par la plus forte densité en CGP.

c) Le processus de colonisation se limite strictement à la partie de l'épithélium qui jouxte les somites différenciés. Aux différents stades du développement des cellules germinales fixées dans la région la plus caudale des épithéliums attractifs sont identifiées au niveau du dernier somite formé. **On ne rencontre jamais de CGP dans l'épithélium cœlomique situé au-delà du dernier somite, dans la région du mésoderme paraxial non segmenté.**

Sur un échantillon d'environ 600 embryons examinés à divers stades dans l'intervalle indiqué, cette règle ne souffre pratiquement d'aucune exception. Ainsi, le pouvoir attractif de l'épithélium germinatif s'étend progressivement dans le sens céphalo-caudal en étroite corrélation avec somitogenèse sans qu'il soit possible, dans l'état actuel de nos connaissances, de dire si la différenciation de l'épithélium cœlomique en épithélium germinatif est dépendante ou indépendante de la segmentation du mésoderme paraxial.

Cette observation nous semble revêtir un intérêt certain. Il suggère en effet une activation séquentielle d'un mécanisme génétique contrôlant les premières phases de la morphogenèse sexuelle. L'utilisation d'une sonde appropriée devrait permettre de vérifier cette hypothèse en recherchant s'il s'agit d'un homéogène bien conservé puisque indispensable à la fertilité des représentants de l'espèce au cours de la succession des générations.

Les effets de la dexaméthasone sur les processus mis en évidence par ce nouveau cadre d'observations sont en cours de dépouillement et d'analyse statistique. On sait par les résultats d'un travail préliminaire (6) que cette molécule inhibe globalement la colonisation des ébauches gonadiques. Nous nous limiterons à ce seul aspect en présentant, en première approximation, la loi d'inhibition par la dexaméthasone.

Cette loi a pour expression générale :

Intensité de migration = f (k.log concentration), avec $k < 0$

Cette loi est donc fondamentalement différente de celle selon laquelle la Concanavoline A agit. En effet, l'inhibition est une fonction logarithmique de la concentration en corticoïde tandis que cette même variable est une fonction exponentielle de la concentration en lectine. En particulier, précisons que le calcul permet de déterminer le seuil d'action de la dexaméthasone estimé à 10^{-12} M. Une concentration égale à 10^{-2} M inhibe totalement la migration de toutes les CGP, contrairement à ce qui caractérise la cinétique engendrée par la Con A. Nos résultats confirment que les deux inhibiteurs interviennent sur les motilités cellulaires en mettant en œuvre des mécanismes moléculaires différents. Une étude détaillée des effets de la dexaméthasone en fonction du stade de développement d'une part (paramètre temps) et des progrès de la somitogenèse d'autre part (paramètre différenciation) fera l'objet d'un article en préparation.

LISTE DES PUBLICATIONS

- (1) DUBOIS, R. et CUMINGE, D. (1984). La migration des cellules germinales chez l'embryon de Poulet. IV. Interprétation des données quantitatives et cinétiques obtenues par l'emploi d'inhibiteurs de la motilité cellulaire. *Arch. Biol.* (Bruxelles), 95, 347-410.
- (2) DUBOIS, R. et CUMINGE, D. Annuaire du Collège de France 1992-1993, pp. 417-420.
- (3) CUMINGE, D. et DUBOIS, R. (1974). Étude de la biosynthèse de complexes glycoprotéiques par les épithéliums germinatifs chez l'embryon de Poulet (sites d'incorporation et voies intra-cellulaires de migration du L-Fucose-³H). *Ann. Embryo. Morph.* 7 N°4, 315-333.
- (4) 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, 189-213.
- (5) DUBOIS, R. et CUMINGE, D. — Cf. (1) (1982). I. Aspects cinétiques de la colonisation des épithéliums germinatifs. *Arch. Biol.* (Bruxelles), 93, 185-242.
- (6) JAKUBOWICZ, S. (1978) Effets de la dexaméthasone sur la colonisation des ébauches gonadiques chez l'embryon de Poulet. DEA Université Paris VII.

ACTIVITÉS DIVERSES

Nicole LE DOUARIN

Conférences honorifiques :

1995 :

Plenary Lecture at the 2nd Corsica International Workshop on « Molecular and genetics determinants of glial and neuronal fate », Saint-Florent, Corse, France, Septembre 1995.

Plenary Lecture at the IDNA Neuroscience Program, Saint-Vincent, Italy, Septembre 1995.

Lecture at the Ambassade de France in Spain, Madrid, Spain, Octobre 1995.

Warner-Lambert Lecture at the 25th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego, California, USA, Novembre 1995.

Irving Konigsberg Lecture at the Department of Biology at the University of Virginia, Charlottesville, USA, Novembre 1995.

1996 :

Lecture at the Rockefeller University, New York, USA, Mai 1996.

Lecture at the ACFAS Congress, Montréal (Québec), Canada, Mai 1996.

Lecture at the Congress of the SFBD, Caen, France, Mai 1996.

Séminaires :

1995 :

- Séminaire à l'Istituto di Ricerca de Biologia Molecolare P. Angeletti de Rome, Italie, Invitation du Dr. J. Jiricny, le 23 Octobre.

- Séminaire au Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Roma « La Sapienza », Rome, Italie, Invitation du Pr. G. Tocco, le 25 Octobre.

- Séminaire « La nouvelle biologie du développement », Faculté de Médecine Necker Enfants Malades, Université Paris V, Invitation du Pr. Even, le 1er Décembre.

1996 :

- Séminaire au Wellcome/CRC Institute, University of Cambridge, Grande-Bretagne, Invitation du Pr. Gurdon, le 23 Janvier.

- Séminaire à la Rockefeller University, New York, USA, Invitation du Pr. Axel, le 10 Mai.

- Séminaire à l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (Québec), Canada, Invitation du Pr. Nemer, le 13 Mai.

- Séminaire à l'Institut de Génétique et Biologie moléculaire et cellulaire de Strasbourg, Invitation du Pr. Chambon, le 21 Mai.
- Séminaire à l'Institut de Biologie moléculaire et cellulaire de Strasbourg, Invitation du Pr. Hoffmann, le 22 Mai.
- Séminaire au Département de Neurobiologie de l'Université de Heidelberg, Allemagne, Invitation du Dr. A. Régnier-Vigouroux, le 25 Juin.
- Séminaire au Embo Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Invitation du Pr. F. Kafatos, le 26 Juin.

Activités d'enseignement :

1995 :

- Cours à l'Université de Naples, 26 et 27 Octobre.

Congrès :

1995 :

- Table Ronde Roussel Uclaf « Mechanisms of Morphogenesis », Versailles, 28 et 29 Septembre.
- Colloque de la Fondation Ipsen « Isolation, caractérisation et utilisation des cellules souches du SNC », Paris, le 18 Septembre.
- « Frontiers in Biology in the 21st Century » The Salk Institute for Biological Studies, San Diego, Californie, 7-9 Novembre.

1996 :

- Colloque Pasteur-Weizmann « Normal and Pathological Mechanisms in the Control of Development », Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, 15-18 Janvier.
- « Stem cells, Lineage, and Plasticity of the Differentiated State », Massachusetts General Hospital/Harvard, Charlestown, MA, USA, le 17 Mai.
- Meeting of the Working Group on Fœtal and Neonatal Hematopoiesis, Palais des Congrès, Paris, le 29 Mai.
- Conférence Jacques Monod « Bases moléculaires du développement du système nerveux chez les vertébrés », La Londe-Les-Maures, 10 au 14 Juin.

Direction de thèses :

1995 :

« Contribution à l'étude de récepteurs et de facteurs de croissance impliqués dans le développement du lignage mélanocytaire et du système pacemaker de l'intestin », Laure Lecoin, Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI.

« Le rôle de deux facteurs de croissance, stem cell factor et endothéline 3, sur la différenciation mélanocytaire chez l'embryon d'oiseau, Ronit Lahav, Thèse de Doctorat de l'Université Paris XIII.

« Étude du déterminisme de l'information de position le long de l'axe antéro-postérieur dans le tube neural de l'embryon d'oiseau », Anne Grapin-Botton, Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI.

Distinctions :

Membre du Comité Scientifique de l'UMR 9925 du CNRS.

Membre du Conseil Scientifique de l'Institut Fédératif de Recherches des Enfants Malades (IFREM).

Membre du Conseil d'Administration de l'Arc, 1996.

Membre du Conseil d'Administration de la Fondation des Treilles, 1996.

ACTIVITÉS DIVERSES

Catherine DULAC

Mlle Catherine DULAC, Maître de Conférences au Collège de France, effectue actuellement une mission temporaire chez le Pr Richard Axel au Howard Hughes Medical Institute à New York.

ACTIVITÉS DIVERSES

Anne-Hélène MONSORO-BURQ

Activités d'enseignement :

- DEA de Biologie moléculaire et cellulaire du développement (Paris 6) Septembre-Octobre 1995 : Séminaire : « Analyse de la morphogenèse du mésoderme paraxial chez l'embryon d'oiseau ».

Mise en place et encadrement de l'atelier d'embryologie « Développement embryonnaire de l'oiseau » 4-6 octobre et 18-20 octobre 1995.

- DEA de neurogénétique du développement (Montpellier II) 5 décembre 1995 (invitation du Pr C. Dambly-Chaudière) : Séminaire : « La polarisation dorso-ventrale du tube neural chez l'embryon d'oiseau ».

Encadrement de stage en laboratoire :

- Mlle E. Thimonier, stage de DEUG, juin 1996 : « Analyse de l'expression des gènes *Wnt 1* et *Wnt 3a* chez l'embryon précoce de Poulet, par hybridation *in toto*. »

Congrès et communications :

- 2ème Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, 15-18 mai 1995, communication affichée : « Hétérogénéité des mécanismes de formation de la vertèbre ».
- EDBC, Toulouse 9-13 juillet 1995, communication affichée : « Heterogeneity in vertebral formation along the dorso-ventral axis ».