

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 Paris et à l'étranger.

Le cours délivré à Paris a porté sur l'état de nos connaissances concernant l'établissement des axes de polarité dorsoventrale et antéropostérieure du système nerveux des Vertébrés. Il a été basé sur les résultats récents obtenus dans mon laboratoire sur le rôle de l'organisateur dans la mise en place des organes axiaux chez les Vertébrés Amniotes et sur la régulation de l'activité des gènes à homeobox dans le cerveau postérieur.

Deux chercheurs ont été invités à présenter leurs recherches dans le cadre de cet enseignement :

Le Docteur Pierre Golstein (Centre d'Immunologie de Marseille Luminy) qui a parlé des « Bases moléculaires de la mort cellulaire ».

Le Docteur Jacqueline Deschamps (Hubrecht Laboratory, Utrecht, Pays-Bas) qui a traité du « Contrôle génétique de la régionalisation le long de l'axe antéro-postérieur chez la souris ».

A l'étranger :

Un cours a été fait à l'Université d'Amsterdam sur l'invitation du Directeur de la Maison Descartes. Il a porté sur l'organisation précoce du primordium neural chez l'embryon de Vertébré. La mise en évidence de l'origine commune des cellules médioventrales du tube neural et de la notochorde a notamment été soulignée.

Douze heures d'enseignement ont été délivrées à l'Institut Gulbenkian (Lisbonne) et à la Faculté de Médecine de l'Université Complutense à Madrid.

A Lisbonne quatre heures ont été consacrées au contrôle génétique du développement du système nerveux, de la Drosophile à l'Homme. Les recherches les plus récentes dans ce domaine ont été synthétisées et replacées dans leur contexte historique.

Une conférence de deux heures, destinée à un large public, a porté sur le clonage chez les Vertébrés. Les aspects scientifiques, techniques et éthiques de cette importante question ont été envisagés.

A Madrid, le cours s'est adressé à un public composé de chercheurs en biomédecine, d'étudiants et de praticiens. Il a porté : 1) sur la crête neurale, structure embryonnaire transitoire à l'origine de nombreux dérivés dont le système nerveux périphérique, les mélanocytes et la plus grande partie de la tête chez les Vertébrés ; 2) sur le développement du mésoderme paraxial et la neurulation. Les relations entre ces deux processus de développement sont en effet d'une grande importance et ont été récemment étudiées d'un point de vue mécanistique par plusieurs laboratoires y compris le mien.

INVITATION DE PROFESSEUR SUR UNE CHAIRE D'ÉTAT

Le Professeur Spyridon Artavanis-Tsakonas, de l'Université de Yale à New-haven, Connecticut, USA, invité sur une chaire d'État en novembre-décembre 1997 a donné quatre leçons sur le sujet suivant :

« Developmental Genetics and Molecular Medicine : from Flies to Humans »

RÉSUMÉ DE L'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE

Les recherches effectuées au cours de l'année académique 1997-1998 par le groupe que je dirige 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

Ces travaux sont la continuité de ceux des années précédentes et l'exposé ci-dessous ne comporte que les données et orientations récentes.

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

Chercheurs : A. Burns, M. Catala, J.B. Charrier, G. Couly, D. Duprez, H. Etchevers, C. Fournier-Thibault, A. Grapin, R. Lahav, L. Lecoin, N. Le Douarin, A.H. Monsoro, V. Nataf, I. Palmeirim, M.A. Teillet, Y. Watanabe

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

ITA : L. Addade, M.A. Bonnin, D. Champeval, M. Bontoux, C. Glavieux, F. Lapointe, C. Oudin, B. Schuler, C. Vincent

1. LA CRÊTE NEURALE

Nos travaux ont porté sur les cinq domaines essentiels :

- La mise en évidence du rôle des endothélines sur les choix de différenciation et le développement de certains dérivés de la crête neurale
- La crête neurale sacrée et le développement du système nerveux entérique
- Le rôle des gènes *Hox* dans le développement des structures squelettiques de la face
- L'implication de la crête neurale céphalique dans le développement du cerveau
- L'origine des oligodendrocytes.

A. Facteurs impliqués dans le développement de la crête neurale : les endothélines et leurs récepteurs

Les cellules de la crête neurale sont, pour la plupart, pluripotentes lorsqu'elles quittent le tube neural et dépendent largement de facteurs de survie et de croissance pour accomplir leur choix de différenciation et exprimer un phénotype en accord avec le lieu où elles se localisent. La recherche de ces facteurs constitue un élément essentiel de nos travaux. Plusieurs de ces facteurs ont pu être mis en évidence grâce à des mutations qui, chez la souris, affectent des dérivés de la crête neurale. Ainsi les mutations *Steel* (*sl*) et *Dominant White Spotting* (*W*) concernent respectivement les gènes codant pour le stem cell factor, ou Steel factor et pour son récepteur c-kit, et les mutations *lethal spotted* (*ls*) et *Piebald lethal* (*Sl*) affectent les gènes codant pour l'endothéline 3 (EDN3) et son récepteur EDNRB. Ces deux séries de mutations perturbent la pigmentation ainsi que, pour *ls* et *Sl*, le développement de l'innervation intestinale.

Nous avons montré précédemment que le récepteur c-kit est exprimé par les mélanoblastes à partir d'E4 chez l'embryon de caille, et que le facteur *Steel* a, en culture *in vitro*, un effet positif sur la survie des cellules de crête neurale de caille et sur leur capacité à se différencier en mélanocytes.

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

aussi désignés par ET1, ET2 et ET3) 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 ET1 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. Actuellement, de nombreuses données montrent que ET3 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 ET3 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 ET3. Parallèlement, chez l'homme, des mutations homozygotes de EDNRB et de ET3 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 pour le 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.

1. Clonage et patron d'expression d'EDNRB chez l'embryon d'oiseau¹

Afin d'étudier l'expression d'EDNRB au cours du développement embryonnaire de la caille et du poulet, nous avons cloné l'homologue aviaire du récepteur de mammifère.

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

1. Nataf, V., Lecoin, L., Eichmann, A. and Le Douarin, N.M. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9645-9650.

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/ET3, interviennent à des stades embryonnaires différents, les endothélines ayant un effet précoce essentiel sur la prolifération des cellules de la CN. Cet effet est critique pour la dispersion des cellules dans l'embryon.

2. Clonage et patron d'expression d'un nouveau récepteur à ET3 chez la caille : EDNRB2 (Lecoin *et al.*, 1998)

Les mélanoblastes/mélanocytes de l'embryon d'oiseau n'expriment pas EDNRB. Or chez la souris, la mutation du gène affecte le lignage mélanocytaire, et en culture nous observons (voir plus loin) un effet prolifératif d'ET3 sur les mélanoblastes/mélanocytes. Nous avons donc émis l'hypothèse que ces cellules possèdent un récepteur à ET3 d'un autre type. Par RT-PCR, nous avons en effet cloné un ADNc aviaire codant pour un type nouveau de récepteur à ET3, que nous appelons EDNRB2. Sa séquence en acides aminés est plus proche de celle d'EDNRB que de celle des récepteurs EDNRA de mammifère ou EDNRC de xénope. Toutefois, les différences de séquence entre les récepteurs B et B2 de caille montrent que les deux molécules ne résultent pas d'un épissage alternatif et qu'elles sont donc codées par deux gènes différents.

L'étude du patron d'expression d'EDNRB2 par hybridation *in situ* au cours du développement embryonnaire montre que ce récepteur est exprimé par les cellules du lignage mélanocytaire à partir du moment où elles empruntent la voie dorso-latérale de colonisation de la peau, ainsi que par les mélanocytes matures. Il n'est pas exprimé par les autres dérivés de la crête neurale. EDNRB à l'inverse est exprimé par les cellules précurseurs de la crête neurale quand elles se trouvent encore dans les bourrelets neuraux, puis lors de la transition épithélio-mésenchymateuse et lorsqu'elles deviennent migratrices et enfin par tous les dérivés de la crête neurale, sauf le méséctoderme et les cellules pigmentaires : EDNRB est exclu du lignage mélanocytaire.

Nous proposons qu'ET3 exerce d'abord son action proliférative sur les précurseurs de la crête neurale, dont la majorité sont des cellules pluripotentes, et ceci par l'intermédiaire d'EDNRB. Lorsque les cellules s'engagent dans la voie de différenciation mélanocytaire, elles perdent EDNRB et se mettent à exprimer EDNRB2. Il est à noter que nous observons ce changement d'expression par les cellules de crête neurale en culture au moment où elles se différencient en mélanocytes.

L'étude des propriétés pharmacologiques du récepteur B2 montre qu'il présente la même affinité pour les trois endothélines, ET1, ET2 et ET3. Ceci confirme

qu'il s'agit bien d'un récepteur de type B ; toutefois, c'est un récepteur B atypique, étant donnée sa faible affinité pour la sarafotoxine C, un agoniste d'ET3 extrait d'un venin de serpent, qui se lie fortement au récepteur EDNRB « classique ».

3. Patron d'expression d'ET3 chez l'embryon d'oiseau (Nataf *et al.*, 1998 sous presse)

Les hybridations *in situ*, réalisées sur des coupes d'embryons de poulet avec une sonde ARN radioactive de poulet, montrent que ni les cellules de crête neurale ni aucun de leurs dérivés — à l'exception du més ectoderme de la tête et de la région hypobranchiale — n'expriment jamais ET3 au cours de l'ontogenèse. Par contre, le messager d'ET3 est présent dans l'environnement mésenchymateux dans lequel migrent les cellules de la crête neurale. A partir du stade 17 somites, des transcrits du gène d'ET3 sont détectés dans la splanchnopleure, qui plus tard fournira le mésenchyme intestinal dans lequel migreront puis s'installeront les précurseurs du système nerveux entérique. Ceux-ci expriment le récepteur EDNRB. A E4-E6, ET3 s'exprime dans l'ensemble du mésenchyme du tractus digestif.

A partir d'E3, ET3 est exprimé dans l'ectoderme. A ce stade les mélanoblastes se trouvent encore dans le mésenchyme sous-ectodermique. Il est donc probable qu'ET3 agisse sur la prolifération des mélanoblastes/mélanocytes dans le derme et sur leur migration vers l'épiderme. Dans l'épiderme, où l'expression d'ET3 perdure, les cellules de crête neurale sont sous l'influence directe du facteur. Il est à noter que les mélanoblastes prolifèrent activement avant de se différencier dans les germes plumaires, où ils produisent de la mélanine à partir de E9.

Ainsi, chez les oiseaux, ET3 s'exprime dans l'environnement de deux lignages de cellules de crête neurale qui possèdent le récepteur EDNRB ou EDNRB2 : le système nerveux entérique et le lignage mélanocytaire respectivement.

4. Étude de l'action de ET3 *in vitro* sur les cellules de la CN troncale²

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'ET3 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'ET3 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.

2. Lahav, R., Ziller, C., Dupin, E. and Le Douarin, N.M. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3892-3897.

Afin d'identifier les potentialités de développement des cellules cibles de l'ET3 et de comprendre comment ce facteur agit sur leur différenciation, nous avons étudié l'effet de ET3 sur les cellules de CN de caille en cultures clonales. La méthode utilisée est celle que nous avons développée précédemment au laboratoire ; elle consiste à ensemencer les cellules individuellement sous examen microscopique, sur une couche de cellules nourricières et en présence d'un milieu enrichi permettant l'expression la plus large du répertoire phénotypique des cellules de la CN.

Les résultats de ces expériences confirment que l'ET3 a une action mitogénique et promotrice de la mélanogénèse sur les cellules de la CN troncale *in vitro*. De plus, ils révèlent un effet stimulateur de l'ET3 sur un autre lignage dérivé de la CN, celui des cellules gliales exprimant le marqueur SMP.

L'analyse quantitative des clones obtenus en présence et en absence de l'ET3 permet d'en caractériser le rôle. Un effet sur la survie des cellules de CN est pour la première fois clairement démontré, leur capacité de générer une colonie étant augmentée d'un facteur 2,5. Cependant, cet effet ne concerne que certains précurseurs. L'ET3 stimule fortement la survie des précurseurs mélanocytaires, qu'ils soient déterminés ou bipotents, c'est-à-dire capables de donner naissance à des mélanocytes et des cellules gliales (la capacité clonogénique de ces précurseurs étant augmentée d'un facteur 13 à 16). Une action sur la survie de précurseurs gliaux unipotents, plus modérée, est également observée. Les autres types de progéniteurs mis en évidence dans cette étude, tels que les progéniteurs communs aux neurones et cellules gliales, et les cellules multipotentes également capables de fournir des mélanocytes, sont obtenus avec une fréquence comparable en présence ou non d'ET3. Ceci montre que l'ET3 ne modifie pas le choix de différenciation des cellules de CN de façon instructive, en favorisant un phénotype au détriment d'un autre ; l'action de l'ET3 est de nature sélective et consiste à promouvoir la survie des précurseurs des cellules gliales et pigmentaires unipotents et bipotents, sans altérer le devenir des autres types de progéniteurs. A cette action de l'ET3 s'ajoute une forte stimulation de la prolifération cellulaire qui s'exerce elle aussi de façon spécifique sur la descendance des précurseurs mélanocytaires et gliaux. Ainsi le rôle positif que l'ET3 joue sur la survie et la multiplication de ces précurseurs a pour conséquence une expansion des mélanocytes et des cellules gliales produits par les cellules de la CN troncale en culture.

Parallèlement à cette analyse phénotypique, nous avons étudié l'expression des récepteurs de l'ET3 par les cellules de la CN cultivées en présence ou non d'ET3. Après hybridation *in situ* à l'aide de ribosomes marqués par la digoxigénine, il apparaît que des sous-populations de cellules de CN expriment *in vitro* les transcrits de EDNRB et EDNRB2 dès le début de la culture et que l'expression de ces deux récepteurs est fortement augmentée lors de la phase de prolifération cellulaire observée après addition de l'ET3. La stimulation de l'expression de EDNRB par l'ET3 est transitoire, tandis que celle de EDNRB2 se poursuit lorsque

les cellules pigmentaires exprimant ce récepteur se différencient. Ces résultats montrent donc que EDNRB et EDNRB2 sont tout deux impliqués dans l'action sélective de ET3 sur le développement des cellules des lignages glial et pigmentaire ; EDNRB2 contrôle l'expansion spectaculaire des mélanocytes provoquée par l'ET3, tandis que EDNRB est vraisemblablement le médiateur de l'augmentation par l'ET3 de la survie et de la prolifération des cellules gliales.

5. ET3/EDNRB et le système nerveux entérique

L'implication d'ET3 et d'EDNRB dans le développement des plexus nerveux entériques est démontrée par l'absence d'innervation intrinsèque de la portion distale du tube digestif (générant un mégacolon ou maladie de Hirschsprung) qui résulte de mutations spontanées ou ciblées des gènes codant pour le facteur et son récepteur. De plus, nous avons constaté la présence du messenger d'ET3 dans le mésenchyme intestinal embryonnaire d'oiseau et de celui d'EDNRB dans les cellules du système nerveux entérique.

Pour l'essentiel, le système nerveux entérique dérive de la crête neurale vagale, qui émerge du tube neural au niveau des sept premiers somites rostraux. Les cellules de la crête neurale vagale colonisent le mésenchyme du tube digestif selon une progression rostro-caudale. Chez le poulet et la caille, elles atteignent le rectum à E6-E7.

Nous avons étudié la réponse des cellules de la crête neurale vagale à ET3 en culture. L'effet du facteur est discret, beaucoup plus faible que dans le cas des cellules du niveau troncal. Seule une petite sous-population cellulaire réagit à ET3 par une prolifération accrue. Or, par hybridation *in situ*, nous détectons la présence de transcrits EDNRB dans un nombre relativement petit de cellules (environ 5-10 %) au premier jour de culture. Ce nombre n'est pas significativement plus élevé dans des cultures équivalentes de cellules de crête troncale. Par contre, EDNRB2 est beaucoup plus représenté dans les cultures de crête troncale que dans celles de crête vagale (environ 6 fois plus). Il est à noter que contrairement aux cultures de crête troncale, les cultures de cellules du niveau vagal produisent peu de mélanocytes, même en présence d'ET3.

L'effet d'ET3, observé *in vitro* sur les cellules de crête neurale lorsqu'elles ont colonisé l'intestin à E7 est beaucoup plus net. Ces cellules peuvent être obtenues à l'état de quasi-pureté par tri cellulaire par cytofluorométrie de flux, grâce à l'anticorps HNK1 qui reconnaît spécifiquement les cellules dérivées de la crête neurale au sein du mésenchyme intestinal. Ces cellules prolifèrent très activement en culture, en milieu témoin comme en présence d'ET3. Toutefois, sous l'influence du facteur, leur nombre est augmenté de 2,5 à 3 fois par rapport au nombre de cellules témoins, en sept jours de culture. Il est donc vraisemblable que dans l'embryon une expansion significative de cette population cellulaire due à ET3 a lieu dans le mésenchyme intestinal.

6. Patrons d'expression du récepteur EDNRA et de son ligand l'endothéline 1 chez l'embryon d'oiseau (Nataf *et al.*, 1998)

Les mutations des gènes codant pour l'endothéline 1 (ET1) et pour son récepteur EDNRA affectent le développement des dérivés mésodermiques de la crête neurale céphalique. Nous avons analysé par hybridation *in situ* l'expression de ces gènes au cours du développement de l'embryon de poulet, du stade de 12 somites jusqu'à E12, en nous intéressant plus particulièrement aux dérivés céphaliques de la crête neurale.

Au stade 12 somites, les cellules émergeant du tube neural n'expriment pas de transcrits du gène du récepteur A. Par contre, à tous les stades ultérieurs que nous avons examinés, les cellules dérivées de la crête neurale céphalique sont EDNRA positives. Quant aux transcrits d'ET1, ils sont détectés dans l'environnement des cellules de crête neurale céphalique en migration : arcs branchiaux, ectoderme superficiel, vésicules optiques. A E3 et E4, ET1 et EDNRA sont exprimés tous deux dans les arcs branchiaux et leurs expressions sont complémentaires, celle du gène du récepteur étant restreinte aux cellules dérivées de la crête neurale alors que les transcrits du gène codant pour le ligand sont représentés dans l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme des arcs branchiaux. Il apparaît donc que les deux molécules ET1 et EDNRA sont produites en même temps lors d'étapes décisives des interactions épithélio-mésenchymateuses au cours de l'organogenèse des arcs branchiaux.

B. Contribution de la crête neurale sacrée au système nerveux entérique post-ombilical

Nous avons étudié la migration des cellules de crête neurale dans l'intestin en développement et cherché à déterminer si la crête neurale de la région sacrée produit des neurones et des cellules gliales entériques : cette question fait l'objet d'une controverse depuis trente ans.

Nous avons utilisé la méthode de transplantation caille-poulet, en combinaison avec des marquages immunocytochimiques, pour identifier à la fois les cellules dérivées du greffon (c'est-à-dire de la caille) et les cellules neurales (neurones et glie). Nous constatons que les cellules de la crête neurale vagale migrent ventralement et s'accumulent dans les arcs branchiaux postérieurs avant de pénétrer dans l'intestin antérieur. Puis elles progressent en direction proximo-distale et colonisent l'intestin sur toute sa longueur à E8,5. Les cellules de la crête neurale vagale empruntent différentes voies de migration au sein de la paroi intestinale, selon la région qu'elles colonisent. Dans l'intestin pré-ombilical, elles se distribuent dans l'ensemble du mésenchyme splanchnopleural, alors que dans l'intestin post-ombilical, elles migrent dans les couches externes de la paroi, sous la séreuse. En arrière du front de migration, les cellules de crête neurale se répartissent des deux côtés de la couche de muscles circulaires en développement, pour former les futurs plexus d'Auerbach et de Meissner. Dans le colorectum, les cellules de

crête neurale vagale migrent d'abord dans la région sous-muqueuse, du côté interne de la couche musculaire circulaire, puis elles traversent celle-ci en longeant les vaisseaux sanguins, et colonisent la région du futur plexus myentérique. Les cellules de la crête neurale sacrée fournissent la totalité du ganglion de Remak. D'autre part, nous les observons dans le colorectum à partir de E7,5. Elles se localisent tout d'abord dans la région du futur plexus myentérique et sont associées à des fibres émanant du ganglion de Remak. Un petit nombre d'entre elles migrent vers l'intérieur de la paroi à travers la couche musculaire circulaire et colonisent les ganglions du plexus sous-muqueux. A partir de E10-12, le nombre de cellules de crête neurale sacrée présentes dans l'intestin augmente considérablement. Bien qu'il en existe dans tout l'intestin post-ombilical, les cellules de crête neurale sacrée sont surtout nombreuses dans la portion distale du colorectum, où elles représentent jusqu'à 17 % des neurones entériques, identifiés par le marqueur neuronal ANNA-1 ; elles produisent aussi des cellules gliales, reconnues par l'anticorps anti-GFAP.

Cette étude montre donc que les cellules de crête neurale suivent des voies de migration spécifiques pour coloniser l'intestin. Nous démontrons d'autre part qu'en plus des cellules de crête neurale vagale, qui forment la plus grande partie du système nerveux entérique, des cellules dérivées de la région sacrée de la crête neurale fournissent aussi des neurones et de la glie au système nerveux entérique, en particulier dans le colorectum distal.

C. Rôle des gènes *Hox* dans le développement des structures squelettiques de la face

En plus des dérivés neuraux, endocrines et pigmentaires, la crête neurale se caractérise par son aptitude à produire des cellules mésenchymateuses. Chez les Vertébrés Amniotes, cette propriété est limitée à la région céphalique s'étendant du milieu du diencéphale à l'extrémité du 8^e rhombomère (r8, niveau somitique 4/5). La crête neurale céphalique est subdivisée en deux domaines : une région antérieure correspondant aux diencéphale, mésencéphale et métencéphale (r1, r2), dans laquelle on n'observe jamais aucune expression des gènes *Hox*, et un domaine postérieur dans lequel les cellules de crête neurale (CCN) expriment (à quelques exceptions près) le même code *Hox* que les rhombomères dont elles proviennent. Par des manipulations appropriées sur les embryons, nous avons modifié la distribution normale des CCN dans les arcs branchiaux (AB), et analysé les relations entre l'expression des gènes *Hox* et le degré de plasticité des CCN lorsqu'elles sont amenées à migrer dans un environnement ectopique.

Nous constatons i) que l'expression des gènes *Hox* dans les CCN n'est pas modifiée par leur transposition dans des sites ectopiques, ii) que l'expression des gènes *Hox* par l'ectoderme des AB ne dépend pas d'une induction par la crête neurale. Cette deuxième observation renforce le concept d'une segmentation de

l'ectoderme céphalique en ectomères³. Selon ce concept, les métamères peuvent être considérés comme de larges bandes d'ectoderme comprenant non seulement le système nerveux central et la crête neurale mais aussi l'ectoderme superficiel correspondant, qui est destiné à couvrir les ébauches craniofaciales. iii) La construction de la mâchoire inférieure requiert l'environnement créé par les composants ectomésodermiques de l'AB1 ou de l'AB2, associés avec les CCN qui n'expriment pas les gènes *Hox*. Les CCN qui expriment les gènes *Hox* ne sont pas capables de fournir l'appareil mandibulaire comprenant l'entoglosse et la basihyal, même dans l'environnement de l'AB1. En revanche, la partie postérieure de l'os hyoïde peut être construite par les CCN de toute région, qu'elles soient ou non sous le contrôle régulateur des gènes *Hox*. Tel est le cas également des tissus neuraux et conjonctifs (y compris ceux du système cardiovasculaire) provenant de la crête neurale, sur lesquels aucune restriction segmentaire ne s'exerce. Cette deuxième observation confirme la plasticité mise en évidence il y a 24 ans⁴ pour les précurseurs du système nerveux périphérique.

D. La crête neurale mésencéphalique joue un rôle essentiel dans le développement du cerveau antérieur

La carte des territoires présomptifs de la plaque neurale de la jeune neurula (environ 30 heures d'incubation), faite précédemment dans le laboratoire en utilisant le système des chimères caille/poulet⁵, a révélé que le territoire présomptif du télencéphale se situe juste à l'intérieur des bords latéraux de la plaque neurale antérieure. Cette partie du neuroépithélium est particulière, car la jonction entre l'ectoderme et la plaque neurale ne produit pas de crête neurale, comme c'est le cas plus postérieurement, mais participe à l'épithélium nasal et fournit la placode olfactive. Partout ailleurs dans la région céphalique et troncale, la crête neurale dérive de cette zone jonctionnelle. Les cellules de la crête se désépithélialisent au niveau de la soudure dorsale du tube neural avant de migrer latéralement et ventralement. La population des cellules de crête qui provient des niveaux diencéphalique et mésencéphalique rostral migrent vers l'avant et recouvrent le prosencéphale tout entier. Après avoir construit des chimères où le bourrelet neural diencéphalique et mésencéphalique de caille est greffé dans un hôte poulet, nous avons constaté la présence de cellules de crête neurale dans le mésenchyme recouvrant le prosencéphale à partir de 4 jours d'incubation (E4). Ces cellules deviennent ensuite les péricytes associés à l'endothélium des vaisseaux sanguins intracrâniens et formeront les méninges au niveau du prosencéphale.

Nous savons par des travaux précédents⁶ que la résection bilatérale des bourrelets neuraux du rhombencéphale est compensée par la prolifération et l'invasion

3. Couly, G. and Le Douarin, N.M. (1990). *Development* 108, 543-558.

4. Le Douarin, N.M. and Teillet, M.-A. (1974). *Dev. Biol.* 41, 162-184.

5. Couly, G.F. and Le Douarin, N.M. (1987). *Dev. Biol.* 120, 198-214.

6. Couly, G., Grapin-Botton, A., Coltey, P. and Le Douarin, N.M. (1996). *Development* 122, 3393-3407.

de cellules provenant du bourrelet neural laissé *in situ*. Après résection bilatérale des bourrelets neuraux antérieurs, sur une longueur telle que cette compensation ne peut atteindre le prosencéphale, celui-ci présente d'importantes déficiences. On ne trouve en fait chez les embryons que des vestiges ventraux du diencéphale ; le chiasma optique, les yeux et les hémisphères cérébraux ainsi que le thalamus sont absents. Chez l'embryon normal, ces structures contiennent des péricytes provenant de la crête neurale correspondant à l'ablation. Dans certains cas, les vésicules optiques se développent et fusionnent par suite de l'absence de la masse frontonasale et du télencéphale. Nous pouvons restaurer une morphologie normale en remplaçant les bourrelets excisés par leur équivalent pris chez la caille. Cette expérience confirme que la résection n'a pas touché le territoire présomptif du télencéphale. La présence du télencéphale est mise en évidence par sa morphologie et l'expression du marqueur *Emx2*. Des greffes hétérotopiques des bourrelets neuraux ont montré que les cellules de la crête neurale rhombencéphalique, mais pas celles du tronc, sont aussi capables de compenser la déficience générée par l'ablation de crête neurale diencéphalique et mésencéphalique. Tout en gardant leurs caractéristiques moléculaires intrinsèques, elles se différencient en péricytes et méninges dans leur nouvel environnement, alors que ce rôle est joué par le mésoderme dans leur emplacement d'origine.

Toujours par la méthode caille/poulet, nous explorons les capacités du mésoderme céphalique à fournir des péricytes au prosencéphale. Nous savons maintenant qu'une greffe hétérotopique de mésoderme du niveau mésencéphalique, qui donne naissance aux péricytes et aux méninges du mésencéphale, peut en fournir également au prosencéphale et partiellement compenser la résection de la population la plus antérieure de la crête neurale. *In vitro*, la crête neurale et le mésoderme mésencéphaliques expriment une isoforme d'actine spécifique du muscle lisse, qui est présente dans les péricytes, et qui représente une des caractéristiques partagées entre ces deux populations. Nous examinons actuellement la nature d'une éventuelle activité trophique produite par la crête neurale mésencéphalique qui agirait sur la croissance du prosencéphale, et la capacité du mésoderme le plus antérieur à exercer cette activité.

E. L'origine des oligodendrocytes : définition des territoires du neuroépithélium producteurs d'oligodendrocytes

Nous nous intéressons à divers aspects du développement du système nerveux central, en particulier aux migrations cellulaires qui concourent à son architecture. Les oligodendrocytes, cellules myélinisantes du système nerveux central, se différencient dans des localisations bien déterminées de la moelle épinière et du cerveau après avoir effectué, dans certains cas, des migrations considérables. L'utilisation de marqueurs précoces tels que des sondes nucléiques spécifiques de gènes codant pour des protéines de la myéline a conduit plusieurs groupes à considérer que ces cellules naissent exclusivement dans la moitié ventrale du tube nerveux dans des régions proches de la plaque de plancher (floor plate). Les

mêmes groupes ont cependant montré que des précurseurs d'oligodendrocytes reconnaissables par les mêmes marqueurs peuvent naître dans la partie dorsale du tube nerveux lorsque celle-ci est soumise expérimentalement *in vivo* ou *in vitro* à l'action de signaux ventraux en particulier à l'action de la protéine Sonic Hedgehog (SHH).

Nous examinons dans des chimères caille-poulet la production de précurseurs d'oligodendrocytes aux différents niveaux dorso-ventraux et rostro-caudaux de l'ébauche du système nerveux central. Nous disposons d'une sonde moléculaire spécifique des cellules myélinisantes de caille⁷ qui permet de mettre en évidence par hybridation *in situ* les oligodendrocytes issus des greffons. Cette sonde correspond à un gène exprimé spécifiquement par les oligodendrocytes dans le SNC et cloné au laboratoire (SMP). Les résultats d'une étude précédente⁸ avaient montré que la moitié dorsale du tube nerveux, substituée entre embryons de caille et de poulet à 2 jours d'incubation produit, comme la moitié ventrale, des précurseurs d'oligodendrocytes migrant dorsalement et ventralement dans la moelle en formation pour occuper la totalité de la substance blanche. Ces résultats étant en contradiction avec l'hypothèse d'une origine strictement latéro-ventrale des précurseurs d'oligodendrocytes, nous avons complété ces travaux et effectué des greffes à des stades beaucoup plus précoces, lorsque la plaque neurale est encore ouverte au stade de 5-6 somites. Dans ces conditions les limites dorso-ventrales de la greffe sont mieux contrôlées.

Nous avons obtenu les résultats suivants : après la greffe unilatérale d'un fragment de bourrelet neural, le quart dorsal ipsilatéral de moelle épinière est formé de cellules de caille et des cellules de crêtes neurales marquées migrent du côté greffé et contralatéralement⁹. A 15 jours d'incubation, des oligodendrocytes de caille sont présents dans toute la moitié dorso-ventrale de la moelle épinière au niveau considéré, confirmant que la moitié dorsale du tube nerveux troncal produit dans le développement normal des oligodendrocytes répartis dorso-ventralement dans la moelle épinière. Dans le cas de greffes strictement dorsales, où le nombre de cellules marquées est très restreint au niveau de l'épendyme dorsal les oligodendrocytes de caille sont peu nombreux. Cependant, on les trouve encore largement répartis dorso-ventralement dans la moelle épinière. Une étude dynamique de la mise en place de ces cellules montre qu'un certain nombre d'entre-elles vient se localiser à partir de 6 jours d'incubation au voisinage de l'épithélium ventriculaire dans la région ventro-latérale, là où divers marqueurs localisent les précurseurs des oligodendrocytes. Cette localisation fugitive pourrait être le passage obligé pour l'induction des oligodendrocytes ? (Teillet, Schuler et Le Douarin, en préparation).

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

8. Cameron-Curry, P. and Le Douarin, N.M. (1995). *Neuron* 15, 1299-1310.

9. Catala, M., Teillet, M.A., de Robertis, E.M. and Le Douarin, N.M. (1996). *Development* 122, 2599-2610.

Au niveau céphalique, des greffes affectant séparément les vésicules prosencéphalique, mésencéphalique et rhombencéphalique au stade de 12 à 14 somites, montrent que les faisceaux prosencéphaliques latéraux sont peuplés de cellules venant de la jonction diencéphalo-mésencéphalique et que le cervelet reçoit des oligodendrocytes de pratiquement toutes les grandes régions du cerveau, diencéphale, mésencéphale et rhombencéphale (Teillet, Schuler et Le Douarin, en préparation). L'hypothèse d'une origine commune des précurseurs des oligodendrocytes et des fibres nerveuses qu'ils accompagnent est en cours d'étude.

2. LA NEURULATION CHEZ LES VERTÉBRÉS AMNIOTES REVISITÉE :

La différenciation de la floor plate du tube nerveux n'implique pas une induction de la notochorde

Le système nerveux des Vertébrés est caractérisé par l'établissement précoce de polarisations rostro-caudale et dorso-ventrale qui se traduisent par des schémas spécifiques d'expression génique. Il est généralement admis que la notochorde ou mésoderme axial produit des signaux qui, en conjonction avec des signaux issus des régions latérales de l'embryon, ont pour effet de polariser dorso-ventralement le tube nerveux¹⁰. Des expériences précédentes que nous avons réalisées en utilisant le système des chimères caille-poulet^{11,12} nous ont permis de montrer que le plancher du tube neural ou *floorplate* ainsi que la notochorde et l'endoderme médian sous-jacent sont issus d'une structure unique appelée nœud de Hensen ou *cordoneural hinge* (CNH) qui marque le centre du sinus rhomboïdal au stade de 5-6 somites pendant la neurulation primaire, et se trouve à la limite rostrale du bourgeon caudal pendant la neurulation secondaire. Cette observation apporte un éclairage nouveau sur les processus de neurulation et d'élongation de l'embryon de Vertébré. Elle montre en particulier que le matériel qui constitue le nœud de Hensen considéré comme l'équivalent de la lèvre dorsale du blastopore des amphibiens, fonctionne comme la source de toutes les cellules de la ligne médiane (*floorplate*, notochorde, endoderme dorsal) c'est-à-dire de toutes les cellules qui constituent l'axe de symétrie bilatérale de l'embryon. Il est intéressant d'étudier les rapports entre ces différentes catégories cellulaires au cours du développement.

Nous avons étudié dans la région du nœud de Hensen-CNH et dans les structures qui en sont issues le schéma d'expression de deux gènes : *HNF3 β* considéré comme le marqueur le plus précoce de la *floorplate* (Ruiz i Altaba *et al.*, 1993) et *Sonic hedgehog* (*Shh*) dont le produit est généralement considéré comme le médiateur de l'induction de la *floorplate*. *HNF3 β* est exprimé dès le stade « ligne primitive » dans le nœud de Hensen, puis dans le nœud, la noto-

10. Tanabe, Y. and Jessell, T.M. (1996). *Science* 274, 1115-1123.

11. Catala, M., Teillet, M.A. and Le Douarin, N.M. (1995). *Mech. Dev.* 51, 51-65.

12. Catala, M., Teillet, M.A., de Robertis, E.M. and Le Douarin, N.M. (1996). *Development* 122, 2599-2610.

chorde et la *floorplate* au fur et à mesure que ces deux dernières structures s'individualisent et que le nœud régresse caudalement. *HNF3β* reste exprimé fortement dans la *floorplate* tandis que la notochorde devient progressivement négative rostralement. A l'inverse, *Shh* n'est pas ou peu exprimé dans le nœud de Hensen à tous les stades ultérieurs à 5-6 somites. La notochorde est positive pour *Shh* dès qu'elle est en place et conserve une forte expression de ce gène au cours du développement. Par contre, les transcrits apparaissent dans la *floorplate* avec un certain délai par rapport à leur expression dans la notochorde.

Lorsqu'un nœud de Hensen de caille est greffé *in situ* chez un embryon de poulet au stade de 5-6 somites, les cellules qui en dérivent, CNH, *floorplate*, notochorde et endoderme médian sont parfaitement superposables au stade de 25 somites, avec les cellules *HNF3β*-positives qu'on vient de décrire. Si, à ce stade, la notochorde est excisée dans la région où le mésoderme somitique n'est pas segmenté et jusqu'à la région du CNH, on constate, sur des embryons témoins fixés immédiatement après l'opération, que l'expression de *HNF3β* peut être interrompue dans la région proche du CNH ; cette interruption correspond plus tard à une absence de l'ébauche de *floorplate*. Plusieurs heures plus tard, seule la région dépourvue de l'expression de *HNF3β* n'exprime pas *Shh*. Lorsque la même expérience est réalisée sur une chimère caille-poulet, une *floorplate* se différencie partout où des cellules de caille sont présentes dans le plancher du tube nerveux mais pas où elles sont absentes.

Ces expériences montrent d'une manière définitive que la *floorplate* une fois en place se différencie indépendamment de la présence de la notochorde démontrant ainsi que la notochorde n'est pas l'inducteur de la *floorplate*. La notochorde pourrait, au mieux, renforcer l'établissement du schéma médio-latéral ou ventro-dorsal déjà établi par l'insertion rostro-caudale de la *floorplate* dans la plaque neurale (Teillet, Lapointe and Le Douarin, sous presse).

Ces résultats amènent à reconsidérer d'une manière radicale le schéma classique de la neurulation chez les Vertébrés Amniotes et sans doute aussi chez l'ensemble des vertébrés.

3. DÉVELOPPEMENT DU MÉSODERME PARAXIAL

Le développement du mésoderme paraxial dépend largement de signaux moléculaires émanant des organes axiaux : tube nerveux, notochorde et du mésoderme de la lame latérale.

Nous avons poursuivi notre analyse des mécanismes de régulation de la formation de la colonne vertébrale, de la musculature striée à partir des éléments métamériques, les somites, formés par le mésoderme paraxial.

Les mécanismes de segmentation de ce dernier en somite ont été aussi l'objet d'une étude réalisée en collaboration avec le Dr Olivier Pourquié, un ancien

chercheur du laboratoire, actuellement à Marseille. Cette étude a permis de mettre en évidence le fonctionnement cyclique de gènes homologues des gènes « pair-rule » impliqués dans la segmentation chez la *Drosophile*.

A. BMPs et SHH dans le développement du mésoderme paraxial

1. Analyse de la cascade de signalisation des molécules BMP2/4 au cours de l'embryogenèse de l'oiseau

*1.1. Clonage de *qSmad1*, effecteur cytoplasmique de la réponse à BMP2/4*

La famille du « Transforming Growth Factor » β , un des plus grands groupes de facteurs de croissance et de différenciation connus, est formée par trois groupes de molécules aux activités extrêmement variées, les TGF β , les activines et les « Bone Morphogenetic Proteins » (BMPs). Les récepteurs membranaires de ces facteurs sécrétés sont des Sérine-Thréonines kinases transmembranaires, regroupées en un complexe tétramérique. En réponse à la fixation du ligand sur ce complexe, le domaine kinase du récepteur de type I phosphoryle un effecteur cytoplasmique de la famille Smad. Les molécules de la famille Smad sont les homologues de la molécule de *Drosophile* *Mother-against-dpp*. Elles ont été identifiées lors d'une recherche de gènes qui pourraient potentialiser le phénotype de mutants faibles de *dpp*, l'homologue de *Drosophile* des gènes BMP2 et BMP4. Les protéines codées par ces gènes ne présentent aucun motif structural connu. Parmi l'ensemble de ces molécules, il a été démontré que *Smad1* répond à l'activation par BMP2 ou BMP4, tandis que *Smad 2* est activée par les activines et le TGF β . Une fois activées par phosphorylation, les Smads 1 ou 2 sont associées avec d'autres membres de la famille puis deviennent nucléaires et participent au complexe de transcription des gènes-cibles. Des études de plus en plus nombreuses montrent que la réponse aux BMPs est modulée — activation ou répression — au niveau cytoplasmique, selon la protéine Smad concernée.

Nos travaux antérieurs ont démontré l'importance de la molécule BMP4 au cours de l'embryogenèse du système nerveux et de la vertèbre. Dans le but d'approfondir notre connaissance de l'ensemble de la cascade de signalisation de BMP4, nous avons cloné l'homologue aviaire de *Smad1*. Nous avons isolé par PCR un court fragment qui nous a servi de sonde pour le criblage d'une banque d'ADNc de Caille. Nous avons obtenu un clone entier de 2,9 kb, *qSmad1*, qui a été séquencé. La protéine putative codée par ce gène comporte 466 acides aminés, elle présente une forte homologie avec les gènes humain et murin, un peu plus faible avec le gène de xénope. La forte conservation est retrouvée au niveau des deux domaines conservés MH1 et MH2, tandis que la région « linker » est plus variable.

L'isolement de cette molécule nous fournit un outil pour l'étude directe du rôle de BMP4 : l'emploi d'une forme activée de *qSmad1* nous servira à déclencher la cascade de réponse à BMP4 *in vivo* et *in vitro*.

1.2. Analyse au cours de l'embryogenèse précoce de l'expression de BMP4, des récepteurs de type IA et IB, de *qSmad1* et d'un antagoniste de BMP4, *Noggin*

En dépit du vif intérêt pour la molécule BMP4 au cours du développement de l'oiseau, l'analyse détaillée de l'expression des récepteurs à ce facteur et des Smads restait à réaliser. Nous avons mené une comparaison des patrons d'expression des différents membres de la cascade de signalisation de BMP4 : BMP4 lui-même, les récepteurs de type I (IA et IB), l'effecteur cytoplasmique *qSmad1*, et l'antagoniste de BMP4, *noggin*. (Nous remercions le Dr Lee Niswander (New York, USA) pour le don des sondes *BMPR IA*, *IB* et *noggin*). Les grandes lignes issues de cette comparaison sont :

— *BMPR IA* ne présente pas d'expression forte dans aucun tissu. Il est exprimé à faible niveau dans le tube neural, la notochorde, les somites et le pharynx.

— *BMPR IB* s'exprime dans la partie dorsale du tube neural, les somites puis s'intensifie dans le dermomoyotome. Il ne s'exprime pas dans le mésoderme paraxial non segmenté.

— L'analyse des gènes homologues de *qSmad 1* effectuée dans d'autres espèces avait conclu à une expression ubiquitaire au cours du développement. Nous montrons qu'aux très jeunes stades, *qSmad 1* présente une expression spécifique intéressante, notamment dans la notochorde et la plaque neurale. L'expression est généralisée dès le stade 15 somites, à l'exception du mésoderme paraxial non segmenté. Dès E4,5, certaines structures neurales (DRG, ganglions céphaliques...) présentent un fort niveau d'expression du gène, au-dessus du niveau basal, spécifique, retrouvé dans tous les tissus.

L'analyse détaillée des patrons d'expression des gènes *Bmp4* et *Noggin* a également été réalisée : l'étude comparative de l'ensemble de la cascade de signalisation de BMP4 est donc applicable aux systèmes embryonnaires désirés.

2. Antagonisme entre SHH et BMP4 lors de la polarisation dorsoventrale de la vertèbre

Nous avons poursuivi nos travaux précédents sur la régulation du développement de la partie dorsale de la vertèbre ; nous avons montré notamment que la notochorde ou la plaque du plancher inhibent la formation du domaine dorsal, et empêchent l'expression des gènes *Msx*. Nous avons étendu ces résultats en montrant que la notochorde a également un rôle négatif sur l'expression du gène *Bmp4*, ce qui est sans doute la cause de l'absence d'expression des gènes *Msx* dans ces conditions. De plus, l'emploi d'une lignée de cellules produisant le facteur Sonic Hedgehog (SHH), normalement produit par la notochorde et la plaque du plancher, nous a permis de montrer que les effets de la notochorde sont parfaitement mimés *in vivo* par la molécule SHH : l'expression des gènes *Bmp4*, *Msx1* et *Msx2* est abolie ainsi que la différenciation ultérieure du cartilage dorsal de la vertèbre.

Cette étude a confirmé par ailleurs que la partie dorsale du tube neural ne répond pas aux signaux ventralisateurs (SHH) comme le font les parties latérale et ventrale. Nous avons montré que la notochorde greffée au-dessus du tube neural dorsal à E2 induit l'expression de Pax6 dorsalement, inhibe l'expression des gènes dorsaux (Pax3, Msx1, Msx2, Dsl1) dès E4, puis bloque le développement de la moitié dorsale de la moelle épinière dès E7. Nous n'avons pas pu observer la formation de cellules différenciées de type ventral (motoneurones). Ici, la greffe dorsale de cellules produisant SHH montre que l'expression des marqueurs ventraux peut être induite par les cellules SHH (Pax6) ou bien retardée de plusieurs jours (SHH à E5) ou encore jamais induite (HNF3 β). La partie dorsale de la moelle épinière semble donc posséder son propre programme de développement, qui devrait être d'abord aboli avant l'induction d'un programme de type ventral. Ce délai pourrait être la cause de la dégénérescence observée dès E7.

3. SHH sécrétée par la *floorplate* et la notochorde est un facteur de survie pour le mésoderme paraxial

Dans des expériences précédentes^{13,14}, nous avons observé que l'ablation des organes axiaux (tube nerveux et notochorde) chez des embryons de poulet de 2 jours avait pour conséquence une mort cellulaire massive dans les somites et l'absence de vertèbres, côtes et muscles axiaux alors que les muscles des membres et de la paroi du corps se développaient normalement. La présence de la notochorde seule suffisait à préserver certains muscles dorsaux et une partie des vertèbres. Cette constatation allait à l'encontre du fait généralement admis que la notochorde et la moitié ventrale du tube nerveux induisent le sclérotome (cartilage) et que la moitié dorsale du tube nerveux induit le dermomyotome (derme et muscles) dans les somites. Nous avons voulu savoir quel était le rôle des différents composants du complexe tube neural-notochorde dans la survie et la différenciation des somites.

La mort cellulaire dans les somites est mise en évidence 18 à 24 heures après l'ablation, avec le colorant sulfate bleu de Nil *in toto* ou avec la méthode de TUNEL sur des coupes. Au même stade, des hybridations *in situ* avec les sondes appropriées montrent une absence totale d'expression du gène *Pax1* (sclérotome) et *MyoD* (myotome) limitée à la région excisée. *Pax3* (dermomyotome) reste partiellement exprimé. La chronologie de disparition de *Pax1* (entre 6 et 12 heures) montre que des somites acquièrent ce gène après l'ablation, avant de subir la mort cellulaire. *Pax1* et *MyoD* sont restaurés exclusivement avec la greffe de la moitié ventrale du tube nerveux ou de la notochorde ou de cellules programmées pour sécréter la protéine SHH dont le gène est exprimé dans ces deux structures au stade considéré. La greffe de l'un ou l'autre de ces tissus ou

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

14. Rong, P.M., Teillet, M.A., Ziller, C. and Le Douarin, N.M. (1992). *Development* 115, 657-672.

des cellules SHH à la place du complexe tube neural-notochorde permet une morphogenèse remarquablement harmonieuse avec des vertèbres et côtes, ainsi que des muscles dorsaux. Ces expériences soulignent le rôle des cellules médianes dans le schéma d'organisation de l'embryon. Un de leur rôle est en effet de fournir les facteurs trophiques qui permettent la survie du mésoderme paraxial. SHH est un de ces facteurs trophiques mis en évidence ici d'une manière directe (Teillet *et al.*, 1998).

B. Différenciation des muscles squelettiques

Chez l'embryon, les muscles dérivent des somites situés de part et d'autre du tube neural. Ces derniers donnent naissance à deux populations de myoblastes, l'une à l'origine de la musculature axiale, l'autre formant les muscles des membres¹⁵. Le développement de ces deux populations de myoblastes ne relève pas des mêmes mécanismes de régulation. Celui des muscles axiaux dépend de signaux émanant du tube neural et de la notochorde alors que ces structures n'influencent pas la différenciation de la musculature périphérique¹⁶. L'organisation des muscles des membres dépend de signaux provenant du bourgeon de membre lui-même. La morphogenèse du membre chez l'embryon est contrôlée par l'expression d'un certain nombre de gènes, notamment de facteurs de croissance tels que FGF-4 qui est impliqué dans la croissance proximo-distale du futur membre¹⁷ et SHH impliqué dans la détermination de l'axe antéro-postérieur¹⁸. Nous avons recherché si ces molécules, dont le rôle dans l'organisation des axes de polarité du bourgeon de membre est bien établi, interviennent aussi dans les processus plus tardifs de différenciation cellulaire. Il a ainsi déjà été montré que le facteur BMP-2, responsable du lien entre l'activité polarisante (sous le contrôle de SHH) et de la croissance proximo-distale (sous le contrôle de FGF-4) joue un rôle dans la formation du cartilage de l'aile^{19, 20}. Nous avons donc entrepris l'étude des rôles respectifs des facteurs FGF-4 et SHH dans le développement de la musculature squelettique chez l'embryon de poulet en utilisant une approche de surexpression rétrovirale *in ovo*.

1. Rôle de la protéine sonic hedgehog (SHH) dans la myogenèse

1.1. Rôle de SHH dans la myogenèse périphérique

Dans le but de comprendre le rôle de SHH au cours de la myogenèse périphérique, nous avons surexprimé le gène *Shh* codant pour cette protéine au niveau

15. Ordahl, C.P. and Le Douarin, N.M. (1992). *Development* 114, 339-353.

16. Rong, P.M., Teillet, M.A., Ziller, C. and Le Douarin, N.M. (1992). *Development* 115, 657-672.

17. Niswander, L. and Martin, G.R. (1993). *Development* 119, 287-294.

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

19. Duprez, D.M., Kostakopoulou, K., Franciswest, P.H., Tickle, C. and Brickell, P.M. (1996a). *Development* 122, 1821-1828.

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

même du bourgeon d'aile en utilisant le système des rétrovirus. Des cellules exprimant la construction *Shh/RCAS* ont été greffées au niveau du bourgeon d'aile. L'analyse des marqueurs musculaires montrent que la surexpression de SHH dans le bourgeon d'aile conduit à l'augmentation des domaines d'expression des gènes *Pax-3* et *MyoD* et de celui de la protéine myosine. Ces modifications d'expression sont suivies d'une hypertrophie musculaire.

Dans le but de reproduire *in vitro*, les effets observés lors de la surexpression de SHH *in vivo*, des cultures primaires de cellules musculaires, réalisées à partir de la dissociation soit des masses musculaires dorsale et ventrale du bourgeon de membre soit des pectoraux d'embryons de 7 jours ont été entreprises. Ces cultures ont été mises en présence du surnageant des cellules transfectées par la construction *Shh/RCAS*. Quarante-huit heures après, la majorité des cellules musculaires exprimaient l'ARNm *Shh*. Les puits traités avec le milieu conditionné par SHH présentent une forte augmentation du nombre de cellules musculaires en comparaison avec les puits non traités. Après 48 heures de culture, le nombre des cellules dans les puits traités avec SHH est augmenté d'un facteur deux par rapport aux puits non traités. Des études d'incorporation de BrdU *in vitro* montrent que le pourcentage d'incorporation est deux fois plus important dans les cellules musculaires traitées avec SHH que dans les cellules contrôles. Ces résultats démontrent donc que SHH augmente la prolifération des cellules musculaires.

Les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* suggèrent de plus que SHH exprimée au niveau de la ZPA intervient dans la prolifération des cellules Pax-3-positives après leur migration au niveau du bourgeon d'aile. Ce travail a fait l'objet d'une publication (Duprez *et al.*, 1998).

1.2. Rôle de SHH dans la myogenèse axiale

Des études similaires ont été entreprises au niveau axial, dans le but de vérifier si SHH exprimé au niveau du complexe notochorde/partie ventrale du tube neural joue un rôle similaire à celui observé dans le bourgeon de membre, au niveau de la myogenèse somitique. Dans le but d'obtenir une expression ectopique localisée, une lignée de cellules fibroblastiques de caille (QT6) produisant de manière stable la protéine SHH aviaire, a été établie (Duprez *et al.*, 1998).

Des greffes *in vivo* de cellules produisant SHH ont été effectuées au niveau des somites à différents stades du développement. Les conséquences de ces greffes ont tout d'abord été analysées au niveau moléculaire. Les premiers résultats montrent que des greffes de cellules produisant SHH entraînent une augmentation du domaine d'expression de *Pax-1*, marqueur du sclérotome. De même, une surexpression de SHH latéralement au somite, 24 heures après la greffe, augmente le domaine d'expression de *MyoD*. Trois jours après la greffe, le domaine de *MyoD* est largement étendu, ce domaine est aussi MF20 positif (l'anticorps MF20 reconnaît une forme embryonnaire de myosine). Ces résultats montrent que SHH est également capable d'induire une hypertrophie de la musculature axiale.

2. Étude du rôle de FGF-4 (Fibroblast Growth Factor-4) dans la différenciation musculaire squelettique axiale et périphérique chez le poulet, *in vivo*

De nombreux travaux *in vitro* ont montré un rôle important des FGFs dans la régulation de la myogenèse. L'addition des FGFs en culture conduit à l'activation de la prolifération des myoblastes et à l'inhibition de leur différenciation, et ce de manière indépendante²¹. Le mécanisme d'inhibition de la différenciation myogénique ferait intervenir une répression des facteurs myogéniques (*MyoD* et *Myf-5*) par les FGFs²². Ces résultats bien documentés *in vitro* sont en apparence contradiction avec l'expression endogène des FGFs dans les cellules musculaires post-mitotiques et différenciées^{23, 24}. Il a également été montré qu'une partie des myoblastes qui colonisent le bourgeon d'aile chez le Poulet requiert FGF-2 pour sa différenciation *in vitro*²⁵. Par ailleurs, la présence de FGF-6 à faible concentration stimulerait l'expression de certains marqueurs musculaires dans les cellules de la lignée C2, alors que de plus fortes concentrations de FGF-6 inhiberaient ces mêmes marqueurs musculaires et retarderaient la différenciation des cellules C2 en myotubes²⁶. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle plus complexe de ces facteurs dans les différentes étapes du développement musculaire.

2.1. Étude de l'expression de l'ARN messager *Fgf-4*

Les premiers résultats obtenus en utilisant une sonde spécifique du poulet²⁷ montrent une expression de *Fgf-4* dans les cellules musculaires post-mitotiques.

2.2. Expression ectopique de FGF-4

— Construction des rétrovirus recombinants pour FGF-4

La région codante du gène *Fgf-4* de souris (*mFgf-4*, don de Yvor Mason²⁸) a été insérée dans le rétrovirus RCAS-BP(A). La construction appelée *mFgf-4/RCAS-BP(A)* a été obtenue, son activité sur les cellules de Poulet a été vérifiée. Des cellules produisant *mFgf-4/RCAS* ont été greffées dans le flanc de l'embryon, entre les régions présomptives de l'aile et de la patte, c'est-à-dire entre les somites 20 à 25 d'embryons âgés de 25 à 30 somites. En effet, l'application de billes de FGF-4 recombinant dans la région du flanc induit la formation d'un bourgeon de

21. Olson, E.N. (1992). *Dev. Biol.* 154, 261-272.

22. Molkenin, J.D. and Olson, E.N. (1996). *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 445-453.

23. Joseph-Silverstein, J., Consigli, S.A., Lyser, K.M. and Ver Pault, C. (1989). *J. Cell Biol.* 108, 2459-2466.

24. de Lapeyriere, O., Ollendorf, V., Planche, J., Ott, M., Pizette, S., Coulier, F. and Birnbaum, D. (1993). *Development* 118, 601-611.

25. Seed, J. and Hauschka, S.D. (1988). *Dev. Biol.* 128, 40-49.

26. Pizette, S., Coulier, F., Birnbaum, D. and de Lapeyriere, O. (1996). *Exp. Cell Res.* 224, 143-151.

27. Niswander, L., Jeffrey, S., Martin, G.R. and Tickle, C. (1994). *Nature* 371, 609-612.

28. Mahmood, R., Bresnick, J., Hornbruch, A., Mahony, C., Morton, N., Colquhoun, K., Martin, P., Lumsden, A., Dickson, C. and Mason, I. (1995). *Curr. Biol.* 5, 797-806.

membre surnuméraire²⁹. Les greffes de cellules produisant mFgf-4/RCAS entraînent le même phénotype montrant que la protéine recombinante FGF-4 de souris produite par le virus est active chez le Poulet *in vivo*.

— Greffes des cellules produisant mFgf-4/RCAS

Les culots de cellules produisant la construction mFgf-4/RCAS ont été transplantés dans le mésoderme somatopleural au niveau du bourgeon d'aile d'embryons de stades 17/18 (E3), au moment où les premières cellules du myotome colonisent le futur membre. On observe alors chez les embryons expérimentaux âgés de 10 jours une hypertrophie de l'aile du côté greffé, non observée du côté contralatéral. L'analyse de coupes sériées provenant d'embryons expérimentaux âgés de 10 jours montre que dans l'aile infectée par le *Fgf-4* murin, un nombre réduit de cellules expriment *MyoD*. De même, aucune réactivité n'est observée avec l'anticorps MF20, reconnaissant la myosine embryonnaire. Ce type de myosine est par contre fortement exprimé dans les muscles de l'aile au niveau contralatéral.

Ces premières séries d'expériences semblent donc indiquer que l'expression ectopique de FGF-4 dans le bourgeon de membre inhibe la différenciation musculaire périphérique et induit une prolifération de cellules dont la nature (musculaire ou mésenchymateuse) reste à déterminer.

3. Rôle du facteur FRZB, « Frizzled Bone » dans la myogenèse périphérique

Des études moléculaires réalisées dans différentes espèces ont souligné une coopération entre les facteurs SHH et WNTs. Chez la *Drosophile*, il existe des interactions très étroites entre les facteurs sécrétés *Wingless* et *Hedgehog*³⁰. De plus, un rôle de la voie de signalisation de *Wingless* a été mis en évidence dans la différenciation musculaire chez la *Drosophile*^{31, 32}. Chez les Vertébrés, les facteurs SHH et WNT agissent en coopération sur l'organisation de la polarité du bourgeon de membre³³ et des somites³⁴. Par ailleurs, il a été suggéré que ces deux facteurs agissent en synergie dans l'activation de la myogenèse axiale^{35, 36}. Dans le but de comprendre les interactions moléculaires entre les voies de signalisation des facteurs SHH et WNT qui ont lieu au cours de la myogenèse périphérique, nous projetons d'inhiber la voie de signalisation des WNTs en

29. Cohn, M.J., Izpisua-Belmonte, J.C., Abud, H., Heath, J.K. and Tickle, C. (1995). *Cell* 80, 739-746.

30. Perrimon, N. (1994). *Cell* 76, 781-784.

31. Baylies, M.K., Martinez Aris, A. and Bate, M. (1996). *Development* 121, 3829-3837.

32. Ranganayakulu, G., Schulz, R.A. and Olson, E.N. (1996). *Dev. Biol.* 176, 143-148.

33. Yang, Y. and Niswander, L. (1995). *Cell* 80, 939-947.

34. Hirsinger, E., Duprez, D., Jouve, C., Malapert, P., Cooke, J. and Pourquie, O. (1997). *Development* 124, 4605-4614.

35. Munsterberg, A.E., Kitajewski, J., Bumcrot, D.A., McMahon, A.P. and Lassar, A.B. (1995). *Genes Dev.* 9, 2911-2922.

36. Maroto, M., Reshef, R., Munsterberg, A.E., Kœster, S., Goulding, M. and Lassar, A.B. (1997). *Cell* 89, 139-148.

surexprimant les facteurs FRZBs, « *Frizzled Bone* ». Les FRZBs sont des facteurs sécrétés qui possèdent des homologies de séquence avec celle de la partie N-terminale des protéines transmembranaires *Frizzled*^{37, 38}. Les molécules *Frizzled* sont considérées comme étant les récepteurs aux facteurs WNTs³⁹. Chez le Xénope, il a été montré que la surexpression de FRZB-1 inhibe l'action des facteurs WNTs^{40, 41, 42}. La démarche utilisée sera donc de surexprimer le facteur FRZB-1 *in vivo* en utilisant le système des rétrovirus dans le but de bloquer la voie de signalisation des WNTs endogènes. Les répercussions d'une modification de l'expression du facteur FRZB seront étudiées sur la différenciation des cellules musculaires périphériques. De plus, la surexpression de FRZB sera combinée avec celle de SHH afin d'étudier les conséquences de la surexpression de SHH en l'absence de l'activation de la voie de signalisation des WNTs.

3.1. Analyse de l'expression endogène de FRZB-1 chez le Poulet

L'ADNc FRZB de Poulet a été cloné par Luc Leyns (laboratoire d'Eddie de Robertis, Los Angeles, CA, USA) par homologie de séquence avec FRZB-1 murin et amphibien⁴³. De ce point de vue ce travail s'effectue en collaboration avec ce laboratoire. L'ADNc de Poulet obtenu possède des homologies de séquence très forte avec les ADNc FRZB-1 de souris et de grenouille (en dehors des régions conservées entre les différentes espèces dans l'ensemble des facteurs *Frizzled* et FRZBs). Cette observation nous permet de penser que nous possédons l'équivalent Poulet de FRZB-1.

Les premiers résultats concernant l'expression de ce gène montrent que FRZB-1 de Poulet est exprimé dans les régions préchondrogéniques au cours du développement du membre. Cette observation peut être corrélée avec l'expression de FRZB-1 humain au niveau des régions de formation du cartilage des membres chez l'homme⁴⁴.

3.2. Expression ectopique de FRZB-1 *in vivo*

— Construction des rétrovirus recombinants pour Frzb

Nous avons inséré la région codante du gène *Frzb* de souris (*mFrzb* fourni par Luc Leyns)⁴⁵ dans le rétrovirus RCAS-BP de sous-groupe A⁴⁶. Le clone de souris

37. Moon, R.T., Brown, J.D. and Torres, M. (1997a). *Trends Genet.* 13, 157-162.

38. Moon, R.T., Brown, J.D., Yangsnyder, J.A. and Miller, J.R. (1997b). *Cell* 88, 725-728.

39. Orsulic, S. and Peifer, M. (1996). *Current Biol.* 11, 1363-1367.

40. Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.H., Piccolo, S. and de Robertis, E.M. (1997). *Cell* 88, 747-756.

41. Wang, S.W., Krinks, M. and Moos, M. (1997). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 502-504.

42. Mayr, T., Deutsch, U., Kuhl, M., Drexler, H.C.A., Lottspeich, F., Deutzmann, R., Wedlich, D. and Risau, W. (1997). *Mech. Dev.* 63, 109-125.

43. Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.H., Piccolo, S. and de Robertis, E.M. (1997). *Cell* 88, 747-756.

44. Hoang, B., Moos, M., Vukicevic, S. and Luyten, F.P. (1996). *J. Biol. Biochem.* 42, 26131-26137.

45. Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.H., Piccolo, S. and de Robertis, E.M. (1997). *Cell* 88, 747-756.

46. Hughes, S.H., Greenhouse, J.J., Petropoulos, C.J. and Suttrave, P. (1987). *J. Virol.* 61, 3004-3012.

a été utilisé dans le but de distinguer le FRZB ectopique (murin) du FRZB endogène (Poulet). La construction obtenue a été nommée mFrzb/RCAS-BP(A).

— Étude des conséquences de la surexpression du facteur FRZB-1

Chez le Xénope, l'utilisation d'un dominant-négatif de Wnt8 inhibe l'apparition de *MyoD* et la formation des muscles⁴⁷. Il a été montré que la surexpression des facteurs WNT-1 et WNT-7A au niveau des membres inhibe la formation du cartilage *in vivo* et *in vitro*^{48, 49}. L'hypothèse selon laquelle les WNTs exprimés au niveau des bourgeons de membres⁵⁰ auraient une action positive sur la myogenèse s'opérant dans les masses musculaires dorsale et ventrale des bourgeons de membres a été formulée. Dans ce cas l'expression endogène de FRZB-1 au niveau des régions chondrogéniques empêcherait ou contrôlerait l'action des WNTs à ce niveau. Une surexpression ectopique de FRZB-1 devrait donc conduire à inhiber la myogenèse et/ou activer la chondrogenèse. Ce travail est actuellement en cours de réalisation.

C. Segmentation somitique chez les Vertébrés : mise en évidence de l'existence d'une horloge moléculaire liée à la segmentation somitique chez le Poulet

La segmentation du corps en unités répétitives le long de l'axe antéro-postérieur (métamères) est caractéristique de nombreuses classes d'animaux depuis les invertébrés jusqu'à l'Homme. La segmentation des vertébrés, évidente chez l'adulte au niveau du squelette axial (vertèbres, disques intervertébraux et côtes) et du système nerveux périphérique, a pour origine la mise en place, chez l'embryon, de structures métamériques mésodermiques appelées somites. Les somites sont des sphères épithéliales qui se forment de part et d'autre des organes axiaux de manière coordonnée à partir du mésoderme présomitique (MP). Chez le Poulet une paire de somites se forme toutes les 90 minutes.

Nous avons identifié deux homologues aviaires du gène de segmentation de *Drosophile*, *hairy*. Ces gènes nommés *c-hairy1* et *c-hairy2* codent pour des facteurs de transcription répresseurs du type bHLH. Par hybridation *in situ* et grâce à un système de somitogenèse *in vitro*, nous avons démontré que, durant les 90 minutes que prend la formation d'un somite, l'expression des gènes *c-hairy1* et *c-hairy2* dessine des vagues provenant de la partie postérieure de l'embryon et qui se propagent dans le mésoderme paraxial. Ces vagues se rétrécissent de plus en plus au fur et à mesure qu'elles avancent antérieurement, de telle sorte qu'elles finissent par se restreindre, soit à la partie caudale (*c-hairy1*),

47. Hoppler, S., Brown, J.D. and Moon, R.T. (1996). *Genes Dev.* 10, 2805-2817.

48. Zakany, J. and Duboule, D. (1993). *Nature* 362, 546-549.

49. Rudnicki, J.A. and Brown, A.M.C. (1997). *Dev. Biol.* 185, 104-118.

50. Dealy, C.N., Roth, A., Ferrari, D., Brown, A.M.C. and Koshier, R.A. (1993). *Mech. Dev.* 43, 175-186.

soit à la partie rostrale (*c-hairy2*) du somite nouvellement formé. De manière surprenante, ces vagues d'expression sont reproduites lors de la formation de chaque paire de somites.

Des expériences de marquage cellulaire (réalisation de chimères Caille/Poulet et injection du traceur fluorescent DiI) ont permis de montrer que ces patrons d'expression dynamiques ne sont pas le reflet du déplacement massif de cellules exprimant ces gènes. De plus, l'ablation de la partie caudale de l'embryon a montré que la cinétique de ces vagues d'expression ne peut être expliquée par la propagation d'un signal produit de manière périodique toutes les 90 minutes dans la partie postérieure de l'embryon permettant l'activation progressive de l'expression de *c-hairy1* et *c-hairy2*. Ces patrons d'expression sont une propriété intrinsèque du mésoderme présomitique car ils sont maintenus dans des explants de mésoderme présomitique cultivés en l'absence des structures environnantes.

Nous proposons que ces oscillations du taux d'expression de l'ARN messager de *c-hairy1* et *c-hairy2*, réitérées toutes les 90 minutes, représentent une « horloge moléculaire » liée à la segmentation somitique. L'existence d'une telle horloge dans les cellules du mésoderme présomitique a été proposée il y a une vingtaine d'années sur la base de considérations théoriques dans un modèle de somitogenèse appelé le « Clock and Wavefront »⁵¹. Nous en apportons ici la confirmation.

Enfin, le fait que l'homologue d'un gène de segmentation « pair-rule » de *Drosophile* soit également impliqué dans le processus de segmentation chez les Vertébrés constitue un argument supplémentaire en faveur d'une conservation entre les modes de métamérisation chez les Insectes et chez les Vertébrés.

II. HÉMATOPOÏÈSE ET ANGIOGÈNESE EMBRYONNAIRE PRÉCOCES

Chercheurs : C. Corbel, N. Le Douarin, A. Eichmann

Ingénieur de recherche : P. Vaigot, P. Coltey (jusqu'en septembre 1997)

ITA : A. Lehmann

Collaborateurs : B. Imhof et C. Ody (Centre Médical Universitaire de Genève, Suisse), P. Quéré (INRA, Nouzilly).

A. Démonstration de l'existence de l'hémangioblaste

Nos travaux précédents (voir rapport 96-97) nous avaient amenés à identifier et cloner le récepteur 2 du « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGFR2). Nous avons observé que ce récepteur est exprimé non seulement par les cellules des endothéliums vasculaires, mais aussi par une proportion importante ($\approx 30\%$)

51. Cooke, J. and Zeeman, E.C. (1976). *J. Theor. Biol.* 58, 455-476.

des cellules mésodermiques formées par la partie la plus caudale de la ligne primitive. Ces cellules ont pour destinée de se localiser dans le mésoderme du sac vitellin qui est à l'origine des îlots sanguins primitifs où se différencient les premiers vaisseaux et les premières cellules sanguines. Nous avons formulé l'hypothèse que les cellules VEGFR2+ du mésoderme pouvaient représenter l'hémangioblaste, précurseur putatif des lignées sanguine et hématopoïétique dont l'existence a été postulée dès les années 1930 sans toutefois être démontrée.

Nous avons produit le VEGFR2 de caille recombinant, puis préparé un anticorps monoclonal dirigé contre la partie extracellulaire du récepteur. Cet anticorps nous a permis d'isoler les cellules VEGFR2+ à partir du mésoderme prélevé chez l'embryon en cours de gastrulation en utilisant un FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter). Les cellules VEGFR2+ ont ensuite été cultivées d'une manière clonale. Deux types de colonies ont été obtenus, l'un endothélial, l'autre hématopoïétique. Le choix de différenciation est médié par deux ligands distincts du récepteur VEGFR2. Le VEGF stimule la différenciation vers la voie endothéliale alors que la voie hématopoïétique est empruntée en absence de VEGF dans le milieu de culture. La différenciation hématopoïétique est réduite d'une manière significative lorsque le VEGFR2 recombinant est ajouté dans le milieu, ce qui suggère qu'elle pourrait être induite par un ligand de ce récepteur non encore identifié.

Ces expériences supportent l'hypothèse selon laquelle les cellules VEGFR2+ du mésoderme ventral sont bipotentielles et représentent bien l'**hémangioblaste**. De plus, cette cellule souche paraît nécessiter, pour survivre, la présence d'un ligand du VEGFR2. Ceci explique que les souris dans lesquelles le gène du VEGFR2 a été rendu inactif par une mutation ciblée sont dépourvues à la fois de sang et de vaisseaux et sont létales très précocement au cours de l'embryogenèse.

B. L'intégrine GPIIb-IIIa est exprimée par les progéniteurs hématopoïétiques de différents lignages

La molécule GPIIb-IIIa est une intégrine dont un des rôles bien établis est de lier le fibrinogène. Elle est exprimée par des progéniteurs hématopoïétiques chez les mammifères notamment par les cellules du lignage plaquettaire. Depuis plusieurs années nous nous attachons à étudier la distribution de cette molécule dans les différentes catégories de cellules sanguines chez l'oiseau. Nous disposons pour cela d'anticorps spécifiques pour le GPIIb-IIIa aviaire et de divers marqueurs de lignages. Nous montrons que chez l'embryon d'oiseau, GPIIb-IIIa est exprimé par le lignage mégakaryocytaire et par tous les types de progéniteurs hématopoïétiques y compris ceux des lymphocytes T. La molécule GPIIb-IIIa se révèle donc être un outil très utile pour la mise en évidence des sites intraembryonnaires d'hématopoïèse et pour isoler les progéniteurs hématopoïétiques embryonnaires et adultes.

III. LE DÉVELOPPEMENT DE LA FONCTION IMMUNITAIRE

Chercheurs : J. Salaün, I. Barbosa (jusqu'en mars 1998), N. Le Douarin

Ingénieur de recherche : M. Coltey (jusqu'en septembre 1997)

ITA : P. Belo

Depuis plusieurs années nous nous intéressons aux mécanismes par lesquels s'établit la tolérance immunologique vis-à-vis du soi. C'est au cours de leur différenciation dans le thymus et sous l'influence du stroma thymique constitué de cellules hématopoïétiques d'une part et de cellules épithéliales d'autre part, que les lymphocytes T subissent une double sélection : sélection positive des cellules T dont le récepteur est capable de se lier aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) associées à des peptides intrinsèques aux cellules qui le portent avec une affinité faible et sélection négative éliminant les thymocytes porteurs de récepteurs reconnaissant avec une forte affinité le CMH + peptide du soi. Cependant, toutes les cellules potentiellement autoréactives ne sont pas éliminées dans le thymus, de plus, le problème de savoir comment s'établit la tolérance vis-à-vis d'antigènes du soi non présents dans le thymus n'est pas résolu. La réalisation de thymus chimères dans lesquels cellules épithéliales et cellules hématopoïétiques sont d'origine différente a permis de démontrer d'abord chez les oiseaux, puis chez la souris, la capacité de l'épithélium thymique à induire la tolérance aux greffes tissulaires *in vivo*. Cependant la présence de cellules T réactives contre les antigènes de l'haplotype de l'épithélium thymique greffé a pu être mise en évidence. Ainsi, la tolérance vis-à-vis du soi, loin de résulter seulement de l'élimination dans le thymus de clones potentiellement autoréactifs paraît 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 (cf. nos travaux précédents).

Nos diverses expériences de transferts de cellules périphériques de chimères à des souris, nude, transgéniques pour le récepteur T spécifique de l'antigène du mâle HY, irradiées, ou normales, ont montré 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.

Notre but est désormais de caractériser les différents clones de lymphocytes T, les uns régulateurs, les autres autoréactifs.

1. Cinétique d'infiltration de greffons de peau de différents haplotypes : syngéniques, allogéniques mais de l'haplotype de l'épithélium thymique ou totalement allogéniques

Nous avons d'abord décidé de déterminer s'il existe des différences dans les infiltrats présents dans les greffes de peau syngéniques et dans celles du type de l'épithélium thymique. Pour cela nous avons choisi de comparer les populations

lymphocytaires des différents greffons de peau greffés sur des souris nude BALB/c reconstituées par le transfert de cellules périphériques de souris chimère.

La souris chimère nude BALB/c est reconstituée soit entre 3 et 10 jours après la naissance, soit à l'âge adulte, par la greffe des 3^{es} poches branchiales pharyngiennes (contenant l'ébauche de l'épithélium thymique) et prélevées sur des embryons de 10 jours de souche C3H.

L'estimation du nombre de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ dans le sang périphérique, réalisée 2 à 4 mois après la greffe, permet de suivre la restauration de la fonction immunitaire de la chimère.

Les cellules périphériques ganglionnaires et spléniques, des chimères restaurées, sont transférées à des souris nude BALB/c (10×10^6 cellules T par souris) ayant reçu, 20 jours plus tôt, 3 greffes de peau : l'une syngénique : BALB/c ; l'autre C3H, et donc de l'haplotype de l'épithélium thymique ; et enfin allogénique C57BL/6 dit de « 3^e partie ».

Après le transfert des cellules périphériques de la chimère, les souris injectées sont examinées chaque jour. Le jour où on observe le premier signe de rejet de la peau C57BL/6 est considéré comme le jour 0. A ce jour, 12 souris transférées ont été étudiées : 3 au jour 0, 3 au jour 5, 3 au jour 15 et 3 au jour 30. Dans chaque cas, les 3 greffons de peau sont prélevés et traités selon la technique suivante : une moitié est fixée au liquide de Bouin et soumise à l'histologie classique et coloration à l'hématoxyline éosine, l'autre moitié est congelée dans l'azote liquide afin de réaliser l'immunohistochimie : coupe au cryostat, marquage par les anticorps monoclonaux anti-CD4 et anti-CD8 révélé par un anticorps marqué à la biotine et la réaction en présence de diaminobenzidine. Le nombre de cellules CD4⁺ et CD8⁺ dans l'épiderme et le derme est compté au microscope : 10 portions de coupes mesurant 0,19 mm² sont examinées pour chacun des greffons.

L'examen des coupes colorées à l'hématoxyline révèle la présence de nombreux lymphocytes dans les greffons de la 3^e partie. Ce nombre est maximum dès les premiers signes du rejet (jour 0) puis décroît, le rejet étant total vers le 15^e jour. Dans les coupes de peau BALB/c (syngéniques) et C3H (haplotype de l'épithélium thymique) les lymphocytes sont en nombre réduit ; les infiltrations des peaux C3H restent très discrètes et sont tout à fait comparables à celles des peaux syngéniques. Le marquage des lymphocytes par les anticorps anti-CD4 et anti-CD8 confirme ces observations : les infiltrations sont très discrètes dans ces deux types de greffons, avec cependant dans les greffons C3H un nombre de cellules CD4 et CD8 légèrement supérieur au nombre de ces cellules dans les greffons BALB/c.

Cette cinétique des infiltrations étant établie nous entreprenons le clonage des lymphocytes de ces infiltrats. Pour cela les greffons de peau BALB/c, C3H et C57BL/6 sont prélevés au jour 5, ou 15 après les premiers signes de rejet de la peau de la 3^e partie (C57BL/6). Les différents greffons sont soumis à un traitement

à la collagénase afin de récupérer les lymphocytes et de les cultiver. Notre but est de tenter de caractériser les différentes populations de lymphocytes par différents marqueurs d'activation et de suivre leur fonction *in vivo* (régulatrice ou effectrice) par leur transfert à des souris nude.

Ce clonage est actuellement en cours, à partir des greffons de peau mais également à partir de greffons de cœurs dans lesquels les infiltrats semblent plus facilement récupérables que dans la peau. Dans tous les cas, la discrétion des infiltrations dans ces types de greffons nécessite l'utilisation de techniques fines pour la récupération des populations cellulaires infiltrantes. Ainsi, pour étudier les interleukines produites par ces cellules, nous mettons au point la technique de « single cell PCR » afin de caractériser la production des interleukines à partir d'un minimum de cellules.

D'autre part nous avons entrepris une étude systématique des marqueurs d'activation des différentes populations lymphocytaires de souris chimères. Notre hypothèse de travail, basée sur nos précédents résultats de transferts de cellules, est qu'il existe dans le thymus une génération de cellules régulatrices, et que ces cellules, sélectionnées positivement dans le thymus par des interactions de haute affinité, sortiraient du thymus en tant que cellules activées en même temps que les cellules non tolérantes, également sélectionnées dans le thymus mais par des interactions de basse affinité et qui, elles, sont au repos. Nous avons donc étudié les lymphocytes du système périphérique des souris chimères afin de caractériser *in vivo* les différentes cellules par leur taille et leurs marqueurs d'activation.

Les marqueurs suivants sont recherchés : CD45RB^{high}, CD45RB^{low}, CD44, CD38, CD25, CD69. A ce jour, aucun marqueur typique du phénotype de cellules régulatrices n'a pu être mis en évidence dans les organes périphériques des souris chimères analysées. C'est pourquoi nous étudions désormais les différentes populations cellulaires présentes dans les thymus développés sur les chimères. Afin de faciliter la récupération de ces thymus, les épithéliums thymiques sont dans ces cas greffés sous la capsule du rein de la souris nude. Les premières analyses permettent de mettre en évidence des populations correspondant à différents phénotypes, en particulier une population CD45RB^{low} et une population CD45RB^{high}. Nous nous proposons de transférer ces différentes populations à des souris nude afin d'étudier leur implication dans l'établissement de la tolérance. En effet, le rôle des clones CD45RB dans le développement de l'inflammation auto-immune du colon (IBD) a été bien établi chez la souris. Ainsi l'injection de lymphocytes CD45RB^{high} à des souris provoque la maladie, alors que dans les cas d'injection de cellules CD45RB^{low} la maladie ne se développe pas. Ainsi le phénotype CD45RB^{low} correspond aux cellules régulatrices. L'expansion *in vitro* des cellules régulatrices est difficile, comme le montre un récent travail de Groux *et al*⁵². Nous avons donc étudié, tout d'abord chez la souris normale, les capacités

52. Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., de Vries, J.E. and Roncarolo, M.G. (1997). *Nature* 389, 737-738.

d'expansion *in vivo* de ces cellules. Nous avons ainsi, sur la souris normale, séparé les cellules CD45RB^{low} et CD45RB^{high}. Ces cellules sont ensuite injectées à des souris normales auxquelles on avait préalablement greffé un morceau de peau allogénique. Nous avons constaté que les souris injectées avec les clones CD45RB^{high} rejettent rapidement les greffons puis développent la maladie IBD. Au contraire, les souris transférées avec les cellules CD45RB^{low} ne développent pas d'IBD et montrent un délai d'environ deux semaines dans le rejet des greffons de peau. Ces résultats mettent donc en évidence les capacités d'expansion *in vivo* des cellules régulatrices.

Ces expériences préliminaires nous ont permis la mise au point du protocole adapté aux chimères :

Les greffes de peau sont effectuées sur les souris nude deux à trois semaines avant le transfert des différents clones cellulaires des souris chimères afin de permettre l'étude de la tolérance et du rejet avant l'établissement de l'IBD. Par ailleurs, nous avons pratiqué sur certaines de nos souris chimères une thymectomie précoce et observé chez plusieurs de ces animaux l'apparition de l'IBD. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec les expériences de thymectomie néonatale dans lesquelles se développent des phénomènes d'autoimmunité.

Ces différentes expériences devraient permettre une meilleure compréhension des phénomènes liés à l'induction de la tolérance centrale et orale et bien sûr à l'établissement de l'autoimmunité.

L'ensemble de ce travail auquel participent : Ignacio BARBOSA (à l'Institut d'Embryologie de Nogent), Ricardo ARAUJO, Oliver ANNACKER et Antonio BANDEIRA (à l'Institut Pasteur) devrait déboucher sur la publication de plusieurs articles.

2. Greffe d'îlots pancréatiques allogéniques chez la souris NOD

La persistance de cellules T autoréactives, normalement contrôlées par des mécanismes de régulation, peut aboutir, en cas de défaillance de ces mécanismes régulateurs, à l'autoimmunité pathologique. L'autoimmunité peut alors être responsable de diverses maladies dont le diabète insulino-dépendant est un exemple caractéristique avec destruction des îlots de Langerhans du pancréas par des infiltrations lymphocytaires. La souris NOD (« nonobese diabetic ») représente le modèle expérimental le plus utilisé du diabète insulino-dépendant spontané. Des infiltrations lymphocytaires des îlots de Langerhans produisent une insulite, suivie d'une destruction des cellules b, les glandes salivaires sont également infiltrées. La survenue du diabète peut être évitée par le transfert de cellules T CD4⁺ de souris non diabétique, ceci démontre nettement l'intervention de cellules T régulatrices.

Au début des années 90, en injectant des îlots pancréatiques allogéniques dans le thymus de rat de souche diabétique, le groupe de Posselt a empêché l'apparition

du diabète chez ces animaux. Le même résultat a été obtenu chez la souris NOD par l'injection intrathymique d'îlots pancréatiques syngéniques. Ces travaux ont montré en particulier, que les antigènes introduits dans l'environnement thymique bénéficiaient d'un statut privilégié conduisant à une induction de tolérance.

Nous avons nous-mêmes observé chez des souris nude de souche BALB/c greffées avec des thymus de fœtus BALB/c au sein desquels on a introduit des fragments de peau de fœtus C3H, une tolérance à la peau située en position intrathymique, alors que parallèlement les peaux C3H greffées à la périphérie, sont rejetées. Ces expériences confirment le caractère de site privilégié du thymus.

Nous nous sommes proposé d'appliquer ce modèle à la souris NOD, et d'étudier le devenir d'îlots pancréatiques allogéniques placés dans des thymus de fœtus NOD eux-mêmes greffés ensuite dans le mésentère de souris NOD de 1 à 3 mois, le thymus du receveur étant intact. En effet, on pouvait espérer que les lymphocytes se différenciant au sein du greffon thymique en présence d'îlots pancréatiques pourraient devenir tolérants aux îlots et réguler la réactivité des cellules T issues du thymus intrinsèque et donc supprimer, ou au moins réduire, les infiltrations dans le pancréas de l'hôte.

Les expériences sont actuellement en cours. Nous avons greffé des souris NOD de 1 à 3 mois avec des thymus de fœtus NOD contenant des îlots pancréatiques de souris BALB/c. L'apparition du diabète chez ces souris est comparé à celle du diabète de souris NOD contrôles. L'immunohistochimie pratiquée sur plusieurs greffons récupérés après 7 et 8 mois a permis de mettre en évidence la présence de quelques cellules synthétisant de l'insuline. Le pancréas de ces souris montrait plusieurs îlots infiltrés mais également des îlots sains synthétisant de l'insuline. Ces expériences encore préliminaires doivent être complétées mais les résultats préliminaires obtenus indiquent qu'une protection contre une attaque auto-immune du pancréas est induite par ces greffes.

LISTE DES PUBLICATIONS

1997

ARCANGELI, A., ROSATI, B., CHERUBINI, A., CROCIANI, O., FONTANA, L., ZILLER, C., WANKE, E. and OLIVOTTO, M. (1997). HERG- and IRK-like inward rectifier currents are sequentially expressed during neuronal development of neural crest cells and their derivatives. *Europ. J. Neurosci.*, 9, 2596-2604.

BAKER, C.V.H., BRONNER-FRASER, M., LE DOUARIN, N.M. and TEILLET, M.-A. (1997). Early- and late-migrating cranial neural crest cell populations have equivalent developmental potential *in vivo*. *Development*, 124, 3077-3087.

CORBEL, C., IMHOF, B.A. and VAINIO, O. (1997). Development of somatic and lymphoid chimeras in avian species. In « Immunology methods manual », I. Lefkovits, ed., *Acad. Press*, pp. 2171-2181.

DULAC, C. and CAMERON-CURRY, P. (1997). Cell progenitors in the neural crest. In « Stem Cells », C.S. Potten, 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 (1995). 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., BREANT, 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.

EICHMANN, A., GRAPIN-BOTTON, A., KELLY, L., GRAF, T., LE DOUARIN, N.M. and STEWEKE, M. (1997). The expression pattern of the *mafB/kr* gene in birds and mice reveals that the *Kreisler* phenotype does not represent a null mutant. *Mech. Dev.* 65, 111-122.

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., POURQUIE, C., KYRIAKOPOULOU, K., TAVIAN, M., STALLCUP, W., PEAULT, B. and POURQUIE, 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). Embryologie Cellulaire et Moléculaire. Annuaire du Collège de France 1996-1997. Résumé des Cours et Travaux. 97^e année. Nécrologie d'Étienne WOLFF (1904-1996) Paris.

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 CATALA, M. (1997). A novel view on neurulation in amniotes. In « Taniguchi Symposium on Developmental Biology IX : Developmental Biology in Half a Century », april 1997, Kyoto, Japan, pp. 62-65.

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.

PALMEIRIM, I., HENRIQUE, D., ISH-HOROWICZ, D. and POURQUIE, O. (1997). Avian *hairy* gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell*, 91, 639-648.

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.

1998

DUPIN, E., ZILLER, C. and LE DOUARIN, N.M. (1998). The avian embryo as a model in developmental studies : chimeras and *in vitro* clonal analysis. In « Cellular and molecular procedure in developmental biology ». *Current Topics Dev. Biol.*, 36, 1-35.

DUPREZ, D., FOURNIER-THIBAUT, C. and LE DOUARIN, N.M. (1998). Sonic Hedgehog induces proliferation of committed skeletal muscle cells in the chick limb. *Development*, 125, 495-505.

EICHMANN, A., CORBEL, C., JAFFREDO, T., BREANT, C., JOUKOV, V., KUMAR, V., ALITALO, K. and LE DOUARIN, N.M. (1998). Avian VEGF-C : cloning, embryonic expression pattern and stimulation of the differentiation of VEGFR2 expressing endothelial cell precursors. *Development*, 125, 743-752.

GRAPIN-BOTTON, A., BONNIN, M.-A., SIEWEKE, M. and LE DOUARIN, N.M. (1998). Defined concentrations of a *posteriorizing* signal are critical for *MafB/Kreisler* segmental expression in the hindbrain. *Development* 125, 1173-1181.

LECOIN, L., SAKURAI, T., NGO, M.-T., ABE, Y., YANAGISAWA, M. and LE DOUARIN, N.M. (1998) Cloning and characterization of a novel endothelin receptor subtype in the avian class. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 3024-3029.

XUE, Z., ZILLER, C. and XUE, X.J. (1998). Quox 1 homeobox protein is expressed in postmitotic sensory neurons of dorsal root ganglia. *Dev. Brain Res.* 105, 59-66.

Sous presse ou Soumis

CORBEL, C. and VAIGOT, P. The GPIIb-IIIa megakaryocytic/thrombocytic molecule is expressed on other hemopoietic lineages. *Blood* (soumis).

COULY, G., GRAPIN-BOTTON, A., COLTEY, P., RUHIN, B. and LE DOUARIN, N.M. (1998). Determination of the identity of the derivatives of the cephalic neural crest : incompatibility between Hox-gene expression and lower jaw development. *Development*, 125, 3445-3449.

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).

LECOIN, L., LAHAV, R., DUPIN, E. and LE DOUARIN, N. Development of melanocytes from neural crest progenitors. In « Appendages », C. M. Chuong ed. (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, octobre 1996 (sous presse).

LE DOUARIN, N.M. (1998). Les chimères de caille et de poulet pour étudier l'embryogenèse. *Pour la Science*, 252, 46-54.

LE DOUARIN, N.M., TEILLET, M.-A. and CATALA, M. Neurulation in amniote vertebrates : a novel view deduced from the use of quail-chick chimeras. *Int. J. Dev. Biol.* (sous presse).

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

MONSORO-BURQ, A.-H., STIEBER, A., BONTOUX, M., LE DOUARIN, N. M. and GONATAS, N. (1998). Environmental factors modulate the size and the secretory activity of the notochord : a study of the Golgi apparatus in avian embryos. *C. R. Acad. Sci.* (sous presse).

MONSORO-BURQ, A.-H. and LE DOUARIN, N. M. Duality of molecular signaling involved in vertebral chondrogenesis. In « Somitogenesis », C. Ordahl ed., *Acad. Press.* (soumis).

NATAF, V., AMEMIYA, A., YANAGISAWA, M. and LE DOUARIN, N.M. The expression pattern of endothelin 3 in the avian embryo. *Mech. Dev.*, 73, 217-220.

NATAF, V., GRAPIN-BOTTON, A., CHAMPEVAL, D., AMEMIYA, A., YANAGISAWA, M. and LE DOUARIN, N.M. The expression patterns of endothelin-A receptor and endothelin 1 in the avian embryo. *Mech. Dev.*, 75, 145-149.

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

TEILLET, M.-A., ZILLER, C. and LE DOUARIN, N.M. Quail-chick chimeras. In « Vertebrate Embryology : Methods and Protocols ». Series : *Methods in Molecular Biology*, vol. 97, P. Sharpe and I Mason eds., *Humana Press* Totowa, USA, (sous presse).

TEILLET, M.-A., ZILLER, C. and LE DOUARIN, N.M. (1998). Interspecific chimeras in avian embryos. In « Developmental Biology Protocols », R.S. Tuan ed., *Humana Press*. Totowa, USA, (sous presse).

TEILLET, M.-A., WATANABE, Y., JEFFS, P., DUPREZ, D., LAPOINTE, F. and LE DOUARIN, N.M. *Sonic hedgehog* is required for survival of both myogenic and chondrogenic somitic lineages. *Development*, 125, 2019-2030.

WATANABE, Y., DUPREZ, D., MONSORO-BURQ, A.-H., VINCENT, C. and LE DOUARIN, N.M. Two domains in vertebral development : antagonistic regulation by SHH and BMP4 proteins. *Development*, 125, 2631-2639.