

Embryologie cellulaire et moléculaire

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

Le cours de cette année a été délivré à l'étranger : à l'Institut Gulbenkian à Lisbonne (8 cours) et à l'University College à Londres (2 cours).

Les cours délivrés à l'Institut Gulbenkian ont porté sur le sujet suivant :

« Problèmes et concepts actuels en Biologie du Développement »

Après un rapide rappel historique des principales étapes qu'a connues cette discipline depuis la fin du XIX^e siècle, une mise au point a été développée concernant des questions sur lesquelles se concentrent les recherches actuelles : Les mécanismes moléculaires assurant la mise en place des axes de polarité de l'embryon. L'induction neurale. Les signaux moléculaires assurant la spécification des différents types de neurones. Enfin, un état des résultats récents concernant le développement de la crête neurale a été présenté.

Les deux cours délivrés à l'University College à Londres ont porté sur le rôle de la crête neurale dans la genèse des structures faciales d'une part et sur l'influence des organes axiaux, tube neural et notocorde sur le développement du mésoderme paraxial formant les muscles striés et la colonne vertébrale. Le rôle de la protéine sécrétée produite par le gène Sonic Hedgehog (shh) sur la survie et la différenciation des cellules somitiques mis en évidence dans notre laboratoire a été particulièrement discuté.

SÉMINAIRES

Les séminaires de la chaire d'Embryologie Cellulaire et Moléculaire et ceux de la chaire de Génétique Moléculaire ont été réunis en un Symposium qui s'est tenu à Strasbourg du 18 au 20 juin 1997. Les exposés ont porté sur les sujets suivants :

Andrew LUMSDEN, MRC, London, UK. Organisation du cerveau postérieur.

David WILKINSON, MRC, London, UK. Rôle des récepteurs aux EPH et des ephrines dans l'organisation du cerveau postérieur et de la crête neurale.

Anne GRAPIN-BOTTON, de l'Institut d'Embryologie, Nogent/Marne, France. Régulation de l'identité de position dans le cerveau postérieur et la crête neurale qui en dérive.

Filippo RIJLI, de l'IGBMC, Strasbourg, France. Rôle fonctionnel des gènes Hox dans l'organisation du cerveau postérieur.

Patrick CHARNAY, de l'École Normale Supérieure, Paris, France. Fonction des facteurs de transcription Krox-20 et Krox-24 dans le développement et la physiologie de l'adénohypophyse.

Siew Lan ANG, de l'IGBMC, Strasbourg, France. Facteurs de transcription impliqués dans la régionalisation du cerveau pendant l'embryogenèse de la souris.

Salvador MARTINEZ, de l'University of Murcia, Spain. Mécanismes moléculaires responsables de l'organisation du cerveau : rôle des inductions planaires dans la régionalisation du prosencéphale.

Michael BRAND, de Ruprecht-Karls-University Heidelberg, Germany. Formation de la frontière entre cerveau moyen et cerveau postérieur chez le poisson zèbre.

Steve WILSON, de Randall Institute, King's College, London, UK. Neurogenèse et organisation du cerveau antérieur chez l'embryon de poisson zèbre.

Uwe STRÄHLE, de l'IGBMC, Strasbourg, France. Organisation dorso-ventrale du tube neural du poisson zèbre.

Martin CATALA, de l'Institut d'Embryologie, Nogent/Marne, France. Organisation de la plaque neurale.

Anne-Hélène MONSORO-BURQ, de l'Institut d'Embryologie, Nogent/Marne, France. Rôle de la moelle épinière dorsale dans l'organisation dorso-ventrale de la vertèbre.

Philippe BRULET, de l'Institut Pasteur, Paris, France. Gènes Hox et identité des motoneurones.

Julian LEWIS, ICRF, London, UK. Prévention de l'uniformité : rôle des signaux Delta-Notch dans le développement neural et sensoriel des vertébrés.

François GUILLEMOT, de l'IGBMC, Strasbourg, France. Régulation de la neurogenèse chez la souris par des facteurs de transcription de type bHLH.

Jack PRICE, de SmithKline Beecham, Harlow, UK. Génération de la diversité cellulaire dans le cerveau antérieur.

Michael GERSHON, de Columbia University, New York, USA. Expression séquentielle de gènes et lignage au cours de la formation du système nerveux entérique.

Masashi YANAGISAWA, de Howard Hughes Medical Institute, Dallas, USA. L'endothéline dans le développement de la crête neurale.

Heiner WESTPHAL, NIH, NICND, Bethesda, USA. Fonction des gènes à homéoboîte de type Lim dans le développement du système nerveux central et de l'adénohypophyse.

Peter GRUSS, de Max Planck Institute, Goettingen, Germany. Les gènes Pax : régulateurs de l'organogénèse.

Cliff TABIN, de Harvard Medical School, Boston, USA. Les signaux organisateurs du membre des vertébrés.

INVITATION DE PROFESSEURS SUR UNE CHAIRE D'ÉTAT

Le Professeur Edward de ROBERTIS de l'Université de Californie à Los Angeles invité sur la chaire d'État en Février 1997 a donné des cours sur le sujet suivant :

« Génétique moléculaire de la gastrulation des vertébrés »

RÉSUMÉ DE L'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE

Les travaux de recherche effectués au cours de l'année académique 1996-1997 par le groupe que je dirige à l'Institut d'Embryologie Cellulaire et Moléculaire de Nogent-sur-Marne ont porté sur les sujets suivants :

- I. Le développement du système nerveux et des organes axiaux mésodermiques
- II. Hématopoïèse et angiogenèse embryonnaires précoces
- III. Développement de la fonction immunitaire

I. LE DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME NERVEUX ET DES ORGANES AXIAUX MÉSODERMIQUES

Chercheurs : G. Couly, C. Dulac, A. Grapin-Botton, A. Eichmann, C. Baker, M.-A. Teillet, R. Lahav, L. Lecoin, V. Nataf, H. Corbett-Etchevers, A. Burns, B. Ruhin, O. Pourquié, E. Hirsinger, I. Palmeirim, J. Michaud, A.H. Monsoro-Burq, Y. Watanabe, D. Duprez, C. Fournier-Thibault, P. Jeffs, L.M. Bourcheix

Ingénieurs de Recherche et Ingénieurs d'Étude : C. Ziller, E. Dupin, P. et M. Coltey, C. Bréant, F. Lapointe

ITA : M.A. Bonnin, D. Champeval, C. Glavieux, M. Le Thierry, C. Oudin, M. Bontoux, C. Vincent

Collaborations extérieures : A. Arcangeli (Université de Florence), M. Bronner-Fraser (California Institute of Technology), G. Gabella (University College, Londres), M. Yanagisawa (University of Texas), M. Olivotto (Université

de Florence), P. Francis-West (Guy's Hospital, Londres), P. Brickell (UCL, Londres), M. Tessier-Lavigne (Université de Californie)

Ces travaux prolongent ceux réalisés les années précédentes (voir rapport 1995-1996). Seuls seront évoqués les développements récents concernant cette thématique. Ils concernent notamment :

1. Le contrôle génétique du développement du cerveau postérieur et des crêtes neurales qui en dérivent

Nous avons entrepris d'étudier le rôle des gènes *Hox* et d'autres facteurs de transcription tels que *MafB/Kreisler* dans la mise en place des structures très complexes qui se développent dans la région faciale et hypobranchiale. L'ontogénèse de ces structures s'effectue en relation étroite avec celle du cerveau moyen et postérieur.

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, chez les Vertébrés, la plus sensible à l'induction par l'acide rétinoïque.

Le cerveau postérieur des Vertébrés 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 celles de l'expression des gènes *Hox* des 4 premiers groupes paralogues (*Hoxa, b, c, d -1 à -4*). Nous avons dans un premier temps établi le domaine d'expression de ces gènes chez l'embryon de poulet et de caille aussi bien dans le tube que dans la crête neurale qui en est issue.

a) L'expression des gènes *Hox* des Vertébrés est soumise à une régulation provenant de l'environnement

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 de 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 au niveau du rhombomère 8 (r8). Ces capacités d'induction et de compétence sont maintenues au moins jusqu'au stade de 26 somites.

Nous mettons ainsi en évidence l'effet d'un facteur postériorisant régulant l'expression des gènes *Hox* dans le tube neural.

L'adoption par les rhombomères antérieurs (e.g. r4/5) du « code *Hox* » du rhombomère 8 entraîne une transformation homéotique parfaite des centres nerveux générés par les rhombomères transplantés. Nous démontrons de plus que ce signal est transmis sous la forme d'un gradient postéro-antérieur via le neuroépithélium et le mésoderme paraxial.

*b) Limites antérieures de la capacité d'induction des gènes *Hox**

Une étude systématique de la capacité d'induction des gènes *Hox* le long du névraxe a été entreprise sur la base de transpositions antéropostérieures de fragments définis du neuroépithélium à différents niveaux du rhombencéphale.

Nous démontrons que bien que les régions r2 à r6 expriment les gènes des groupes paralogues 1, 2 et 3 elles ne possèdent pas la capacité d'induire ces gènes dans des territoires plus antérieurs (e.g. prosencéphale, mésencéphale et r1). Ceux-ci sont aptes à exprimer ces gènes s'ils sont transposés au niveau de r7 ou plus postérieurement mais non s'ils sont transposés entre r2 et r7. Nous interprétons ce résultat en invoquant une insuffisance du facteur inducteur au niveau considéré.

Il est bien établi que les gènes *Hox* ne sont pas exprimés dans les territoires pro- et mésencéphaliques. Si ceux-ci sont transplantés au-delà du rhombomère 7 ils sont induits à exprimer les gènes des 4 premiers groupes paralogues. Ceci cependant n'abolit pas dans ces cellules l'expression constitutive de gènes tels que *OTX1*, 2 ou *engrailed*, autres gènes à homéobox d'un type autre que le type *Antennapedia* caractéristique des gènes *Hox*.

La coexistence dans les mêmes cellules de ces facteurs de transcription qui normalement sont exprimés à des niveaux différents de l'épithélium neural aboutit à l'expression de phénotypes anormaux et non à des transformations homéotiques telles que celles qu'on observe dans les transplantations intrarhombencéphaliques.

Le dernier point mis en lumière dans cette étude est que le névraxe peut être partagé en grandes régions en ce qui concerne la capacité des cellules neuroépithéliales à exprimer les gènes *Hox*. Ainsi, la transplantation de rhombomères dans la moelle épinière troncale résulte dans l'expression de gènes *Hox* postérieurs. Cependant ceci ne peut se produire que jusqu'aux gènes du groupe paralogue 9

exclu. Il existe donc au moins 3 régions identifiées dans le névraxe : une première allant du prosencéphale au r1 inclus où aucun gène *Hox* n'est exprimé mais où la capacité de le faire existe ; une région allant de r2 à la limite antérieure d'expression de *Hoxa, b, c, d -9* à l'intérieur de laquelle on peut obtenir la postériorisation du code *Hox*, c'est-à-dire que des régions antérieures peuvent adopter le code *Hox* correspondant à la région où elles sont transposées, et une région postérieure où les régulations des gènes *Hox* obéissent au moins partiellement à des mécanismes différents de ceux qui sont en œuvre plus rostralement.

c) Régulation de l'expression du facteur de transcription *MafB/Kreisler* et son rôle dans le développement du rhombencéphale et des crêtes neurales qui en dérivent

Ce gène fut découvert par mutagenèse provoquée par les rayons X chez la souris. Le mutant obtenu résulte d'une inversion chromosomique discrète (non discernable au microscope) qui laisse la région codante et 30kb intacts en 5'. Son phénotype est caractérisé par des anomalies comportementales liées à des malformations de l'oreille (surdité et comportement moteur anormal). Cette mutation appelée *Kreisler* affecte un gène codant pour un facteur de transcription de la famille des « basic-leucine zipper » *Maf*, appelé pour cette raison *MafB/kr*.

Nous avons réalisé une étude de l'expression normale du gène *MafB/kr* chez l'embryon d'oiseau et montré qu'il est activé transitoirement dans r5, r6 et les crêtes neurales correspondantes qui migrent de part et d'autre de la placode otique. Nous avons aussi trouvé que ce gène est exprimé dans le rein, le périchondre, dans les cellules hématopoïétiques et dans les noyaux vestibulo-acoustiques du bulbe et les motoneurones. Dans les souris mutantes *kr/kr* les r5 et r6 sont absents, ce qui explique les anomalies profondes observées au niveau de l'oreille. Par contre les autres sites d'expression de *MafB/kr* chez les mutants ne sont pas affectés. Il apparaît donc que la mutation *Kreisler* est strictement limitée aux rhombomères 5 et 6 et aux crêtes neurales qui en dérivent. La mutation nulle du gène devrait donc présenter un phénotype différent.

Nous avons d'autre part cherché quel pouvait être l'effet sur l'expression de *MafB/kr* de la postériorisation des r5 et r6 lorsqu'ils sont transplantés en r8. Ceci est d'autant plus important que nous savons que cette transposition induit à la fois un changement du « code *Hox* » de r5/6 en r8 et une transformation homéotique parfaite du phénotype de r5/6 en r8. En fait, cette transposition r5/6 vers r8 aboutit à l'extinction complète de *MafB/kr*. Par contre la transposition rostrale de r5/r6 en r3/r4 ne modifie pas l'expression du gène. Ces expériences montrent donc que l'expression de *MafB/kr* dépend de signaux émanant de l'environnement comme c'est le cas pour les gènes *Hox*. Ces signaux peuvent être transmis par la greffe de somites postérieurs au contact des r5/r6. Dans ce cas, comme dans la transposition postérieure de r5/r6 le gène *MafB/kr* s'éteint.

Le même résultat peut être obtenu avec des billes de résine anionique imprégnées d'acide rétinoïque (AR). Ainsi, de telles billes insérées au contact des r5 et r6 inhibent l'expression du gène. Il est intéressant de constater d'ailleurs que ces billes de même que les somites ont l'effet inverse sur des rhombomères plus antérieurs. Ainsi r4 peut être induit à exprimer le gène *kr* par la greffe de somites ou l'insertion de billes imprégnées d'acide rétinoïque (AR). Il semble donc que l'induction de ce gène dans les rhombomères répond à une dose précise de signal inducteur et que l'AR peut mimer l'effet du signal physiologique.

Nous émettons l'hypothèse que ce signal est distribué le long du névraxe selon un gradient tel que sa concentration est trop faible en r4 et trop forte en r7-r8 pour en induire l'expression.

2. Les capacités de régénération et le contrôle génétique du développement de la crête neurale céphalique

Les capacités de la crête neurale de régénérer après qu'elle ait été excisée aux stades précédant l'émigration des cellules qui la constituent ont été démontrées à maintes reprises. Plusieurs articles du groupe de M. Bronner-Fraser et de P. Thorogood avaient récemment attribué cette régénération à la respcification d'une crête neurale à partir du tube neural sous-jacent à l'excision. En utilisant le marqueur caille-poulet, nous avons montré que cette interprétation est erronée. En fait, la crête neurale située rostralement et caudalement par rapport à l'excision est responsable de la régénération. Ceci implique que les cellules situées de part et d'autre de la blessure prolifèrent plus que normalement et qu'elles migrent non pas transversalement comme dans le développement normal mais aussi longitudinalement le long du névraxe.

Le problème se pose de savoir si elles conservent leur code *Hox* d'origine lorsqu'elles se trouvent ainsi dans un arc branchial situé rostralement ou caudalement par rapport à leur origine.

Nous avons pu montrer que les cellules de crête neurale conservent le code *Hox* correspondant à leur niveau d'origine. Nous étudions en ce moment les répercussions de ces phénomènes sur le phénotype des structures branchiales qui dérivent des crêtes neurales régénérées.

Ces travaux nous amènent à rechercher la nature du signal inducteur postériorisant que l'on peut assimiler au « transforming signal » de Nieuwkoop (1952). Les candidats sont l'AR dont on sait qu'il intervient dans la régulation des gènes *Hox* ainsi que les FGF et les Wnts dont l'effet postériorisant a été démontré dans le développement des Amphibiens.

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 migrent les cellules de la crête neurale destinées à fournir le système nerveux périphérique influence d'une manière décisive leur différenciation. 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 en leur permettant ou non de survivre. Nous avons donc cherché à répondre aux questions suivantes :

1. Les cellules émanant du névraxe sont-elles équivalentes au début et à la fin du processus migratoire ?
2. 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 ?
3. 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.

3.1. Comparaison des potentialités de différenciation des cellules de crête neurale au cours du processus migratoire

La crête neurale est caractérisée par le fait qu'à partir d'un point donné du tube nerveux, les cellules qui la composent s'individualisent progressivement et donnent naissance à plusieurs types de dérivés qui se localisent dans différents sites de l'embryon. La question se pose de savoir si les cellules qui migrent à différents temps sont équivalentes et donc multipotentielles ou si, au contraire, elles sont déjà déterminées et, dans l'un ou l'autre cas, quel est le rôle de l'environnement tissulaire dans d'éventuels mécanismes de détermination ou de sélection.

Chez l'embryon d'oiseau, le tube neural se ferme tout d'abord au niveau mésencéphalique et c'est à ce niveau que les premières cellules de crête neurale apparaissent au stade de 6 paires de somites sous la forme d'une frange de cellules au bord dorso-latéral du tube nerveux. Cette frange de cellules s'étend ensuite de plus en plus latéralement sous l'ectoderme de revêtement formant ce qu'on a appelé la « crête migrée ». Celle-ci comme il est précisé plus loin a déjà fait l'objet d'études approfondies en cultures *in vitro*, y compris en cultures clonales. Ce mode de migration de la crête neurale mésencéphalique offre la possibilité de distinguer les cellules qui migrent précocément de celles qui migrent tardivement. En effet, au stade de 6 somites le tube nerveux est flanqué des cellules migrant précocément alors qu'à 12 somites les cellules migrant tardive-

ment sont celles qui sont encore proches de la partie dorsale du tube nerveux. Nous avons profité de cette particularité pour poser le problème de l'apparition des différents lignages cellulaires à l'intérieur des crêtes neurales mésencéphaliques en terme de temps.

Par des greffes orthotopiques et orthochroniques entre embryons de caille et de poulet *in ovo* nous montrons que, dans le développement normal, les crêtes neurales tardives comme les crêtes neurales précoces fournissent tous les types de dérivés connus : mélanocytes, neurones et glie ainsi que cartilage, os et tissu conjonctif. Les dérivés des crêtes neurales migrant précocément sont trouvés à la fois dans des sites ventraux et dorsaux alors que les dérivés des crêtes neurales migrant plus tardivement sont cantonnés dans les régions dorsales. Toutefois, si la crête neurale précoce a été excisée sans remplacement, la crête neurale tardive même greffée tardivement envahit tous les sites ventraux et dorsaux occupés normalement par la crête neurale mésencéphalique dans son ensemble. Des crêtes neurales tardives greffées à la place de crêtes neurales précoces fournissent des dérivés dorsaux et ventraux et inversement des crêtes neurales précoces greffées à la place de crêtes neurales tardives ne donnent naissance qu'à des dérivés dorsaux. Ces expériences montrent que la population de cellules de crêtes neurales qui émigrent tardivement de l'ébauche neurale mésencéphalique a les mêmes capacités de migration et de différenciation que celles qui émigrent précocément. Dans le développement normal elles donnent les mêmes types de dérivés mais ceux-ci sont disposés différemment du fait de l'occupation préalable de certains sites par des cellules ayant migré plus précocément.

En conclusion, ces expériences portant sur des populations de quelques dizaines de cellules confirment la pluripotentialité des cellules de crête neurale en début de migration et confirment le rôle prépondérant de l'environnement dans l'organisation des dérivés de la crête neurale.

3.2. La détermination des cellules de la crête neurale testée en culture clonale

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'agrègent pour former des ganglions du système nerveux périphérique (SNP).

Nous avons 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 (mésécotoderme, 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. 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.

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 des ganglions rachidiens juste formés ou du mésoderme intestinal lorsqu'elles effectuent la colonisation de l'intestin. La séparation des cellules de crête de celles des mésenchymes somitique ou intestinal est obtenue par tri au moyen d'un FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) grâce à leur affinité pour l'anticorps HNK1.

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.

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.

Cette étude montre de plus que des précurseurs de cellules adrénériques 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 adrénérique *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 poten-

tialités 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 : i) La mise au point de marqueurs moléculaires destinés à étudier plus précisément la nature des dérivés de la crête neurale. Nous avons préparé une batterie d'anticorps monoclonaux qui reconnaissent des antigènes spécifiques de divers dérivés de la crête neurale. Ceux-ci ont été cruciaux dans notre étude de la ségrégation des lignées cellulaires à partir de cette structure¹ ; ii) Nos travaux récents sont consacrés à la recherche *in vivo* et en culture des facteurs susceptibles d'influencer le devenir des cellules de la crête neurale.

3.3. Les facteurs qui influencent la différenciation des cellules de la crête neurale

Une manière efficace de mettre en évidence de tels facteurs est d'étudier des mutations qui, chez la souris, affectent des dérivés de la crête neurale lorsque les gènes impliqués ont été identifiés. Tel est le cas des mutations Steel (*sl*) et dominant White Spotting (*W*) correspondant respectivement aux gènes codant pour le Steel Factor et pour son récepteur c-kit (*W*) d'une part et des mutations de Piebald lethal (*S^l*) et lethal spotted (*ls*). Ces deux séries de mutations affectent les mélanocytes et aussi pour *S^l* et *ls* l'innervation intestinale.

a) Le système c-kit/steel et le développement des mélanoblastes et des cellules interstitielles de Cajal

— Le rôle du système *c-kit/steel* a fait l'objet d'une étude approfondie menée *in vivo* et *in vitro*.

Il est apparu que le récepteur c-kit n'est exprimé sur les mélanoblastes que lorsque ceux-ci sont déjà bien engagés dans la différenciation mélanocytaire (à E4 chez la caille).

Le facteur Steel (SCF pour Steel Cell Factor) ajouté à un milieu de culture de crête neurale augmente faiblement la prolifération de ces cellules, significativement leur survie et nettement leur capacité à se différencier en mélanocytes.

1. Barbu M., Ziller C., Rong P.M. and Le Douarin N., 1986. *J. Neurosci.*, 6, 2215-2225.

Dulac C., Cameron-Curry P., Ziller C. and Le Douarin N., 1988. *Neuron*, 1, 211-220.

Dulac C., Tropak M.B., Cameron-Curry P., Rossier J., Marshak D.R., Roder J. and Le Douarin N., 1992. *Neuron*, 8, 323-334.

Fauquet M. and Ziller C., 1989. *J. Histochem. Cytochem.*, 37, 151-162.

Pourquié O., Corbel C., Le Caer J.P., Rossier J. and Le Douarin N., 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5261-5265.

Nataf V., Mercier P., Ziller C. and Le Douarin N., 1993. *Exp. Cell Res.*, 207, 171-182.

A part le ganglion rachidien dont les cellules expriment transitoirement *c-kit*, la lignée mélanocytaire est le seul dérivé de la crête neurale à dépendre du SCF pour sa survie et sa différenciation.

— Les cellules interstitielles de Cajal sont associées aux plexus neuraux du tube digestif où elles jouent un rôle essentiel sur le péristaltisme. Elles expriment le gène *c-kit*. Leur origine était controversée : pour certains elles étaient considérées comme dérivées de la crête neurale alors que pour d'autres elles présentaient une origine fibroblastique. Par des transplantations caille-poulet combinées avec la mise en évidence des transcrits de *c-kit*, nous avons montré que ces cellules sont en fait d'origine mésodermique. Elles proviennent de la splanchnopleure et non de la crête neurale.

b) Les endothélines et leurs récepteurs

Les endothélines (EDN) sont des peptides de 21 acides aminés particulièrement conservés et agissant par liaison à des récepteurs cellulaires heptahélicoïdaux couplés aux protéines G. Chez les mammifères, 3 gènes (*EDN1*, *EDN2* et *EDN3*) ont été identifiés. Deux types de récepteurs à l'endothéline, *EDNRA* et *EDNRB* ont été clonés chez les mammifères. Ces récepteurs présentent des affinités différentes pour les 3 endothélines. Ainsi, l'affinité de *EDNRA* pour *EDN3* est très faible alors que *EDNRB* lie les 3 endothélines avec la même affinité.

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 sont beaucoup plus étendus. Les endothélines sont également impliquées au cours du développement embryonnaire. Le rôle de cette famille de molécules dans l'ontogenèse de la crête neurale a été montré pour la première fois sur le développement des dérivés mésenchymateux craniofaciaux. En effet, la mutation ciblée du gène de *EDN1* entraîne chez les souris homozygotes des anomalies des dérivés des arcs branchiaux tels qu'une hypoplasie de la mandibule et une absence d'os hyoïde ainsi qu'une hypoplasie de la thyroïde et du thymus. Un phénotype analogue est obtenu par inactivation ciblée de *EDNRA* (Yanagisawa, communication personnelle). Actuellement, de nombreuses données montrent que *EDN3* et le récepteur *EDNRB* sont impliqués dans le développement de deux autres lignages issus de la crête neurale (CN) : les mélanocytes et le système nerveux entérique. Chez les souris mutantes *piebald-lethal* (*Sl*) et *lethal spotted* (*ls*) qui sont des modèles d'études pour la maladie de Hirschsprung associée à une anomalie de la pigmentation, des mutations de *EDNRB* et de *EDN3* ont été respectivement mises en évidence. Par ailleurs, un phénotype semblable à celui des souris *Sl* et *ls* a été obtenu chez les souris homozygotes par inactivation ciblée des gènes *EDNRB* et *EDN3*. Parallèlement, chez l'homme, des mutations homozygotes de *EDNRB* et de *EDN3* ont été identifiées chez des patients atteints de maladie de Hirschsprung associée au syndrome de Waardenburg. Ces faits montrent donc que les endothélines sont

essentielles au développement normal de la CN et qu'elles sont impliquées dans certaines pathologies de ses dérivés. Toutefois ces données n'expliquent pas comment s'exerce l'interaction des endothélines et de leurs récepteurs sur le développement de la CN. Nous avons entrepris des recherches sur cette question dans le modèle aviaire.

Notre étude comporte 3 aspects :

- 1 — Clonage des gènes de l'endothéline et de ses récepteurs et étude de leur expression au cours du développement embryonnaire.
- 2 — Étude fonctionnelle *in vivo* et *in vitro*.
- 3 — Effet de l'endothéline en culture *in vitro*.

— *Clonage et patron d'expression d'EDNRB chez l'embryon d'oiseau*

Nous avons procédé au clonage de l'homologue aviaire du récepteur EDNRB de mammifère. Ceci nous a permis d'établir le patron d'expression de ce récepteur par hybridation *in situ* chez les embryons de caille et de poulet.

Par hybridation *in situ* sur coupes et *in toto*, nous avons montré qu'EDNRB est exprimé très tôt par les CN tout le long du névraxe, dès avant le début de la migration, à 1 jour 1/2 d'incubation. Les cellules de CN expriment donc EDNRB bien avant d'acquérir le récepteur c-kit, qui apparaît à 4 jours. EDNRB est ensuite exprimé pendant la migration et enfin par le système nerveux périphérique et entérique. Par contre, les mélanoblastes en migration et les mélanocytes n'expriment pas EDNRB.

Il semble donc que les deux systèmes récepteur-ligand, c-kit/SCF et EDNRB/EDN3, interviennent à des stades embryonnaires différents.

— *Effet d'EDN3 en culture*

Des cellules de CN troncale de caille, obtenues à partir de tubes neuraux prélevés à 2 jours d'incubation et explantés *in vitro*, réagissent de manière spectaculaire à l'addition d'EDN3 humaine dans le milieu de culture. Nous observons d'abord un effet prolifératif intense associé à des modifications morphologiques. Puis la plupart des cellules se différencient en mélanocytes qui tendent à se grouper et à former un patron pigmentaire caractéristique et reproductible. L'action mitogène d'EDN3 ne s'exerce pas que sur les précurseurs des mélanocytes, mais également sur des cellules pluripotentes capables de donner naissance à d'autres dérivés, notamment neuraux : en effet, cellules de Schwann et neurones sont stimulés par EDN3 en culture dans des conditions favorisant la différenciation neurale. Ces données ouvrent la voie à une étude en cultures clonales destinée à identifier les potentialités des cellules de CN cibles d'EDN3. Nous utilisons la méthode de clonage cellulaire mise au point au laboratoire et

qui a révélé la coexistence dans la CN de précurseurs pluripotents, bipotents et déterminés².

L'expression précoce d'EDNRB et tardive de c-kit d'une part, l'effet prolifératif important d'EDN3 sur les cellules de CN d'autre part, alors que SCF agit sur leur survie et sur la différenciation mélanocytaire, suggèrent que le couple EDNRB/EDN3 est nécessaire à l'expansion de la population des précurseurs pluripotents de la CN, tandis que c-kit/SCF intervient plus tard pour assurer la survie des mélanoblastes et leur différenciation terminale.

— *Identification d'un nouveau récepteur à EDN3 chez la caille, EDNRB2 exprimé par la lignée mélanocytaire*

Il est paradoxal que les mélanoblastes et les mélanocytes de la peau n'expriment pas *EDNRB* chez l'embryon d'oiseau, alors que chez la souris, la mutation du gène affecte principalement, outre l'innervation intestinale, le lignage mélanocytaire, et que dans nos expériences *in vitro*, EDN3 exerce une action proliférative puissante non seulement sur les mélanoblastes de la CN mais aussi sur ceux de l'épiderme d'embryon de caille de 6 jours (Dupin, en préparation). Ces cellules possèdent-elles un récepteur à EDN3 d'un autre type ?

Par RT-PCR, en amplifiant un fragment d'ADN-c obtenu à partir d'ARN de mélanocytes de caille cultivés en présence d'EDN3, nous avons en effet isolé un nouveau récepteur, EDNRB2, qui présente une homologie de 83 % en acides aminés avec EDNRB de caille. Par hybridation *in situ*, nous avons montré que ce récepteur, contrairement à EDNRB, est bien exprimé par les mélanoblastes en migration et par les mélanocytes de la peau.

Il existe donc chez l'oiseau deux récepteurs à EDN3, appartenant chacun à une sous-population différente de cellules de CN : EDNRB est exprimé d'abord par les cellules de CN avant qu'elles ne commencent à migrer, puis par celles qui empruntent la voie ventrale de migration et enfin par les dérivés neuraux de la CN. EDNRB2 est exprimé plus tard par les cellules de la voie dorso-latérale et son expression est limitée aux mélanoblastes/cytes.

Notre hypothèse de travail est qu'au début de la migration, l'action d'EDN3, médiée par EDNRB, s'exerce sur les précurseurs pluripotents de la CN, capables de donner des neurones, de la glie et des mélanocytes, dont la survie et la prolifération sont stimulées. Ensuite, les précurseurs des mélanocytes, issus des cellules pluripotentes, commencent à exprimer EDNRB2, par l'intermédiaire duquel l'effet mitogène d'EDN3 continue à s'exercer à la fois sur les mélanoblastes et les mélanocytes différenciés. Nous examinons actuellement cette hypothèse en réalisant des cultures de masse et des cultures clonales de cellules de CN troncale de caille en présence d'EDN3 et en étudiant par hybridation *in situ*

2. Baroffio A., Dupin E. and Le Douarin N., 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5325-5329.
Baroffio A., Dupin E. and Le Douarin N., 1991 Development, 112, 301-305.

l'expression des deux récepteurs par les différents types cellulaires aux différentes étapes de leur évolution *in vitro*.

Nous avons d'autre part entrepris une étude pharmacologique du récepteur EDNRB2 en collaboration avec l'équipe du Pr. Yanagisawa (The University of Texas South Western Medical Center at Dallas) pour la caractérisation pharmacologique de la liaison de ce récepteur aux endothélines et à leurs principaux agonistes et antagonistes. D'ores et déjà, les premiers résultats indiquent que ce récepteur lie de façon équivalente EDN1 et EDN3, ce qui est caractéristique du type B. Des particularités inédites de liaison de ce récepteur avec un antagoniste classique des endothélines ont été décelées.

Pour la première fois, deux sous-types de récepteurs B ont été identifiés et clonés dans la même espèce. Différents arguments pharmacologiques ont laissé supposer, chez le rat par exemple, qu'il pouvait exister différents sous-types de récepteur B, mais seule notre étude en apporte pour l'instant la preuve moléculaire chez l'oiseau.

— *EDNRB/EDN3 et le système nerveux entérique*

Nous avons vu que les gènes d'EDN3 et d'EDNRB sont impliqués dans le développement des plexus nerveux entériques : leur mutation spontanée ou ciblée entraîne l'absence d'innervation de la région distale du tube digestif (mégacolon ou maladie de Hirschsprung chez l'homme).

Les neurones et la glie du système nerveux entérique (SNE) dérivent essentiellement de la CN vagale, située au niveau des sept premiers somites rostraux. La colonisation du tube digestif par les cellules de la CN vagale s'effectue progressivement en direction rostro-caudale. Il est vraisemblable que la migration des cellules de CN et leur installation dans la paroi du tube digestif fassent intervenir des interactions récepteurs-ligands, en particulier EDNRB-EDN3. Il est intéressant de noter que le gène d'EDN3 est exprimé dans la paroi intestinale dès un stade précoce de développement, comme nous l'avons mis en évidence par hybridation *in situ*.

Nos résultats ainsi que le fait que la mutation nulle de EDNRB ou de EDN3 résulte dans l'absence d'innervation distale de l'intestin nous amènent à formuler l'hypothèse qu'EDN3 pourrait exercer un rôle chimiotactique sur les précurseurs neuraux entériques. Notre approche pour étudier ce problème est de réaliser des associations en culture organotypique et en greffe chorio-allantoïdienne entre cellules aviaires exprimant le récepteur EDNRB (ganglions du système nerveux périphérique dérivés de la CN) et intestins embryonnaires de souris mutantes pour EDNRB (*s*¹) ou pour EDN3 (*ls*). Les cellules EDNRB positives de caille devraient pouvoir coloniser l'intestin de type *s*¹, dépourvu du récepteur mais possédant le ligand, mais non celui de type *ls*, dont le ligand EDN3 d'EDNRB est absent.

Nous examinons également par hybridation *in situ* l'expression d'EDNRB et d'EDNRB2 par les cellules de CN vagale de caille, à partir de leur émergence

du tube neural, puis en culture, en présence ou non d'EDN3, ainsi que leur réponse à ce facteur *in vitro*. Des résultats préliminaires indiquent que la CN vagale ne réagit pas à l'EDN3 comme la CN troncale en culture, par une prolifération accrue. Nous cherchons à savoir à quel moment pourrait avoir lieu l'expansion, sous l'influence d'EDN3, de la population des précurseurs entériques responsables de la colonisation de l'intestin jusqu'à son extrémité distale.

D'autre part, en collaboration avec M. Yanagisawa et son équipe (The University of Texas South Western Medical Center at Dallas), qui ont cloné les ADN-c d'EDN3 et d'EDNRA, le gène du récepteur à l'endothéline 1 (EDN1), nous chercherons d'une part à déterminer où et quand au cours du développement le ligand EDN3 est disponible pour les cellules dérivées de la CN qui expriment le(s) récepteur(s) EDNRB/B2 ; d'autre part nous centrerons l'étude de l'expression d'EDNRA sur les dérivés céphaliques de la CN, puisqu'il a été montré chez la souris que les mutations ciblées des gènes d'EDN1 et d'EDNRA produisent des anomalies cranio-faciales.

Enfin, l'analyse de l'expression d'EDN3 et de ses récepteurs sera complétée par une étude fonctionnelle *in vivo* du rôle de ces molécules visant à amplifier l'effet de EDN3 sur le développement de crête neurale. Nous appliquerons la stratégie des vecteurs rétroviraux qui a déjà été utilisée au laboratoire pour l'étude fonctionnelle du rôle des « Bone Morphogenetic Proteins » dans la spécification du mésoderme. Nous utiliserons des vecteurs réplicatifs dérivés du Sarcome de Rous (RCAS) dans lesquels le cDNA de EDN3 de poulet sera inséré.

Des fibroblastes de poulet infectés seront récupérés sous forme de culot cellulaire afin d'être greffés dans l'embryon dans des sites variés, en particulier sous l'ectoderme et à proximité du tube neural. Les embryons obtenus après infection rétrovirale seront analysés histologiquement. Les cellules de la crête neurale en migration ou ayant achevé leur processus de différenciation seront détectées par des marqueurs immunocytochimiques.

Cette approche devrait permettre la production ectopique ou la « surproduction » de EDN3 *in vivo* par les cellules situées au voisinage des cellules de CN ou par les cellules de la crête neurale elles-mêmes. Le ligand EDN3 sera donc directement disponible en grande quantité et de façon continue pour les cellules de la crête neurale qui expriment le récepteur EDNRB. Cette approche devrait donc être très appropriée pour amplifier une action autocrine/paracrine de EDN3.

4. 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 est actuellement le sujet d'une contro-

verse. La floor plate est considérée par certains³ 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 infirment 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 : depuis l'adénohypophyse jusqu'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. Nous venons de démontrer de plus que le facteur de transcription HNF3 β apparaît simultanément dans la totalité des cellules du nœud de Hensen destinées à fournir à la fois la floor plate et la notocorde. L'interprétation selon laquelle l'expression de HNF3 β dans la floor plate est le résultat d'une induction par la notocorde⁴ nous paraît donc erronée. Ces résultats modifient d'une manière notable les notions classiques que l'on a sur la neurulation chez les vertébrés supérieurs.

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

Nos travaux antérieurs sur le développement du mésoderme

Nous avons étudié le rôle des **organes axiaux** (notocorde et tube nerveux) sur la différenciation des somites et montré que ces structures produisent un facteur responsable de l'induction du sclérotome et du cartilage vertébral⁵. En l'absence du tube nerveux et de la corde la totalité des cellules somitiques entre en apoptose et disparaît⁶.

Nous avons observé que la partie dorsale du somite responsable de la fermeture de l'arc neural fait intervenir un système génétique particulier. Le mésenchyme sclérotomal migre dorsalement par rapport au tube nerveux pour constituer l'apophyse épineuse puis exprime les gènes *Msx1*, *Msx2* et *BMP4*. C'est également le cas de l'ectoderme superficiel à ce niveau et de la plaque du toit ou **roof plate**. Par diverses manipulations on peut inhiber l'expression de ces gènes. Dans ce cas, l'apophyse épineuse ne se forme pas. On remarque de plus que la différenciation du squelette superficiel de la tête (originaire du méssectoderme) exprime le même complexe génique *Msx1/Msx2/BMP4*. Nous avons donc émis l'hypothèse

3. Tanabé Y. and Jessel T.M. 1996. *Science*, 274, 1115-1123.

4. Ruiz i Altaba A., Prezioso V.R., Darnell J.E., Jessell T.M. 1993. *Mech. Dev.*, 44, 91-108.

Ruiz i Altaba A., Placzek M., Baldassare M., Dodd J., Jessell T.M. 1995. *Dev. Biol.*, 170, 299-313.

5. Pourquié O., Coltey M., Teillet M.A., Ordahl C. and Le Douarin N., 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 5242-5246.

6. Teillet M.-A. and Le Douarin N., 1983. *Dev. Biol.*, 98, 192-211.

Rong P.M., Teillet M.-A., Ziller C. and Le Douarin N., 1992. *Development*, 115, 667-672.

que ces gènes interviennent pour former les os de type dermique ou cartilagineux situés en position sous ectodermique⁷.

Nos travaux récents ont consisté :

1) à étudier les mécanismes qui président à l'établissement des axes de polarité dorsoventrale et médiolatérale du somite et des structures qui en dérivent,

2) à tenter de mettre en évidence la cascade d'évènements moléculaires intervenant dans la différenciation des structures squelettiques et musculaires issues du somite,

3) à déterminer les mécanismes qui président à l'établissement de la polarité dorsoventrale de l'ébauche alaire,

4) à élucider quels sont les facteurs impliqués dans le développement de la musculature du bourgeon d'aile.

6. La polarité médiolatérale et dorsoventrale du mésoderme paraxial somitique

6.1. Deux facteurs émanant respectivement du tube neural et de la lame latérale sont responsables de la spécification médiolatérale du somite

La musculature striée du tronc des vertébrés se compose d'un groupe de muscles épaxiaux associés à la colonne vertébrale originaire 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 somite⁸. 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. 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* constitue un marqueur spécifique et précoce du compartiment latéral des somites qui possède aussi la caractéristique d'exprimer le gène *Pax3* plus longtemps que le reste du dermomyotome.

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* (deux facteurs de transcription de la famille bHLH marquant l'engagement des cellules dans la voie de la différenciation musculaire) 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

7. Takahashi Y. and Le Douarin N., 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 7482-7486.

Takahashi Y., Bontoux M. and Le Douarin N., 1991. EMBO J., 10, 2387-2393.

Takahashi Y., Monsoro-Burq A.H., Bontoux M. and Le Douarin N., 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10237-10247.

8. Ordahl C.P. and Le Douarin N., 1992. Development, 114, 339-353.

du somite. Nous avons recherché parmi les facteurs de croissance connus d'éventuels candidats pour ces deux activités. 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*. La nature du facteur responsable de l'effet dorsalisant émanant du tube neural est encore inconnue.

Nous recherchons la nature du facteur issu du tube neural dorsal responsable de l'induction des facteurs myogéniques.

Le facteur présent au niveau du tube neural responsable de l'induction des facteurs myogéniques est probablement un facteur appartenant à la famille des WNTs. Récemment, a été identifiée une nouvelle molécule sécrétée nommée Frzb dont une partie de la séquence est identique à celle du site de fixation des WNTs du récepteur Frizzled. Chez le xénope, la surexpression de Frzb conduit à antagoniser les effets de WNTs endogènes sur la formation des dérivés mésodermiques.

La séquence codante de ce nouveau facteur, Frzb, sera insérée dans le rétrovirus RCAS. Des cellules produisant la construction recombinante Frzb/RCAS seront greffées dans l'embryon et l'analyse de l'activation des WNTs au cours de la formation du somite sera réalisée. Les interactions moléculaires entre shh et les WNTs seront étudiées, en surexprimant de manière simultanée shh et Frzb, les conséquences de l'effet de SHH sur le somite seront analysées en l'absence de la voie de signalisation des WNTs.

6.2. La notocorde et la floor plate produisent un facteur de survie essentiel au développement du somite. Quelle en est la nature ?

Comme nous l'avons montré précédemment, le mésenchyme somitique entre en apoptose lorsqu'il est soustrait *in vivo* à un ou des facteurs issus de la notocorde et du tube neural. Nous avons mis en évidence par des greffes appropriées que dans le tube nerveux la floor plate seule est responsable de l'effet observé.

Sachant que la floor plate et la notocorde ont en commun de sécréter diverses protéines, nous avons entrepris d'en tester l'action sur ce système. Le principe est de remplacer ces structures par des cellules rendues sécrétrices de l'une ou l'autre de ces substances par transfection avec des constructions géniques adéquates. Nous avons utilisé deux techniques de surexpression : une technique faisant intervenir le rétrovirus aviaire compétent pour la réplication RCAS (BP).

Le rétrovirus RCAS possède toutes les séquences nécessaires pour sa réplication et peut donc se propager de cellules en cellules dans des embryons sensibles à

ce type de virus. Il existe des souches d'embryon de poulet possédant une panoplie de virus endogènes et donc résistantes à l'invasion par le virus RCAS. Nous utilisons comme receveurs des embryons de la souche JA57 peu susceptibles à l'infection par le virus RCAS. Les constructions rétrovirales recombinantes chick *Shh*/RCAS-BP(A) ont été fournies par Cliff Tabin. La production des protéines virales et de SHH s'effectue sous le contrôle du promoteur LTR du virus. La deuxième méthode utilisée consiste dans la surexpression d'une protéine dont le cDNA est placé sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus (CMV) dans une construction transfectée d'une manière stable dans une lignée de fibroblastes de caille dénommée QT6. Ces cellules productrices de la protéine sont greffées dans les embryons receveurs et l'effet de la substance est testé sur la différenciation des cellules cibles.

La lignée de cellules fibroblastiques de caille (QT6) produisant de manière stable la protéine SHH aviaire a été établie par D. Duprez de manière analogue à celle de BMP-2/Q2bn. La production de la protéine SHH s'effectue sous le contrôle du promoteur CMV.

Nos expériences ont d'abord porté sur l'effet de *shh* sur la survie des cellules somitiques. Le remplacement de la notocorde et du tube neural par des cellules sécrétant la protéine SHH a un effet spectaculaire sur le devenir du mésoderme paraxial qui :

1) ne subit pas l'apoptose observée dans l'expérience contrôle : ablation des organes axiaux sans remplacement ou remplacement par des cellules non transfectées,

2) poursuit son développement en cartilage vertébral en côtes et en muscles.

En conclusion, l'effet de la notocorde et de la floor plate sur la survie du mésenchyme somitique est médié d'une manière prédominante, sinon exclusive, par la protéine SHH.

SHH peut donc être considérée comme un facteur de survie et de croissance des cellules somitiques.

L'étude des activités géniques du mésoderme somitique après l'ablation du complexe notocorde-floor plate suivie ou non de la greffe de cellules sécrétant la protéine SHH montre que l'expression des marqueurs ventraux (e.g. *Pax1*) et dorsaux (e.g. *Pax3*, *MyoD*) du somite ainsi que la différenciation cartilagineuse et musculaire s'effectuent de la même manière dans les conditions normales (en présence des organes axiaux) et lors de la greffe de cellules produisant SHH. Au contraire, ces deux processus sont totalement abolis en leur absence.

Ces résultats suggèrent que SHH ne joue pas un rôle crucial dans l'établissement de la polarité dorsoventrale. D'autres facteurs sont donc à mettre en cause dans ce phénomène. Les candidats potentiels sont chordin et noggin pour les

facteurs capables d'induire les structures ventrales du somite (sclérotome et cartilage vertébral) et BMPs ou/et Wnts pour les structures dorsales (dermomytomes). Des recherches sont poursuivies sur ce thème dans le laboratoire.

7. Hétérogénéité des mécanismes moléculaires responsables de la différenciation du cartilage vertébral

Nos travaux antérieurs ont montré que les activités géniques responsables de la différenciation du cartilage vertébral sont de deux sortes selon la région de la vertèbre considérée. Le corps vertébral et les arcs neurax se forment à partir de mésoderme exprimant *Pax1*. L'expression de ce gène est soumise à un facteur inducteur émanant de la *notocorde* dont l'effet peut être mimé par la protéine SHH.

L'apophyse épineuse qui se différencie dorsalement, en position sous-cutanée, se développe à partir de mésoderme dorsal exprimant les gènes à homéobox *Msx1* et 2. L'expression de ces gènes par les cellules du mésoderme paraxial est induite par le tube neural dorsal. Des expériences de greffe ectopique en position latérale par rapport à la moelle épinière ont montré que la partie dorsale du tube neural, implantée latéralement dans le somite en position sous-cutanée, induit l'expression ectopique de *Msx2* dans le mésoderme somitique qui forme alors des îlots de cartilage sous-cutané ectopiques. La notocorde ventrale, inducteur connu du sclérotome dans le somite, ne possède pas la capacité d'induire la formation de ce type de cartilage superficiel, qu'elle soit placée en position latérale ou en position dorsale au-dessus du tube neural⁹.

Nous avons proposé que l'expression des gènes *Msx*, notamment *Msx2*, par le mésenchyme dorsal qui formera l'apophyse épineuse, fait partie du mécanisme plus général de **formation du cartilage sous-cutané**. Les Bone Morphogenetic Proteins, ou BMPs, sont des facteurs sécrétés de la famille du TGF β , isolés grâce à leur capacité d'induire de l'os après injection intramusculaire ou sous-cutanée chez le rat adulte. Par ailleurs, BMP2/4 induisent l'expression des gènes *Msx* au cours de la formation des bourgeons dentaires chez la souris. Les gènes *Msx1*, *Msx2*, *Bmp4* sont exprimés de façon coordonnée au cours de la formation du tube neural, dans la partie apicale des bourrelets neurax puis dans la plaque du toit, après fermeture du tube neural. A E2,5, le mésenchyme somitique débute sa migration au-dessus de la moelle épinière. *Bmp4* présente alors une expression dans la plaque du toit et dans l'ectoderme dorsal, assez largement au-dessus du futur mésenchyme dorsal. Cette localisation suggère une possible induction des

9. Takahashi Y. and Le Douarin N., 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 7482-7486.

Takahashi Y., Bontoux M. and Le Douarin N., 1991. EMBO J., 10, 2387-2393.

Takahashi Y., Monsoro-Burq A.H., Bontoux M. and Le Douarin N., 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10237-10247.

gènes *Msx* dans le mésoderme en migration. Les gènes *Msx* sont exprimés ensuite par la plaque du toit, le mésenchyme dorsal et l'ectoderme.

Nous avons donc analysé le rôle des BMPs sur la formation de cartilage chez l'embryon par plusieurs voies.

a) Greffe de cellules productrices de BMP4 dans la région somitique

L'implantation de telles cellules induit l'expression des gènes *Msx1-2* dans le mésenchyme somitique sous-cutané et la différenciation de nodules cartilagineux ectopiques.

b) La greffe de cellules productrices de BMP2 dans la région sous ectodermique médiodorsale provoque l'hypertrophie de l'apophyse épineuse

Nous avons testé l'influence de BMP4 et BMP2 sur la formation de l'apophyse épineuse en utilisant des cellules transfectées par le virus BMP4-RCAS ou par une lignée cellulaire stable produisant BMP2. Greffées en position dorsale, les cellules produisant BMP2 ou BMP4 provoquent des fusions vertébrales accompagnées parfois d'un accroissement de la taille de l'apophyse épineuse. Cette différenciation cartilagineuse est précédée par l'hypertrophie du mésenchyme dorsal et l'intensification de l'expression de *Msx2*.

c) La greffe de cellules productrices de BMP4 ou BMP2 en position latérale profonde entre somite et tube neural provoque l'atrophie du corps vertébral et des arcs neuraux

En présence de cellules productrices de BMPs le mésenchyme de l'ébauche du sclérotome n'exprime pas *Pax1* à E3 et E4 mais exprime au contraire *Msx1* et 2. Aux stades ultérieurs on constate que le corps vertébral et l'arc neural ne se sont pas développés au niveau de la greffe.

d) La greffe de cellules produisant SHH en position médiodorsale superficielle et latérale profonde à E2 produit l'effet inverse des BMPs

En position dorsomédiale, sous l'ectoderme, les cellules productrices de SHH empêchent la formation d'une apophyse épineuse et toute différenciation cartilagineuse comme le fait la greffe de notocorde. Au contraire, si à la source normale de SHH provenant de la notocorde et de la floor plate on ajoute des cellules sécrétant cette protéine entre le tube nerveux et les somites on produit une hypertrophie du corps vertébral et des arcs neuraux au niveau de la greffe.

Ces résultats révèlent non seulement que la différenciation du cartilage vertébral obéit à des mécanismes moléculaires distincts selon que le cartilage formé est profond ou superficiel, mais ils montrent aussi que les facteurs mis en jeu (SHH et BMP) exercent un effet antagoniste sur chacune des catégories cellulaires considérées.

Notre projet porte maintenant sur l'étude des récepteurs aux BMPs et à Sonic Hedgehog et de la voie de signalisation intracellulaire des BMPs.

D'après nos résultats, deux systèmes antagonistes sont impliqués dans la formation de la vertèbre. Le système ventral impliquerait Sonic Hedgehog, le système dorsal, BMP4/7. Nous voulons à présent analyser la répartition des récepteurs à ces molécules au cours de la formation du mésoderme paraxial, afin d'analyser si la compétence des cellules à répondre à l'un ou l'autre de ces signaux est précisément régulée ou si seule la répartition du ligand est importante.

De même, les molécules BMP2/4 présentent une voie de signalisation intracellulaire complexe, qui commence à être analysée : les complexes récepteurs sont des SER-TRE kinases qui s'auto- et s'inter-phosphorylent quand le ligand est fixé. Le récepteur activé est alors capable de phosphoryler une molécule intracytoplasmique, Madr1 (Mother-against-dpp related protein) qui à son tour lie Madr4. Le complexe Madr1/4 est transloqué dans le noyau, où il participe directement au complexe activateur de la transcription des gènes-cibles des BMPs. Nous avons tout récemment cloné l'homologue aviaire de Madr1, et nous sommes en cours d'analyse de la séquence. Nous projetons d'analyser en détail la mise en place de la voie de réponse aux BMP2/4 au cours du développement, puis d'utiliser une construction activée de ce gène, clonée dans un virus, pour infecter des cellules *in vitro* ou *in vivo* et ainsi réaliser une activation constitutive de la réponse aux BMP2/4. L'identification de séquences cibles dans le génome aviaire est ensuite envisageable.

8. La détermination des territoires présomptifs du membre

Nous avons utilisé les ressources du marquage caille-poulet combiné avec l'utilisation de marqueurs moléculaires tels que *En*, *Wnt7a* et *Lim1* respectivement exprimés sur la face ventrale (*En*) et dorsale (*Wnt7a* et *Lim1*) du membre pour déterminer les mécanismes qui président à l'établissement de la polarité dorso-ventrale de l'ébauche alaire.

Nous montrons que le territoire ectodermique du membre s'étend de la région somitique à la lame latérale alors que son territoire mésodermique est beaucoup plus restreint. Ce dernier est l'inducteur de la crête apicale ectodermique qui recèle l'information destinée à assurer la croissance en longueur de l'appendice. L'ectoderme destiné à recouvrir la face dorsale du membre reçoit une information émanant des somites tandis que l'ectoderme de la face ventrale reçoit des signaux émis par la lame latérale : ce mécanisme est responsable de la mise en place de la polarité dorsoventrale. Ainsi la greffe de somites en position latérale par rapport au territoire du membre induit la formation d'un membre bi-dorsal. La nature des facteurs mis en jeu est à l'étude.

9. Rôle de SHH dans l'activation du programme myogénique dans le bourgeon d'aile

La musculature hypaxiale provient de la partie latérale du somite¹⁰. L'ablation du complexe tube neural-notocorde entraîne une dégénérescence de la musculature axiale alors que dans ces conditions, la musculature périphérique se développe normalement¹¹. SHH étant capable de faire survivre les cellules myotomales en l'absence des structures axiales, (voir paragraphe 1.2), nous avons voulu vérifier si SHH exprimé postérieurement au niveau du mésenchyme du bourgeon d'aile joue un rôle dans l'activation du programme myogénique des cellules musculaires de l'aile.

Les masses musculaires ont été infectées à l'aide de la construction recombinante SHH/RCAS (fournie par Cliff Tabin¹²). L'expression ectopique de SHH dans le bourgeon d'aile induit successivement l'extension des domaines d'expression des gènes Pax-3 et MyoD suivie d'une augmentation du nombre de cellules exprimant la protéine myosine. La surexpression de SHH dans le bourgeon d'aile conduit à une hypertrophie des masses musculaires. Dans un système de culture primaire de cellules musculaires, l'addition de SHH entraîne une augmentation très nette du nombre de myoblastes conduisant à une augmentation des myotubes. Ces résultats montrent que SHH est capable d'activer la myogenèse *in vitro* et *in vivo*. L'effet de SHH sur la prolifération des myoblastes en culture suggère que l'activation du programme myogénique par SHH passe par une étape de prolifération.

Notre projet consiste à étudier le rôle des FGFs au cours de la myogenèse périphérique sera aussi étudié *in vivo*, en utilisant ce système de surexpression rétrovirale.

La séquence codante du gène Fgf-4 de souris (mFgf-4) a déjà été insérée dans le rétrovirus RCAS-BP(A). Le clonage a été effectué de manière analogue au clonage effectué pour la construction recombinante hBmp-2/RCAS¹³. La construction obtenue s'appelle mFgf-4/RCAS-BP(A). Il a déjà été vérifié que la protéine recombinante FGF-4 murine produite par la construction virale est active sur les cellules de poulet. Des premiers résultats montrent que la surexpression de Fgf-4/RCAS dans le bourgeon d'aile conduit à la disparition de marqueurs musculaires (MyoD et myosine). Une question évidente est : que sont devenues les cellules musculaires ? Pour résoudre cette question, l'approche rétrovirale sera combinée à la technique des chimères caille/poule. Les somites de la région brachiale (somites 15 à 20) d'un embryon de poulet hôte de stade 20 somites seront remplacés par les somites provenant du même niveau prélevés chez un embryon

10. Ordahl C and Le Douarin N., 1992. *Development*, 114, 339-353.

11. Rong P.M., Teillet M.-A., Ziller C. and Le Douarin N., 1992. *Development* 114, 339-353.

12. Riddle R.D., Johnson R.L., Laufer E. and Tabin C., 1993. *Cell*, 75, 1401-1416.

13. Duprez D., Bell E., Richardson M.K., Archer C.W., Wolpert L., Brickell P.M. and Francis-West P., 1996a. *Mech. Dev.* 57, 145-157.

de caille de même stade. Une surexpression de FGF4 sera alors induite dans ces bourgeons de membre chimères (caille/poule). L'analyse de la localisation des transcrits MyoD et de la myosine, combinée à la révélation d'un anticorps spécifique des cellules de caille, QCPN (Hybridoma Bank), nous permettra de suivre le devenir des cellules de caille (potentiellement musculaires) dans le bourgeon de membre soumis à une expression ectopique de FGF-4.

II. HÉMATOPOÏÈSE ET ANGIOGÈNESE PRÉCOCES

Chercheurs : C. Corbel, A. Eichmann, V. Nataf, A. Grapin-Botton

Ingénieurs de Recherche et Ingénieurs d'Étude : C. Bréant, P. Vaigot

ITA : A. Lehmann

Collaborations extérieures : K. Alitalo (Hartmann Institute, Helsinki), B. Imhof (Centre Médical Universitaire de Genève), C. Marcelle (California Institute of Technology), P. Quéré (INRA, Nouzilly), F. Coudert (INRA, Nouzilly), F. Cormier (Institut Curie, Orsay), T. Graf, L. Kelly, M. Sieweke (EMBL, Heidelberg)

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.

23 kinases aviaires ont ainsi été identifiées. Nos recherches ont pour le moment porté sur des récepteurs exprimés par les cellules endothéliales vasculaires.

1. Étude des récepteurs du vascular endothelial growth factor (VEGFR)

Nous avons réalisé le clonage des deux gènes dont l'expression est restreinte aux endothéliums vasculaires et 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. Le VEGF est le seul mitogène spécifique des cellules endothéliales et il constitue un facteur d'angiogenèse tumorale très actif. 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. La nomenclature récente nous amène à désigner Quek1 sous le terme de VEGFR2.

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. Nous nous sommes donc posé la question des potentialités de différenciation de ces cellules. En effet, l'existence d'un précurseur commun aux cellules endothéliales et hématopoïétiques, **l'hémangioblaste**, a été postulée depuis le début du siècle. Récemment, il a été montré que les souris homozygotes pour la mutation d'un gène codant pour le récepteur 2 du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFR2) n'ont ni cellules endothéliales ni cellules hématopoïétiques et meurent au jour 9 du développement. Ces résultats suggéraient que le VEGFR2 était exprimé par l'hémangioblaste et essentiel pour sa différenciation en cellules endothéliales et hématopoïétiques. Cependant, il n'était pas exclu que l'absence d'hématopoïèse soit secondaire à celle du microenvironnement endothélial. Pour tester ces deux hypothèses nous avons isolé les cellules VEGFR2+ du mésoderme d'embryons de poulet au stade de la gastrulation et analysé leur potentialités à se différencier *in vitro* en cellules hématopoïétiques et endothéliales.

2. Isolement des cellules VEGFR2+ du mésoderme précoce

Des anticorps monoclonaux dirigés contre la partie extracellulaire de Quek1 ont été produits afin d'isoler les cellules précurseurs de la ligne primitive au stade de la gastrulation, d'étudier leurs potentialités de différenciation *in vitro* et de mettre en évidence **l'hémangioblaste**.

Une construction réunissant la partie extracellulaire du gène Quek1-VEGFR2 et la partie constante (Fc) du gène humain d'immunoglobuline dans un vecteur d'expression eukaryote a été réalisée. Ce vecteur a été transfecté dans des cellules COS, qui sécrètent la protéine chimère Quek1-Fc dans le milieu de culture. Cette protéine a été ensuite purifiée par absorption du surnageant de culture sur une colonne protéine-A-sépharose. La protéine chimère a été utilisée pour immuniser des souris afin d'obtenir des anticorps monoclonaux spécifiques de VEGFR2. L'un d'entre eux, 4H11, de classe IgG1, a été utilisé pour les expériences présentées ci-dessous.

Les cellules VEGFR2+ sont isolées à partir du mésoderme de la région postérieure d'embryons de poulet comprenant les trois feuillets embryonnaires qui est prélevée puis dissociée mécaniquement. 15 000 à 20 000 cellules sont récupérées par embryon puis marquées en immunofluorescence indirecte par l'anticorps 4H11. Une analyse par FACS-Scan révèle que 20 % des cellules sont VEGFR2+. Elles sont ensuite isolées au moyen d'un trieur de cellules et sont mises en culture dans un milieu semi-solide (caillot de plasma), en absence ou

en présence de VEGF recombinant humain. Dans ces deux conditions, on observe la formation de colonies qui sont analysées au troisième jour de culture.

En absence de VEGF, les cellules VEGFR2+ donnent naissance à des colonies hématopoïétiques avec une fréquence de 1 colonie pour 10 cellulesensemencées. Une analyse phénotypique de ces colonies par coloration May-Grünwald-Giemsa ainsi que par des marqueurs spécifiques des lignages hématopoïétiques montre que ces colonies appartiennent aux lignages thromboblastique et érythroblastique.

En présence de VEGF, l'efficacité de clonage est augmentée à 150 colonies/1 000 cellules. Les colonies de cellules endothéliales apparaissent avec la fréquence de 1/10. La formation de colonies hématopoïétiques en présence de VEGF est réduite de 50 % par rapport aux conditions de culture sans facteur de croissance.

La population de cellules positives donne donc naissance à la fois à des cellules endothéliales et hématopoïétiques. La population négative ne donne que très peu de colonies des deux types. Par rapport à la population totale, un enrichissement de 5 fois est obtenu dans la population positive, ce qui correspond aux 20 % de cellules VEGFR2+.

Ainsi, la différenciation endothéliale à partir de la population VEGFR2+ dépend de la présence du VEGF dans le milieu de culture. En revanche, la différenciation hématopoïétique s'effectue en absence de VEGF. Afin de déterminer si la différenciation hématopoïétique dépendait également du récepteur, les cellules VEGFR2+ ont été cultivées en présence ou non de la protéine chimère Quek1-Fc, contenant la partie extracellulaire du récepteur. Il apparaît que la différenciation hématopoïétique est inhibée dans des cultures effectuées en présence de fortes concentrations de cette protéine (1µg/ml). Cet effet est spécifique du récepteur et dose-dépendant.

Ces résultats, ainsi que ceux de la mutation nulle du VEGFR2 chez la souris, nous amènent à conclure que l'activation du VEGFR2 est nécessaire et suffisante pour induire la différenciation hématopoïétique et endothéliale des cellules du mésoderme précoce issu de la ligne primitive. La spécification vers la voie hématopoïétique ou vasculaire dépend de la nature des facteurs de croissance liant le récepteur : le VEGF induit la différenciation endothéliale, et un facteur de croissance différent du VEGF et encore inconnu induit la différenciation hématopoïétique.

Notre projet porte sur la recherche du ligand responsable de la différenciation hématopoïétique.

III. LE DÉVELOPPEMENT DE LA FONCTION IMMUNITAIRE

Chercheurs : J. Salaün, V. Thomas-Vaslin, C. Piétrement, I. Barbosa

Ingénieurs de Recherche et Ingénieurs d'Étude : M. Coltey

ITA : P. Belo

Collaborations extérieures : A. Bandeira, A. Coutinho, Y. Modigliani (Institut Pasteur, Paris), D. Damotte (Hôpital Necker, Paris), R. Fucs (Istituto de Biologica, Niteroi, Brésil), M.F. Saron (Institut Pasteur, Paris)

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'hôte¹⁴.

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 1990¹⁵ que la greffe de l'ébauche thymique contenue dans l'épithélium de la 3^e 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.

14. Ohki H., Martin C., Corbel C., Coltey M. and Le Douarin N. 1987. *Science*, 237, 1032-1035.

Ohki H., Martin C., Coltey M. and Le Douarin N. 1988. *Development*, 104, 619.

Belo M., Corbel C., Martin C. and Le Douarin N. 1989. *Int. Immunol.*, 1, 105

15. Salaün J., Bandeira A., Khazaal I., Calman F., Coltey M., Coutinho A. and Le Douarin N., 1990. *Science*, 247, 1471-1474.

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 avons montré de plus 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 mécanisme¹⁶.

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.

1. Implication de phénomènes de suppression dans l'établissement et le maintien de la tolérance induite par l'épithélium thymique

Notre approche expérimentale a consisté à transférer par voie intraveineuse des lymphocytes (spléniques et lymphatiques) de souris chimères à des souris nude naïves syngéniques. Des greffes de peau sont pratiquées 2 mois après l'injection. Un certain nombre de ces souris est restauré et parmi celles-ci certaines sont tolérantes à la greffe de peau de l'haplotype du donneur de l'épithélium thymique. On constate que l'absence de tolérance est d'autant plus fréquente que le nombre de cellules T injectées est plus faible. Ainsi la tolérance est obtenue dans 95 % des cas après le transfert de 5×10^6 cellules T. Par contre, 88 % des souris sont tolérantes après l'injection de 10^6 cellules T et seulement 55 % après l'injection de $0,1 \times 10^6$ de cellules T. De plus la tolérance peut être transférée successivement

16. Le Douarin N., Corbel C., Bandeira A., Thomas-Vaslin V., Modigliani Y., Coutinho A. and Salaün J. 1996. *Immunol. Rev.*, 149, 35-53.

Corbel C. 1996. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 212, 95-106.

chez des receveurs naïfs, indiquant que ce processus de tolérance ne fait pas nécessairement intervenir des lymphocytes T récemment émigrés du thymus.

Nous avons ensuite défini un paradigme expérimental dans lequel les cellules T tolérantes générées chez la chimère thymique initiale sont confrontées à une population de cellules T périphériques présentant un répertoire aussi proche que possible de la normale. Pour cela nous avons dû nous adresser à un hôte susceptible d'accepter la greffe et de promouvoir l'expansion des cellules T injectées. Deux modèles ont été choisis. L'un a consisté à transférer des lymphocytes périphériques de souris nude B6 (Thy1.2) restaurées par de l'épithélium thymique allogénique BALB/c chez des souris euthymiques B6. Thy1.1 transgéniques pour le récepteur T spécifique de l'antigène du mâle HY (Tg anti-HY). Ces souris transgéniques sont immunocompétentes et rejettent normalement les greffes de peau BALB/c. Après l'injection des lymphocytes T de la chimère nude B6 (EpT10 BALB/c) les souris B6Tg anti-HY sont tolérantes vis-à-vis des greffes de peau BALB/c. L'injection sélective de cellules CD4⁺ permet d'induire la tolérance, ce qui suggère que celle-ci est obtenue par le jeu de cellules régulatrices capables d'inactiver les lymphocytes réactifs contre l'haplotype BALB/c.

Des expériences de transfert de tolérance ont été également réalisées chez des receveurs euthymiques irradiés à doses croissantes, ce qui permet d'obtenir un chimérisme contrôlé chez les receveurs, qui présentent par ailleurs un répertoire normal. Chez ces chimères la tolérance est obtenue lorsque au moins 50 % de cellules T sont tolérantes. La tolérance n'est pas « infectieuse » dans ce modèle, c'est-à-dire que les cellules non tolérantes subissent la suppression mais ne sont pas elles-mêmes inactivées ou éduquées à devenir tolérantes. Aucune différence dans le profil de cytokines sécrétées après stimulation *in vitro* des cellules T n'a pu être mise en évidence, ne permettant pas de conclure à la présence de cellules T régulatrices anti-inflammatoires de type Th2. En conclusion, les résultats obtenus à l'aide de ce modèle confirment l'existence d'un phénomène de suppression, sélectionné au niveau de l'épithélium thymique.

En utilisant un système expérimental similaire de transfert de cellules T de chimères à des souris irradiées, nous avons pu montrer que des cellules T récemment émigrées du thymus sont capables de conférer la tolérance à des populations de cellules T effectrices non tolérantes, à condition d'entrer en contact avec l'antigène périphérique dès leur sortie du thymus. Ainsi, dans ce système, une tolérance dite « infectieuse » a pu être obtenue, permettant de rendre tolérantes des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ de 2^e génération.

L'ensemble de ces travaux montre que la tolérance induite par des greffes d'épithélium thymique est le résultat de la sélection positive par l'épithélium thymique, de lymphocytes T CD4⁺ ayant des propriétés régulatrices, et qui contrôlent l'activité de cellules T effectrices présentes et fonctionnelles.

La question se posait de savoir si ces lymphocytes T pouvaient réguler l'activité effectrice de cellules de souris normales. Pour cela nous avons transféré des

cellules T périphériques de chimères à des souris nude injectées avec des cellules T de souris normale. Nous avons pu montrer un retard significatif du rejet de la greffe de peau de l'haplotype de l'épithélium thymique dépendant de la proportion des deux types de cellules injectées. Ceci démontre que des cellules T régulatrices sélectionnées par l'épithélium thymique allogénique peuvent contrôler l'activité de cellules T périphériques effectrices issues de souris normales. Les cellules T sélectionnées sur l'épithélium thymique peuvent être considérées comme dotées d'une activité régulatrice opposée à l'activation des cellules effectrices.

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.

L'étude des cellules T régulatrices, sélectionnées par l'épithélium thymique, et dont le répertoire serait dirigé vers la reconnaissance de ligands ubiquitaires communs à l'épithélium thymique et aux autres tissus de l'organisme pourrait, non seulement permettre une nouvelle appréhension des phénomènes de la sélection positive des répertoires des cellules T dans le thymus, car elle implique des interactions TCR/ligand de haute affinité, mais également, contribuer à l'analyse de l'établissement, dans l'épithélium thymique, de la tolérance aux antigènes non exprimés dans le thymus.

C'est à la caractérisation des différents clones de lymphocytes T, les uns régulateurs, les autres autoréactifs que nous nous consacrons désormais.

2. Étude de la sélection des cellules T autoréactives, conduisant à une insulte autoimmune chez la souris NOD

La sélection du répertoire des cellules T s'opère dans le thymus au contact, à la fois des cellules épithéliales et des cellules hématopoïétiques. Un défaut de sélection peut conduire au développement de l'autoimmunité. Nous avons choisi le modèle de la souris NOD (Non Obese Diabetic) pour étudier le rôle de l'épithélium thymique dans l'établissement de cette maladie autoimmune.

Nous avons voulu déterminer si le diabète autoimmun dépend de la sélection du répertoire des cellules T ou de la présence d'antigènes particuliers exprimés sur les tissus cibles de la souris NOD. Pour cela, nous avons testé la possibilité d'induire une autoimmunité chez des souris nude non autoimmunes en leur greffant des ébauches thymiques embryonnaires de NOD. Afin de distinguer le rôle respectif des cellules épithéliales ou hématopoïétiques du thymus, nous avons également restauré les fonctions immunitaires T de souris nude à la naissance, en greffant des épithéliums thymiques (E10) ou des ébauches colonisées (E17), prélevées sur des embryons NOD ou F1.

La restauration du système immunitaire T est vérifiée par immunophénotypage des lymphocytes du sang périphérique. Le taux de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ est normal 3-6 mois après la greffe. La glycémie est suivie régulièrement chez ces chimères, ainsi que leur poids. La glucosurie est normale, sans polyurie. La plupart des souris sont sacrifiées 10 à 15 mois après la greffe. Le pancréas et les glandes salivaires de ces animaux ainsi que de témoins nude B6 restaurés avec des ébauches thymiques de souches normales (BALB/c ou B6) et du même âge ont été observés en histologie classique. On observe des infiltrations lymphocytaires, chez les souris restaurées respectivement avec un épithélium NOD E10, ou avec un thymus NOD E17, mais pas chez les souris témoins greffées avec des épithéliums n'appartenant pas à la souche NOD.

Ces résultats montrent que l'épithélium thymique NOD est suffisant pour sélectionner des cellules T autoréactives infiltrantes à partir de précurseurs génétiquement normaux.

L'immunophénotypage des cellules (CD4 ou CD8) infiltrant le pancréas, les glandes salivaires, les surrénales, la thyroïde et les ovaires des chimères, analysé sur coupes congelées, nous a permis de montrer que ces deux populations lymphocytaires sont impliquées dans ces manifestations autoimmunes.

Nous projetons de restaurer des souris nude/NOD par la greffe d'épithéliums thymiques prélevés soit sur des embryons de souche euthymique normale, soit sur des embryons de souche NOD, afin d'étudier le développement éventuel du diabète dans ces deux situations. Le transfert des lymphocytes périphériques de ces différentes chimères à divers receveurs naifs : NOD Rag, B6 Rag, F1 (B6 × NOD) Rag est également envisagé afin de compléter notre analyse.

3. Implication de l'épithélium thymique et des cellules hématopoïétiques dans la sélection positive conduisant à la restriction au CMH des lymphocytes T

Notre modèle expérimental offre la possibilité d'étudier le problème de la nature des cellules stromales thymiques responsables de la restriction des lymphocytes T au CMH.

Nous avons choisi de suivre *in vivo* la réponse de souris chimères à une infection intracérébrale par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (CML). En effet, chez des souris normales infectées par ce virus, les peptides viraux présentés en association avec les molécules du CMH sur les méninges sont la cible des cellules T cytotoxiques CD8⁺ ce qui entraîne la mort par méningite 7 à 9 jours après l'infection. Des souris nude BALB/c (H-2^d) ont été restaurées avec des épithéliums thymiques d'embryons C3H (H-2^k), BALB/c ou F1 (BALB/c × C3H) et ont été infectées par voie intracérébrale par le virus de la CML. Les souris chimères restaurées par des greffes d'EpT allogéniques survivent à l'infection intracérébrale. Ceci suggère que les cellules hématopoïétiques de

l'hôte qui colonisent l'EpT ne permettent pas un recrutement suffisant de cellules T CD8⁺ capables d'induire une méningite fatale. Au contraire les souris restaurées par des EpT syngéniques ou semi-allogéniques meurent de méningite. Ainsi, l'haplotype BALB/c introduit dans l'épithélium thymique à l'état hétérozygote suffit à induire la restriction des lymphocytes T CD8⁺, indiquant un rôle des cellules de l'épithélium thymique dans la restriction des lymphocytes T. Ces souris cependant présentent des infiltrations lymphocytaires sporadiques et faibles lors de l'examen des coupes histologiques des cerveaux. Ce résultat suggère qu'il existe tout de même chez ces souris une certaine restriction vis-à-vis du CMH de l'hôte probablement médiée par les cellules dendritiques du thymus. Celle-ci n'est toutefois pas suffisante pour provoquer une méningite fatale.

Cette hypothèse a pu être confirmée par le test d'hypersensibilité retardée réalisé dans les coussinets plantaires des animaux. En effet, les souris restaurées par un EpT allogénique C3H et infectées par voie intraplantaire, présentent un gonflement local, mais qui est de faible amplitude par rapport aux témoins restaurés par des greffes d'EpT syngénique ou F1, ou aux témoins euthymiques. De plus, la cinétique est anormale. La réponse est retardée et se termine ensuite précocement, ce qui est interprété comme une insuffisance de cellules T CD8 dans la première phase et une absence de CD4 dans la deuxième.

Les lymphocytes T de la chimère sont cependant capables de provoquer l'élimination virale chez toutes les chimères. Une sélection conjointe sur les cellules épithéliales et hématopoïétiques de même haplotype semble nécessaire pour sélectionner de façon optimale les lymphocytes T et permettre leur restriction.

4. Étude de la dynamique des cellules T dérivées des précurseurs hématopoïétiques précoces

Un autre volet de nos recherches consiste en l'étude de la dynamique de la population lymphocytaire T précoce.

En effet, la connaissance du répertoire, de la durée de vie, de la capacité d'expansion de ces cellules T précoces, offre un grand intérêt pour l'étude de l'établissement de la tolérance au soi.

Chez la souris, la colonisation de l'ébauche thymique par les précurseurs des cellules hématopoïétiques, commence au 11^e jour de la gestation¹⁷. Jusqu'au 13^e jour de la gestation, on observe une prolifération des cellules CD4⁺ et CD8⁺. A partir du 15^e jour de la gestation, commence la différenciation des thymocytes. Les cellules souches hématopoïétiques colonisant le thymus jusqu'au 14^e jour de la gestation donnent naissance aux lymphocytes T qui migrent à la périphérie au

17. Fontaine-Pérus J.C., Calman F.M., Kaplan C. and Le Douarin N., 1981. *J. Immunol.* 126, 2310-2316.

cours de la première semaine post-natale. Au 14^e jour de la gestation, seules les cellules $T\gamma\delta$ sont détectables, les cellules $T\alpha\beta$ sont mises en évidence à partir de 16 jours.

Les travaux de Sakagushi *et al.* (1982, 1985) ont montré que la thymectomie néonatale pratiquée avant le 4^e jour post-natal, provoque chez la souris, des réactions autoimmunes pouvant être évitées par l'injection de cellules T de souris normales adultes. La thymectomie précoce s'accompagne de plus de la modification de la dynamique de la population T présente à la périphérie à cet âge, avec une forte expansion de cette population.

La greffe de thymus prélevés sur des fœtus au 14^e jour de la gestation, à des souris nude, permet d'étudier les potentialités d'expansion de cette population particulière de cellules T, dans des conditions syngéniques et allogéniques.

Comme donneurs, nous avons utilisé des embryons de la souche C57BL/6 B.A., dont les lymphocytes T expriment le marqueur Thy1.1, et comme receveurs, des souris nude des souches BALB/c et C57BL/6. L'émigration à la périphérie et la persistance des cellules du donneur ont ainsi pu être suivies par le marquage au FACS des lymphocytes Thy1.1 et Thy1.2, à différents temps après la greffe.

Nous avons observé que les cellules T issues du donneur émigrent hors du thymus et sont remplacées par les cellules de l'hôte en moins de 4 semaines après la greffe du thymus. A la périphérie, les lymphocytes issus du donneur persistent en nombre réduit et sont dilués parmi ceux du receveur. Nous avons montré que la proportion des cellules T du donneur persistant à la périphérie varie en raison inverse de l'âge du donneur et que la survie de cellules T périphériques allogéniques chez des souris nude est possible lorsqu'il s'agit de lymphocytes issus de la première vague de précurseurs hématopoïétiques. Ces résultats mettent en relief la différence qualitative des lymphocytes issus des différentes vagues de précurseurs colonisant le thymus.

La connaissance du devenir des premières populations lymphocytaires T pourrait ouvrir de nouvelles perspectives pour la compréhension des phénomènes intervenant dans le maintien de la tolérance. C'est pourquoi nous nous proposons d'étudier les caractéristiques de ces cellules en présence ou non des lymphocytes de type adulte. Ceci peut être réalisé dans deux situations différentes : l'une proche des conditions physiologiques, avec l'arrivée à la périphérie d'abord des lymphocytes T de type précoce puis celle des cellules de type adulte, l'autre proche des conditions créées par la thymectomie néonatale en pratiquant l'ablation du greffon thymique au stade critique où seules les cellules issues des premiers précurseurs (de type donneur) ont migré à la périphérie et vont donc évoluer en absence de cellules de type adulte (type du receveur). L'éventuelle apparition de maladies autoimmunes sera recherchée dans ces animaux.

LISTE DES PUBLICATIONS

1996

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

CATALA, M., TEILLET, M.-A., DE ROBERTIS, E.D. and LE DOUARIN, N.M. (1996). 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*, 122, 2599-2610.

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.

CORBEL, C. (1996). The avian model in the study of tolerance to self. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 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.

COULY, G., GRAPIN-BOTTON, A., COLTEY, P. and LE DOUARIN, N.M. (1996). The regeneration of the cephalic neural crest, a problem revisited : the regenerating cells originate from the contralateral or from the anterior and posterior neural fold. *Development*, 122, 3393-3407.

DIETERLEN-LIÈVRE, F., DUPRAT, A.-M., et LE DOUARIN, N. (1996). La biologie du développement sources et perspectives. *Méd. Sci.* 12, 67-75.

DUPREZ, D.M., COLTEY, M., AMTHOR, H., BRICKELL, P.M. and TICKLE, 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.

EICHMANN, A., MARCELLE, C., BRÉANT, C. and LE DOUARIN, N.M. (1996). Molecular cloning of Quek 1 and 2, two quail vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-like molecules. *Gene*, 174, 3-8.

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. (1996). Embryologie Cellulaire et Moléculaire. Annuaire du Collège de France 1995-1996. Résumé des Cours et Travaux. 96^e année. Paris.

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.

LE DOUARIN N., 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.

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

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.

MODIGLIANI, Y., COUTINHO, A., PEREIRA, P., LE DOUARIN, N., THOMAS-VASLIN, V., BURLLEN-DEFRANOUX, O., SALAÜN, J. and BANDEIRA, A. (1996). Establishment of tissue-specific tolerance is driven by regulatory T cells selected by thymic epithelium. *Eur. J. Immunol.*, 26, 1807-1815.

MONSORO-BURQ, A.-H., DUPREZ, D., WATANABE, Y., BONTOUX, M., VINCENT, C., BRICKELL, P. and LE DOUARIN N. (1996). The role of bone morphogenetic proteins in vertebral development. *Development*, 122, 3607-3616.

NATAF, V., LECOIN, L., EICHMANN, A. and LE DOUARIN, N.M. (1996). Endothelin-B receptor is expressed by neural crest cells in the avian embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93, 9645-9650.

PARDANAUD, L., LUTON, D., PRIGENT, M., BOURCHEIX, L.-M., CATALA, M. and DIETERLEN-LIÈVRE, F. (1996). Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development*, 122, 1363-1371.

PARDANAUD, L., LUTON, D., PRIGENT, M., BOURCHEIX, L.-M., CATALA, M. and DIETERLEN-LIÈVRE, F. (1996). Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development*, 122, 1363-1371.

PONCET, C., SOULA, C., TROUSSE, F., KAN, P., HIRSINGER, E., POURQUIÉ, O., DUPRAT, A.-M., and COCHARD, P. (1996). Induction of oligodendrocyte progenitors in the trunk neural tube by ventralizing signals: Effects of notochord and floor plate grafts, and of sonic hedgehog. *Mech. Dev.*, 60, 13-32.

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.

RONCALI, L., VIRGINTINO, D., COLTEY, P., BERTOSSI, M., ERREDE, M., RIBATTI, D., MANCINI, L., SORINO, S. RIVA, A. (1996). Morphological aspects of the vascularization in intraventricular neural transplants from embryo to embryo. *Anat. Embryol.*, 193, 191-203.

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.

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

XUE, X.J. and XUE, Z.-G. (1996). Spatial and temporal effects of axial structures on myogenesis of developing somites. *Mech. Dev.*, 60, 73-82.

1997

BAKER, C.V.H., BRONNER-FRASER, M., LE DOUARIN, N.M. and TEILLET, M.-A. (1997). Early- and late-migrating cranial neural crest populations are not lineage-restricted and have equivalent developmental potential in vivo. *Development*, 124, 3077-3087.

DULAC, C., CAMERON-CURRY, P. (1997). Cell progenitors in the neural crest. In « Stem Cells », Potten CS ed., *Acad. Press*, London, pp. 99-117.

DUPIN, E., ZILLER, C. and LE DOUARIN, N.M. (1997). Segregation of cell lineage in the avian neural crest. Colloques Médecine et Recherche. Fondation Ipsen (18/9/95). In : « Isolation, characterization and utilization of CNS stem cells » F.H. Gage and Y. Christen eds., pp. 29-42.

EICHMANN, A., CORBEL, C., NATAF, V., VAIGOT, P., BRÉANT, C. and LE DOUARIN, N.M. (1997). Ligand-dependant development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 5141-5146.

GRAPIN-BOTTON, A., BONNIN, M.-A. and LE DOUARIN, N. M. (1997). HOX gene induction in the neural tube along the anteroposterior axis depends on three parameters : competence, signal supply and paralogue group. *Development*, 124, 849-859.

KARAGOGEOS, D, POURQUIÉ, C., KYRIAKOPOULOU, K., TAVIAN, M., STALLCUP, W., PÉAULT, B. and POURQUIÉ, O. (1997). Expression of the cell adhesion proteins BEN/SC1/DM-GRASP and TAG-1 defines early steps of axogenesis in the human spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 379, 415-427.

LE DOUARIN, N.M. (1997). Étienne Wolff un pionnier de l'embryologie et de la tératologie expérimentales. *Méd. Sci.*, 5, 685-694.

LE DOUARIN, N.M. and GRAPIN-BOTTON, A.(1997). Contrôle génétique du développement du rhombencéphale par les gènes *hox* étudié chez l'embryon d'oiseau par la méthode des chimères Caille-Poulet. *C. R. Soc. Biol.*, 191, 29-42.

LE DOUARIN, N.M., CATALA, M. and BATINI, C. (1997). Embryonic neural chimeras in the study of vertebrate brain and head development. *Int. Rev. Cytol.*, 175, 241-309.

MICHAUD, J.L., LAPOINTE, F. and LE DOUARIN, N.M. (1997). The dorsoventral polarity of the presumptive limb is determined by signals produced by the somites and by the lateral somatopleure. *Development*, 124, 1453-1463.

THOMAS-VASLIN V., DAMOTTE, D., COLTEY, M., LE DOUARIN, N.M., COUTINHO, A. and SALAÜN, J. (1997). Abnormal T cell selection on nod thymic epithelium is sufficient to induce autoimmune manifestations in C57BL/6 athymic nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94, 4598-4603.

THOMAS-VASLIN, V., SALAÜN, J., COLTEY, M., VAIGOT, P. and FUCS, R. (1997). Kinetics and repertoire selection of T cells derived from the early waves of fetal thymus colonization, after thymus grafting in allogenic nude recipients. *Scand. J. Immunol.* 45, 482-486.

WILTING, J., EICHMANN, A. and CHRIST, B. (1997). Expression of the avian VEGF receptor homologues Quek1 and Quek2 in blood-vascular and lymphatic endothelial and non-endothelial cells during quail embryonic development. *Cell Tiss. Res.* 288, 207-223.

Sous presse ou Soumis

DUPIN, E., ZILLER, C. and LE DOUARIN, N.M. (1997). The avian embryo as a model in developmental studies : chimeras and *in vitro* clonal analysis. In « Cellular and molecular procedure in developmental biology ». *Cur. Top. Dev. Biol.*, 36, (sous presse).

DUPREZ, D., FOURNIER-THIBAUT, C. and LE DOUARIN, N.M. Sonic Hedgehog induces proliferation of committed skeletal muscle cells in the chick limb. *Development*, (soumis).

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., SIEWEKE, M., GRAPIN-BOTTON, A., KELLY, L., GRAF, T. and LE DOUARIN, N.M. Dynamic expression of *mafB*, the avian homologue of the mammalian *Kreisler* gene, during embryonic development. *Mech. Dev.*, (sous presse).

LE DOUARIN, N.M. and ZILLER, C. (1996). The neural crest. In « Encyclopedia of Neuroscience 474 ». *Elsevier Science*, Amsterdam, (sous presse).

LE DOUARIN, N.M. Chimères embryonnaires. Que sont-elles ? A quoi servent-elles ? Congrès « Chimères et utopies à l'aube du XXI^e siècle ». Bordeaux 9-11 octobre 1996, (sous presse).

MONSORO-BURQ, A.-H., STIEBER, A., BONTOUX, M., GONATAS, N. and LE DOUARIN, N.M. Environmental factors modulate the size and the secretory activity of the notochord : a study of the Golgi apparatus in avian embryos. *Differentiation*, (sous presse).

TEILLET, M.-A., ZILLER, C. and LE DOUARIN, N.M. Quail-chick chimeras. In « Vertebrate embryology : methods and protocols ». Series : Methods in Molecular Biology, P. Sharpe and I Mason eds., *Humana Press, Totowa, N.J., USA*, (sous presse).