

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
TABLE DES ABREVIATIONS	4
TABLE DES ILLUSTRATIONS	5
INTRODUCTION	9
A. DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU SYSTÈME NERVEUX	10
<i>I. L'induction neurale</i>	10
<i>II. La neurulation</i>	14
<i>III. La neurogenèse</i>	15
<i>IV. Régionalisation du système nerveux central selon l'axe rostro-caudal</i>	17
1. Initiation de la régionalisation rostro-caudale du névraxe	17
2. Description sommaire de la mise en place des différentes régions du névraxe selon l'axe rostro-caudal	17
3. Régionalisation rostro-caudale de la moelle épinière	18
<i>V. Régionalisation du système nerveux central selon l'axe dorso-ventral</i>	19
1. Initiation de la régionalisation dorso-ventrale du névraxe	20
2. Mise en place des populations cellulaires ventrales du névraxe	21
a. Eléments de la voie de signalisation SHH	22
b. Rôle de SHH dans l'établissement des populations cellulaires ventrales du névraxe	24
c. Modèle de spécification des populations neuronales ventrales de la moelle épinière.....	25
d. Mode d'action de SHH.....	28
3. Mise en place des populations cellulaires dorsales du névraxe.....	29
a. Eléments sur la signalisation de type TGF- β	30
b. Rôle des facteurs de type TGF- β dans l'établissement des populations cellulaires dorsales du névraxe.....	38
c. Modèle de spécification des populations neuronales dorsales de la moelle épinière	39
4. Etablissement des populations cellulaires intermédiaires de la moelle épinière	42
5. Antagonisme SHH/BMP.....	44
B. LE DÉVELOPPEMENT DU LIGNAGE OLIGODENDROCYTAIRE	47
<i>I. Du précurseur à l'oligodendrocyte différencié</i>	48
1. Le précurseur oligodendrocytaire	48
2. Le progéniteur oligodendrocytaire.....	51
3. Le préoligodendrocyte et l'oligodendrocyte immature.....	53
4. La maturation oligodendrogliale.....	53
5. Les facteurs de régulation extrinsèques	54
<i>II. Origine embryonnaire et spécification des oligodendrocytes</i>	57
<i>III. Objectif de l'étude</i>	64
RESULTATS	67
A. EFFETS DES PROTÉINES BMPs SUR LE DÉVELOPPEMENT DES OLIGODENDROCYTES	68
<i>I. Analyses in vitro</i>	68
1. Cultures de plaque neurale médiane (E1,5)	68

2. Cultures de tissu neural ventral (E3,5 à E4,5).....	70
<i>II. Analyses in vivo à E3</i>	75
1. Greffe de cellules produisant BMP2 entre le tube neural ventral et les somites.....	76
2. Ablation de la partie dorsale du tube neural.....	83
3. Greffe de cellules produisant Noggin entre le tube neural dorsal et les somites.....	89
B. ETUDE DU MODE D’ACTION DES BMPs DANS LA RÉGULATION DE L’OLIGODENDROGENÈSE.....	91
<i>I. Effet de BMP4 sur l’induction des oligodendrocytes par SHH in vitro</i>	91
1. Effet de BMP4 sur le neuroépithélium ventral stimulé par SHH avant la spécification oligodendrocytaire	91
2. Effet de BMP4 sur le neuroépithélium ventral après la spécification oligodendrocytaire.....	93
<i>II. Effet de BMP4 sur l’expression de facteurs de transcription dans le neuroépithélium ventral</i>	94
1. Effet de BMP4 sur l’expression de Pax6 dans le neuroépithélium ventral <i>in vitro</i>	95
a. Avant la détermination des oligodendrocytes	95
b. Après la détermination des oligodendrocytes	97
2. Effet de BMP4 sur l’expression de Nkx2.2 dans le neuroépithélium ventral <i>in vitro</i>	98
a. Avant la détermination des oligodendrocytes	98
b. Après la détermination des oligodendrocytes	99
3. Effet de BMP4 sur l’expression de Olig2 dans le neuroépithélium ventral <i>in vitro</i>	101
4. Effet de BMP4 sur l’expression de Nkx2.2 et de Olig2 dans le neuroépithélium ventral <i>in vivo</i> (E3)	105
DISCUSSION	109
<i>I. Des facteurs dorsaux de la moelle épinière, dont des BMPs, participent à la régulation spatiale des étapes précoces de l’oligodendrogenèse</i>	110
<i>II. BMP4 est capable d’antagoniser l’induction du développement des oligodendrocytes médiée par SHH</i>	115
<i>III. Les BMPs inhibent la spécification des oligodendrocytes via la répression de l’expression du facteur de transcription Olig2</i>	118
<i>IV. Que deviennent les cellules normalement destinées à former des oligodendrocytes en présence de BMPs?</i>	123
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	125
MATERIELS ET METHODES	128
<i>I. Embryons</i>	129
<i>II. Milieux de culture</i>	129
1. Plaque neurale médiane et neuroépithélium ventral	129
2. Tube neural ventral	129
3. Préparation du gel de collagène	129
4. Lignée cellulaire Q2bn.....	129
5. Lignée cellulaire CHO (<i>Chinese Hamster Ovary</i>)	129
<i>III. Prélèvement des tissus embryonnaires</i>	130
1. Plaque neurale médiane.....	130
2. Tube neural ventral	130
3. Neuroépithélium ventral.....	131
<i>IV. Cultures cellulaires</i>	131
1. Lignée Q2bn.....	132

2. Lignée CHO	132
3. Marquage des cellules au Dil	132
<i>V. Cultures des tissus embryonnaires</i>	<i>133</i>
<i>VI. Manipulations des embryons in ovo à E3</i>	<i>133</i>
1. Préparation des embryons	133
2. Greffe de cellules Q2bn et CHO-Noggin entre le tube neural ventral et les somites	133
3. Ablation de la région dorsale du tube neural	134
4. Prélèvement des tissus	134
<i>VI. Immunohistochimie</i>	<i>134</i>
1. Anticorps et révélateurs utilisés	134
a. Anticorps primaires	134
b. Anticorps secondaires et conjugués de streptavidine	136
2. Préparation des tissus	136
a. Cultures	136
b. Echantillons de tube neural	136
3. Procédure d'immunodétection	137
4. Observations	138
<i>VII. Hybridation in situ</i>	<i>138</i>
BIBLIOGRAPHIE	139
PUBLICATION	154

TABLE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique	kDa : kilodalton
ADNc : ADN complémentaire	LIF : <i>leukemia inhibitory factor</i>
ALK : <i>activin receptor-like kinase</i>	MAG : <i>myelin-associated glycoprotein</i>
ARN : acide ribonucléique	MAPK : <i>mitogen-activated protein kinase</i>
ARNm : ARN messager	MBP : <i>myelin basic protein</i>
bHLH : basic helix-loop-helix	MH1 : <i>Mad homology 1</i>
BMP(s) : <i>bone morphogenetic protein(s)</i>	MH2 : <i>Mad homology 2</i>
CHO : cellules ovariennes de hamster chinois	MN(s) : motoneurone(s)
CNP : <i>2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase</i>	MOG : <i>myelin/oligodendrocyte glycoprotein</i>
CNTF : <i>ciliary neurotrophic factor</i>	NT3 : neurotrophine 3
dI : interneurons dorsaux	O-2A : <i>oligodendrocyte-type 2 astrocyte progenitor cells</i>
Dsl-1 : <i>dorsalin-1</i>	OLPs : progéniteurs oligodendrocytaires
E : jour embryonnaire	<i>opb</i> : <i>open brain</i>
EGF : <i>epidermal growth factor</i>	P38K : <i>P38 kinase</i>
FGF : <i>fibroblast growth factor</i>	PDGF : <i>platelet-derived growth factor</i>
FGFR : récepteur au FGF	PDGFR α : récepteur α au PDGF
GalC : galactosylcéramide	PLP : protéine protéolipide
GDF : <i>growth and differentiation factor</i>	POA : <i>prooligodendroblast antigen</i>
GFAP : protéine acide des filaments intermédiaires des astrocytes	PSA-NCAM : forme polysialilée embryonnaire de la « <i>neural cell adhesion molecule</i> »
GGF : <i>glial growth factor</i>	SBE : <i>Smad binding element</i>
GLAST : transporteur du glutamate et de l'aspartate	<i>Sey</i> : <i>small eye</i>
GRP : <i>glial restricted precursor cells</i>	SHH : Sonic hedgehog
HDAC(s) : histone désacétylase(s)	Smurf : <i>Smad ubiquitination regulatory factor</i>
Hh : hedgehog	SNC : système nerveux central
HH : stade de développement embryonnaire selon Hamburger et Hamilton (1992).	SNP : système nerveux périphérique
HMG : <i>high mobility group</i>	T3 : 3,3',5-triiodothyronine
HNF-3 β : <i>hepatocyte nuclear factor-3β</i>	TAB1 : <i>TAK1 binding protein 1</i>
IFN γ : interféron γ	TAK1 : <i>TGF-β activated kinase 1</i>
Ig : immunoglobulines	TGF- β : <i>transforming growth factor-β</i>
IGF : <i>insulin-like growth factor</i>	THR : récepteur de l'hormone thyroïdienne
IL-6 : interleukine-6	V0-V3 : interneurons ventraux
JNK : <i>c-Jun N-terminal kinase</i>	XIAP : <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

TABLE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION

Figure 1 : Topographie tissulaire de la jeune gastrula de xénope	10
Figure 2 : L'expérience de Spemann et Mangold	11
Figure 3 : L'induction neurale chez le xénope.....	12
Figure 4 : Modèle d'induction neurale chez la blastula de poulet.....	13
Figure 5 : Représentation schématique du développement de la moelle épinière chez les vertébrés supérieurs	14
Figure 6 : Modèles schématiques de la mise en place de la régionalisation rostro-caudale du névraxe.....	17
Figure 7 : Schéma de la mise en place des différentes régions du névraxe selon l'axe antéro-postérieur.....	17
Figure 8 : Diagramme de la moelle épinière embryonnaire de poulet à E5-E8 montrant l'organisation des colonnes motrices	18
Figure 9 : Organisation spatiale des motoneurons dans la moelle épinière en développement.....	18
Figure 10 : Expression génique différentielle le long de l'axe antéro-postérieur	19
Figure 11 : Schéma résumant l'action combinée des FGFs, de l'acide rétinoïque (RA) et de GDF11 dans l'établissement du profil d'expression des protéines Hox-c selon l'axe antéro-postérieur de la moelle épinière en développement.....	19
Figure 12 : Représentation schématique de la mise en place de la régionalisation dorso-ventrale de la moelle épinière	21
Figure 13 : Représentation schématique de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (SHH).....	22
Figure 14 : Expression de SHH dans la moelle épinière embryonnaire de poulet.....	24
Figure 15 : L'activité graduelle de SHH contrôle la mise en place des populations neuronales ventrales dans le tube neural	25
Figure 16 : Modèle en 3 étapes de la spécification des populations neuronales ventrales dans la moelle épinière des vertébrés par le gradient morphogénique de SHH	26
Figure 17 : Mise en place des motoneurons	27
Figure 18 : Profil d'expression des facteurs de transcription à homéodomaine dans le neuroépithélium ventral et développement des neurones ventraux dans la moelle épinière de différents mutants pour des éléments de la signalisation SHH	29
Figure 19 : La superfamille du TGF- β	30
Figure 20 : Maturation protéolytique des précurseurs des <i>Bone Morphogenetic Proteins</i>	31

Figure 21 : La famille des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase.....	32
Figure 22 : Modèle d'activation des récepteurs aux BMPs.....	33
Figure 23 : La famille Smad chez les mammifères	33
Figure 24 : Organisation structurale des Smads.....	34
Figure 25 : Mode de signalisation des membres de la superfamille du TGF- β	34
Figure 26 : Régulation de la transcription par les Smads <i>via</i> le recrutement de coactivateurs et corépresseurs transcriptionnels	35
Figure 27 : Représentation schématique des voies canonique BMP/Smad et non canonique BMP/MAPK.....	35
Figure 28 : Tableau montrant les antagonistes des BMPs et leur spécificité et affinité de ligand ..	36
Figure 29 : Mécanisme d'action des I-Smads	37
Figure 30 : Schéma de la fonction des I-Smads	37
Figure 31 : Schéma de l'organisation des neurones dorsaux de la moelle épinière chez la souris .	39
Figure 32 : Un code de facteurs de transcription contrôle la spécification cellulaire dans le neuroépithélium dorsal.....	40
Figure 33 : Diagramme représentant les populations d'interneurones dorsaux dans la moelle épinière et la fonction de Lbx1 dans leur développement.....	42
Figure 34 : Régionalisation de la région intermédiaire de la moelle épinière.....	43
Figure 35 : La signalisation BMP régule plusieurs aspects de la régionalisation dorso-ventrale du tube neural.....	44
Figure 36 : Schéma de la régionalisation dorso-ventrale de la moitié ventrale de la moelle épinière chez les souris sauvage et mutantes SHH ^{-/-} et SHH ^{-/-} ; Gli3 ^{-/-}	45
Figure 37 : Schéma montrant les altérations de l'identité des progéniteurs neuraux dans les régions intermédiaire et ventrale du neuroépithélium des souris déficientes pour les fonctions SHH et Gli3, séparément et ensemble, et chez des souris exprimant une protéine Gli3 tronquée (Gli3R)	46
Figure 38 : Régionalisation dorso-ventrale du tube neural	46
Figure 39 : Représentation schématique du développement du lignage oligodendrocytaire	48
Figure 40 : Rôle des facteurs de croissance et cytokines sur la prolifération, migration, survie, différenciation et régénération des cellules du lignage oligodendrocytaire	54
Figure 41 : Modèle hypothétique de l'origine et profil dynamique d'expression génique des progéniteurs oligodendrocytaires dans la moelle épinière embryonnaire	62
Figure 42 : La transition neuronogenèse-oligodendrogenèse dans la moelle épinière de poulet	63
Figure 43 : Schéma illustrant la fonction de Sox9 dans les domaines p2 et pMN de la moelle épinière embryonnaire.....	64

Figure 44 : Les facteurs de transcription Olig contrôlent l'identité des neurones et des cellules gliales dérivant du même domaine de progéniteurs 64

RESULTATS

Figure 45 : Effet de la protéine BMP4 sur l'oligodendrogenèse dans les cultures d'explants de plaque neurale médiane de stade HH 10 (E1,5) 68

Figure 46 : Effet de la protéine BMP4 sur le développement des motoneurones et des cellules de *floor plate* dans les cultures d'explants de plaque neurale médiane de stade HH 10 (E1,5) 69

Figure 47 : Dose-réponses de l'effet inhibiteur de la protéine BMP4 sur le développement des oligodendrocytes et des motoneurones dans les cultures d'explants de plaque neurale médiane de stade HH 10 (E1,5) 69

Figure 48 : Effet de la protéine BMP4 sur l'expression de l'ARNm du facteur de transcription Pax3 dans les cultures d'explants de plaque neurale médiane de stade HH 10 (E1,5) 70

Figure 49 : Effet de la protéine BMP4 sur le développement des oligodendrocytes dans les cultures d'explants de plaque neurale médiane « tardifs » (E4,5) et de tube neural ventral de stades HH 21 à 26 (E3,5 à E4,5) 72

Figure 50 : Dose-réponse de l'effet inhibiteur de la protéine BMP4 sur le développement des oligodendrocytes dans les cultures d'explants de tube neural ventral de stade HH 25 (E4,5) 72

Figure 51 : Effet de la protéine BMP4 sur le développement des motoneurones dans les cultures d'explants de tube neural ventral de stades HH 22 à 25 (E3,5 à E4,5) 73

Figure 52 : Effet de la protéine BMP2 sur le développement des oligodendrocytes dans les cocultures de cellules produisant BMP2 et d'explants de plaque neurale médiane « tardifs » (E4,5) ou de tube neural ventral de stades HH 22 à 25 (E3,5 à E4,5) 74

Figure 53 : Effet de la protéine BMP2 sur le développement des astrocytes dans les cocultures de cellules produisant BMP2 et d'explants de plaque neurale médiane « tardifs » (E4,5) 75

Figure 54 : Effet de la protéine BMP2 sur l'oligodendrogenèse *in vivo* 77

Figure 55 : Effet de la protéine BMP2 sur l'oligodendrogenèse *in vivo* 78

Figure 56 : Effet des cellules Q2bn contrôles sur l'oligodendrogenèse *in vivo* 80

Figure 57 : Effet de la protéine BMP2 sur l'expression du morphogène SHH *in vivo* 81

Figure 58 : Effet de la protéine BMP2 sur le développement des cellules du lignage astrocytaire *in vivo* 82

Figure 59 : Patron d'oligodendrogenèse au stade HH 30-33 (E6,5/7,5) 84

Figure 60 : Effet de l'ablation de la partie dorsale du tube neural *in vivo* 85

Figure 61 : Effet de l'ablation de la partie dorsale du tube neural *in vivo* 86

Figure 62 : Effet d'une *spina bifida* artificielle sur l'oligodendrogenèse *in vivo* 87

Figure 63 : Effet de l'inactivation du signal BMP par la protéine Noggin sur l'oligodendrogenèse *in vivo* 90

Figure 64 : Effet de la protéine BMP4 sur le développement des oligodendrocytes dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 25-26 (E4,5/5).....	92
Figure 65 : Effet de la protéine BMP4 sur le développement des oligodendrocytes dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 25-26 (E4,5/5).....	93
Figure 66 : Effet de la protéine BMP4 sur le développement des oligodendrocytes dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 29 (E6)	94
Figure 67 : Effet de la protéine BMP4 sur le développement des oligodendrocytes et l'expression de Pax6 dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 25-26 (E4,5/5).....	96
Figure 68 : Effet de la protéine BMP4 sur le développement des oligodendrocytes et l'expression de Pax6 dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 29 (E6)	97
Figure 69 : Effet de la protéine BMP4 sur le développement des oligodendrocytes et l'expression de Nkx2.2 dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 25-26 (E4,5/5)...	98
Figure 70 : Effet de la protéine BMP4 sur le développement des oligodendrocytes et l'expression de Nkx2.2 dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 29 (E6)	99
Figure 71 : Effet de la protéine BMP4 sur l'expression de Olig2 dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 25-26 (E4,5/5)	101
Figure 72 : Effet de la protéine BMP4 sur la coexpression de Olig2 et de Nkx2.2 dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 25-26 (E4,5/5).....	102
Figure 73 : Effet de la protéine BMP2 sur l'expression des facteurs de transcription Nkx2.2 et Olig2 <i>in vivo</i>	104

MATERIELS ET METHODES

Figure 74 : Dissection de la partie médiane de la plaque neurale caudale chez un embryon de poulet de stade HH 10 (E1,5).....	130
Figure 75 : Greffe d'agrégats cellulaires entre le tube neural thoraco-lombaire et les somites, <i>in ovo</i> , chez un embryon de poulet de stade HH 18-20 (E3).....	133
Figure 76 : Ablation de la partie dorsale du tube neural lombaire, <i>in ovo</i> , chez un embryon de poulet de stade HH 18-20 (E3).....	134

INTRODUCTION

Le système nerveux central (SNC) des vertébrés est composé de trois classes majeures de cellules : les neurones dont il existe une grande variété de sous-classes, les oligodendrocytes, cellules myélinisantes du SNC et les astrocytes. Ces différentes populations neuronales et macrogliales dérivent toutes des cellules neuroépithéliales qui forment la zone ventriculaire de l'ébauche du SNC. Une question fondamentale est de comprendre les processus par lesquels ces cellules neuroépithéliales, apparemment homogènes, se différencient en une multitude de types cellulaires au moment approprié.

Au laboratoire, un de nos axes de recherche s'intéresse aux mécanismes cellulaires et moléculaires de la spécification du lignage oligodendrocytaire dans le SNC, plus particulièrement dans la moelle épinière du fait de la simplicité de sa structure et utilise l'embryon de poulet comme principal modèle d'étude. Nous retracerons tout d'abord les grandes étapes du développement du SNC en nous attachant plus spécialement à la mise en place des différentes populations neuronales de la moelle épinière. Nous décrirons ensuite le développement des oligodendrocytes, puis les bases du présent travail seront posées.

A. DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU SYSTEME NERVEUX

Chez les vertébrés, il est communément admis que la formation du système nerveux débute au cours de la gastrulation (pour revues, voir Streit et Stern, 1999 ; Bainter *et al.*, 2001 ; Wilson et Edlund, 2001) qui est l'étape de l'embryogenèse pendant laquelle les trois feuilletts primordiaux se mettent en place, *via* d'importants mouvements cellulaires. Ces tissus embryonnaires sont, de l'intérieur vers l'extérieur de l'embryon, l'endoderme, qui donnera le tube digestif, ses glandes annexes et les poumons, le mésoderme, à l'origine de la musculature striée, du système cardio-vasculaire et des tissus conjonctifs (dont le squelette) et l'ectoderme, duquel naîtront l'épiderme et l'ensemble du système nerveux (figure 1).

Le développement du système nerveux implique différents événements, lesquels, bien que présentés successivement par commodité, sont souvent interdépendants et peuvent se produire simultanément plutôt que séquentiellement (pour revue, voir Bronner-Fraser et Fraser, 1997).

I. L'induction neurale

La première manifestation morphologique du système nerveux est la formation du neurectoderme, épaissement de l'ectoderme résultant de l'allongement des cellules, au

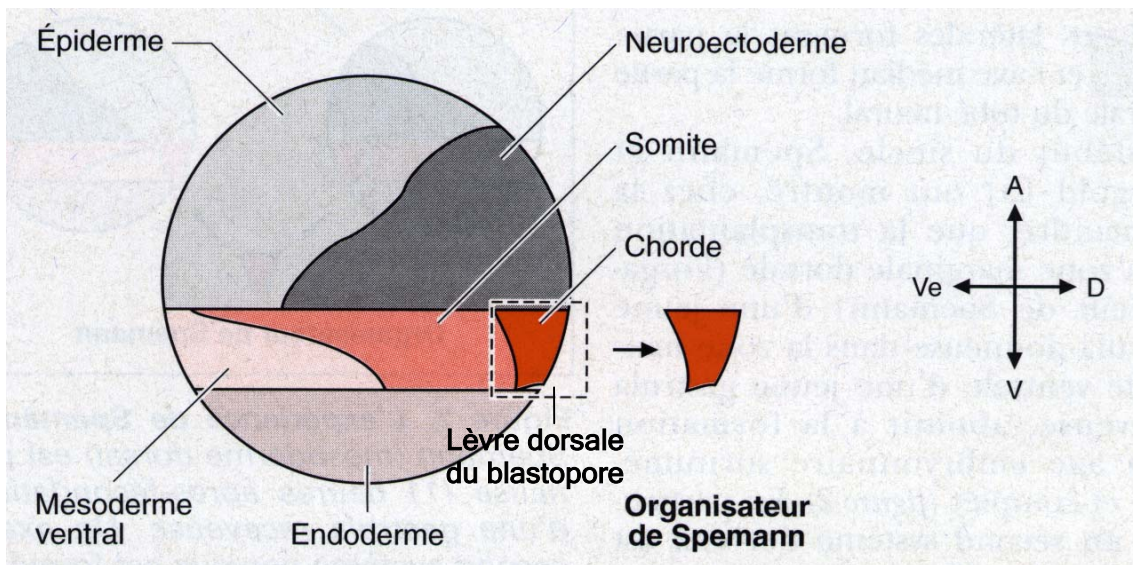


Figure 1 : Topographie tissulaire de la jeune gastrula de xénope (d'après Honoré et Hemmati-Brivanlou, 1997). L'épiderme situé sur la partie ventrale du pôle animal de la gastrula est indiqué en gris clair et le tissu neural, sur la partie dorsale du pôle animal, en gris foncé. Le mésoderme est indiqué en rose clair et rose foncé. L'organisateur de Spemann (mésoderme axial) sur le côté dorsal de l'embryon est représenté en rouge. L'organisateur de Spemann va donner naissance à la chorde. L'endoderme (pôle végétatif) figure en bistre. Les axes dorso-ventral et animal-végétatif sont représentés par une croix (D, dorsal ; Ve, ventral ; A, animal ; V, végétatif). Au cours de la gastrulation, le mésoderme et l'endoderme s'invaginent dans l'embryon à travers le blastopore. A la fin de cet événement, les 3 feuilletts primordiaux sont en place avec de l'extérieur vers l'intérieur de l'embryon, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme.

niveau de ce qui deviendra la face dorsale de l'animal (pour revue, voir Colas et Schoenwolf, 2001). Le reste de l'ectoderme (l'ectoderme dit non neural par opposition au neurectoderme) se différenciera principalement en tissu épidermique (couche superficielle de la peau et phanères). A ce stade, le neurectoderme, surélevé par rapport à l'ectoderme non neural, est appelé la plaque neurale. C'est un épithélium, le neuroépithélium, formé d'une seule couche de cellules jointives qui s'étendent de l'apex à la base de la structure, chez les vertébrés supérieurs. Ce neuroépithélium est dit pseudostratifié car les noyaux des cellules neuroépithéliales sont localisés à différents niveaux selon l'axe apico-basal, donnant l'impression, en coupe transversale, qu'il est constitué de plusieurs assises cellulaires.

La mise en place de l'ébauche neurale est considérée comme résultant d'un processus d'induction au cours duquel des signaux moléculaires émis par le mésoderme dorsal conduiraient les cellules ectodermiques sus-jacentes à adopter une destinée neurale : c'est l'induction neurale. La première évidence de l'existence de signaux inducteurs de tissu neural provient des célèbres travaux de Hans Spemann et Hilde Mangold réalisés chez l'amphibien et publiés en 1924 (Spemann et Mangold, 1924 ; pour revues, voir Catala, 1999 ; Streit et Stern, 1999 ; Bainter *et al.*, 2001 ; Wilson et Edlund, 2001). Ces auteurs ont montré que la transplantation de la lèvre dorsale du blastopore (mésoderme dorsal) d'une jeune gastrula de triton dans le mésoderme ventral d'un embryon de même stade induisait la formation d'un embryon surnuméraire complet, accolé au premier (embryons siamois) (figure 2). Une grande partie des organes de ce second embryon est formée à partir des tissus hôtes. En particulier, la totalité du système nerveux, parfaitement organisé selon les axes rostro-caudal (ou antéro-postérieur) et dorso-ventral, provient de l'ectoderme ventral de l'embryon receveur, normalement destiné à devenir de l'épiderme. Le greffon déjà déterminé suit sa propre voie de différenciation -*i. e.* il fournit la majeure partie des dérivés du mésoderme dorsal (chorde et somites)- en dépit d'un nouvel environnement et organise la formation d'un embryon secondaire, harmonieux, à partir de territoires ventraux dont il réoriente le destin : il a été appelé le centre organisateur de Spemann.

Chez les amniotes (oiseaux et mammifères), l'équivalent de l'organisateur de Spemann, le nœud de Hensen (souvent appelé nœud chez les mammifères) qui se forme à l'extrémité rostrale de la ligne primitive pendant la gastrulation, possède également des propriétés d'inducteur neural (Beddington, 1994 ; Storey *et al.*, 1995 ; pour revues, voir Streit et Stern, 1999 ; Bainter *et al.*, 2001 ; Wilson et Edlund, 2001). En régressant rostro-caudalement le long de la ligne primitive, le nœud de Hensen partage les tissus qui lui sont

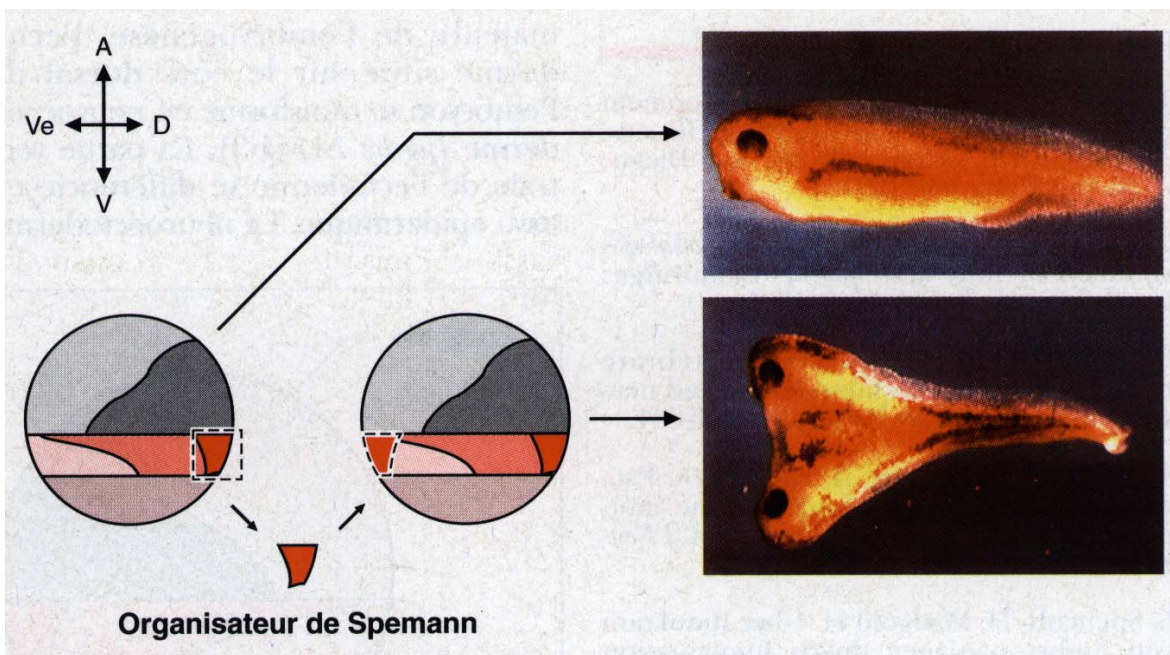


Figure 2 : L'expérience de Spemann et Mangold (Honoré et Hemmati-Brivanlou, 1997). L'organisateur de Spemann (mésoderme dorsal) est prélevé à partir d'une jeune gastrula donneuse et implanté dans la partie ventrale d'une gastrula receveuse. Un axe surnuméraire complet comportant un second système nerveux est formé dans l'embryon receveur.

postérieurs en deux parties latérales et dépose les cellules qui formeront la ligne médiane (ou axiale) de chacun des trois feuilletts embryonnaires ; les précurseurs de la plaque du plancher (*floor plate*) du SNC sont insérés dans la plaque neurale en formation, les cellules à l'origine de la corde, dans le mésoderme sous-jacent et les cellules qui formeront la partie la plus dorsale du tube digestif, dans l'endoderme situé en dessous (Catala *et al.*, 1996). La corde est une structure axiale transitoire, en forme de tige, qui confère une certaine rigidité à l'embryon et qui préfigure le centre des vertèbres et une partie des disques intervertébraux. Certains des dérivés du nœud de Hensen conservent une activité d'inducteur neural (pour revue, voir Streit et Stern, 1999).

Au cours des dix dernières années, de nombreuses investigations visant à identifier les molécules exprimées dans l'organisateur et supportant l'induction neurale ont été réalisées, principalement chez l'amphibien *Xenopus laevis* (pour revue, voir Wilson et Edlund, 2001). Ces études ont mené à l'idée que les BMPs (*bone morphogenetic proteins*), exprimées de manière ubiquitaire, empêchent l'ectoderme de se différencier en tissu neural et conduisent ses cellules à former de l'épiderme et que l'induction neurale dépend de l'inhibition de l'activité BMP dans le territoire destiné à générer le système nerveux. En effet, pendant la gastrulation, l'organisateur en formation sécrète des antagonistes diffusibles des BMPs qui permettent aux cellules environnantes d'adopter le destin neural (figure 3 ; pour revues, voir Catala, 1999 ; Streit et Stern, 1999 ; Bainter *et al.*, 2001 ; Wilson et Edlund, 2001).

Un ensemble de données relativement récentes indique cependant que l'induction neurale est un phénomène initié plus précocement, avant la gastrulation, et donc indépendamment de la formation de l'organisateur, chez les amniotes (pour revues, voir Bainter *et al.*, 2001 ; Wilson et Edlund, 2001). Au vu de ces nouveaux éléments, l'induction neurale se définirait comme l'étape de spécification des cellules de la plaque neurale, au cours de laquelle les cellules ectodermiques dorsales reçoivent des signaux les orientant vers un devenir neural mais peuvent encore évoluer vers d'autres destins en réponse à des signaux appropriés. En revanche, à la fin de la gastrulation, ces mêmes cellules s'engagent dans la voie neurale même si elles sont soumises à des signaux susceptibles d'induire d'autres destins cellulaires : elles sont alors déterminées. On pense que les propriétés du nœud sont impliquées dans le maintien ou la stabilisation du caractère neural et non dans l'induction neurale initiale.

La capacité des signaux BMP à bloquer la formation de tissu neural et à promouvoir l'acquisition du destin épidermique est conservée chez les amniotes. Toutefois,

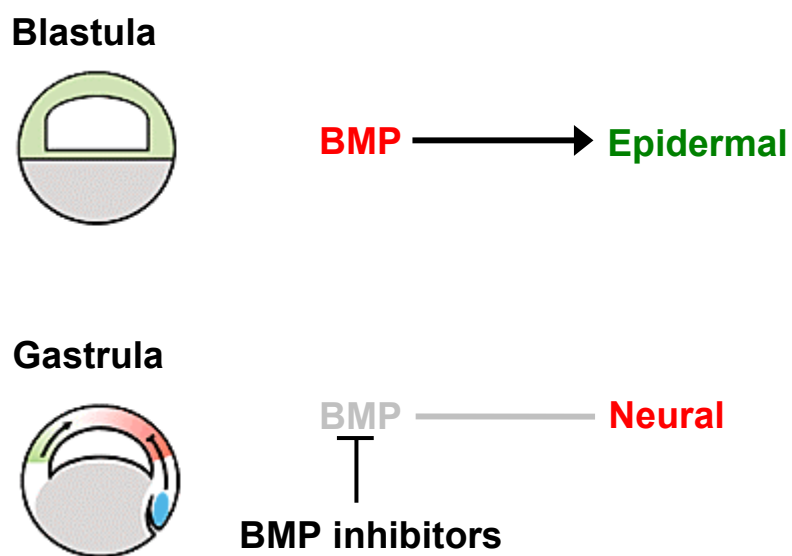


Figure 3 : L'induction neurale chez le xénope (d'après Wilson et Edlund, 2001). Au stade blastula (précédant la gastrulation), l'ectoderme sécrète des BMPs (vert), lesquelles promeuvent le destin épidermique et répriment le destin neural. Pendant la gastrulation, l'organisateur de Spemann (bleu) se forme et ses cellules expriment des inhibiteurs des BMPs tels que Noggin, Chordin, Follistatin et Xnr3. En conséquence, la signalisation BMP est bloquée, permettant à l'ectoderme de se différencier en tissu neural (rouge).

l'inhibition de ces signaux ne suffit pas à induire des caractéristiques neurales chez ces organismes, excepté dans le cas des cellules situées à la limite entre le neurectoderme et l'ectoderme non neural présomptifs, au moins chez le poulet (pour revues, voir Streit et Stern, 1999 ; Bainter *et al.*, 2001 ; Wilson et Edlund, 2001). Cette dernière observation semble également valable chez le poisson zèbre où des évidences génétiques démontrent que la signalisation BMP est impliquée dans la régulation de l'étendue de la plaque neurale (pour revue, voir Wilson et Edlund, 2001). Ces notions sont en faveur de l'idée que les antagonistes des BMPs émis par l'organisateur participent au maintien du destin neural (pour revues, voir Streit et Stern, 1999 ; Wilson et Edlund, 2001).

Des travaux réalisés au stade blastula (stade précédant la gastrulation) chez le poulet ont dernièrement mis en évidence un rôle double de la signalisation FGF (*fibroblast growth factor*) dans l'induction neurale. L'activité FGF est requise dans ce processus et se manifeste d'une part, par la répression de l'expression des BMPs dans la partie médiane de l'épiblaste (le neurectoderme présomptif) et d'autre part, par l'induction de la neuralisation *via* une voie différente. Cependant, le fait que le FGF soit également exprimé dans l'épiblaste latéral (futur épiderme), lequel conserve l'expression des BMPs et acquiert le destin épidermique ultérieurement, indiquerait que ce territoire est exposé à des signaux l'empêchant de répondre au FGF. Les facteurs Wnt (homologues vertébrés de Wingless de la drosophile), exprimés dans les régions latérales de l'épiblaste mais pas dans sa partie médiane, sont capables de remplir une telle fonction (figure 4). Ces données suggèrent que l'état de la signalisation Wnt régule la sélection entre les destins neural et épidermique, avant la gastrulation, chez le poulet. Afin de mieux comprendre les étapes initiales de l'induction neurale, il reste à définir comment s'établit la distribution de l'activité Wnt dans la blastula et comment ces facteurs agissent pour bloquer la réponse des cellules qui y sont soumises à la signalisation FGF (pour revues, voir Bainter *et al.*, 2001 ; Wilson et Edlund, 2001). Chez le poulet, l'hypoblaste, un territoire destiné à former du tissu extra-embryonnaire, qui sécrète du FGF et des antagonistes des Wnts, pourrait intervenir dans l'induction neurale (pour revue, voir Stern, 2002). Plus tard au cours du développement, l'organisateur et certains de ses dérivés produisent des FGFs et des antagonistes des Wnts et des BMPs, ce qui explique vraisemblablement leur activité neuralisante laquelle stabiliserait l'effet de l'hypoblaste (pour revues, voir Wilson et Edlund, 2001 ; Stern, 2002).

Des résultats récemment obtenus permettent de penser que les mécanismes de l'induction neurale chez les amphibiens sont plus proches de ceux mis en jeu chez les amniotes, qu'initialement envisagé (pour revue, voir Wilson et Edlund, 2001). En effet,

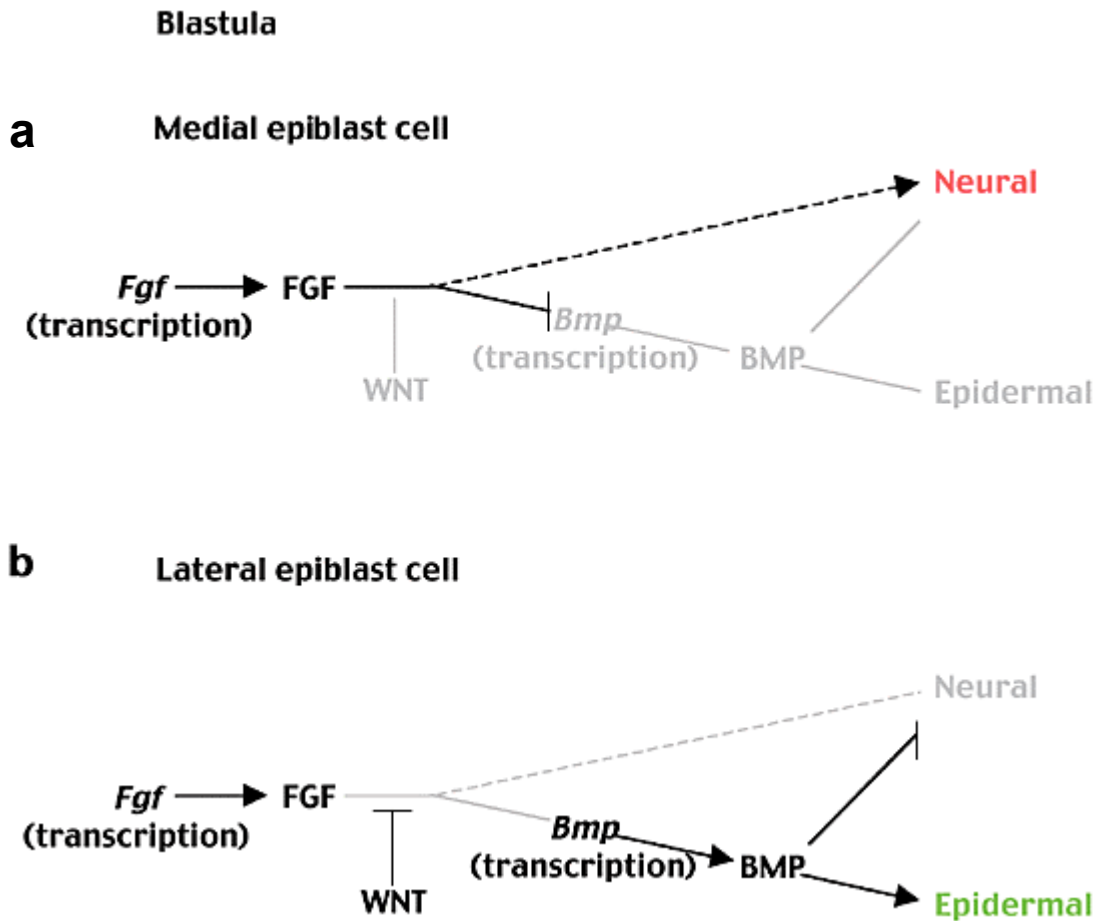


Figure 4 : Modèle d'induction neurale chez la blastula de poulet (d'après Wilson et Edlund, 2001). a) les cellules médianes de l'épiblaste expriment des FGFs mais pas de Wnts. La signalisation FGF active deux voies de transduction distinctes dans les cellules de l'épiblaste : 1) la répression de l'expression des gènes *Bmp* (ligne noire continue) et 2) la stimulation d'une destinée neurale par une voie indépendante de la répression de l'expression des *Bmps* (ligne noire discontinue). b) Les cellules latérales de l'épiblaste expriment des FGFs et des Wnts. De hauts niveaux de signalisation Wnt bloquent la réponse des cellules épiblastiques au FGF, les *Bmps* sont donc exprimés. Les signaux BMPs promeuvent le destin épidermique et répriment le destin neural. Lorsque la signalisation Wnt est atténuée, les Wnts bloquent la capacité des FGFs à réprimer l'expression de *Bmp*, mais la voie indépendante impliquée dans la stimulation de la voie neurale est préservée. Dans ces conditions, les antagonistes des BMPs sont capables d'induire le destin neural.

l'induction neurale débiterait avant la formation de l'organisateur et la détermination des cellules neurales se manifesterait à la fin de la gastrulation, chez les amphibiens également. De plus, les signalisations FGF et Wnt sont aussi impliquées dans le choix des destins neural et épidermique chez *Xenopus laevis* mais leurs rôles précis restent à déterminer.

II. La neurulation

La plaque neurale, initialement courte selon l'axe rostro-caudal et large selon l'axe médio-latéral, subit des phénomènes de modelage qui entraînent son allongement et son amincissement. De manière concomitante, une modification de la forme de ses cellules médianes, associée à des forces exercées par l'ectoderme non neural qui la flanque de part et d'autre, provoque une incurvation de la plaque neurale qui se creuse en gouttière. Les bourrelets neuraux, bords latéraux de la gouttière neurale (toujours en continuité avec l'ectoderme non neural), se soulèvent, se rapprochent et fusionnent sur la ligne médiane dorsale pour former un tube qui s'individualise de l'ectoderme non neural qui le recouvre alors (figure 5 ; pour revues, voir Catala, 1999 ; Colas et Schoenwolf, 2001). Ce dernier donnera naissance à la couche externe de la peau du dos de l'animal et à ses dérivés (poils, plumes...).

Ces mouvements morphogénétiques incluent ainsi la nouvelle structure à l'intérieur de l'embryon et transforment l'axe médio-latéral de l'ébauche neurale en axe dorso-ventral : le tube neural (futurs encéphale et moelle épinière), dont la partie dorsale provient des régions latérales de la plaque neurale et la partie ventrale, de sa région médiane, est alors en place. La soudure des deux bords de la plaque neurale laisse une lumière centrale, à l'origine des ventricules cérébraux et du canal de l'épendyme, dans lesquels circulera le liquide céphalo-rachidien.

En fonction de l'espèce considérée et du niveau rostro-caudal du névraxe, les cellules des crêtes neurales délaminent soit des plis neuraux en cours d'élévation ou de convergence, soit du toit du tube neural tout juste formé et entament leur migration vers leurs sites de différenciation terminale (Pour revue, voir Smith et Schoenwolf, 1997). Ces cellules spécifiées auparavant à la bordure entre le neurectoderme et l'épiderme présomptif sous l'influence inductrice de ces deux tissus et du mésoderme voisin, formeront presque tout le système nerveux périphérique (SNP), entre autres structures (os de la face et du crâne, mélanocytes...). De façon concomitante à la fermeture dorsale du tube neural, le mésoderme paraxial (par opposition à celui de la chorde, axial) qui flanque le tube neural de chaque côté, depuis le niveau du rhombencéphale, se segmente progressivement de la

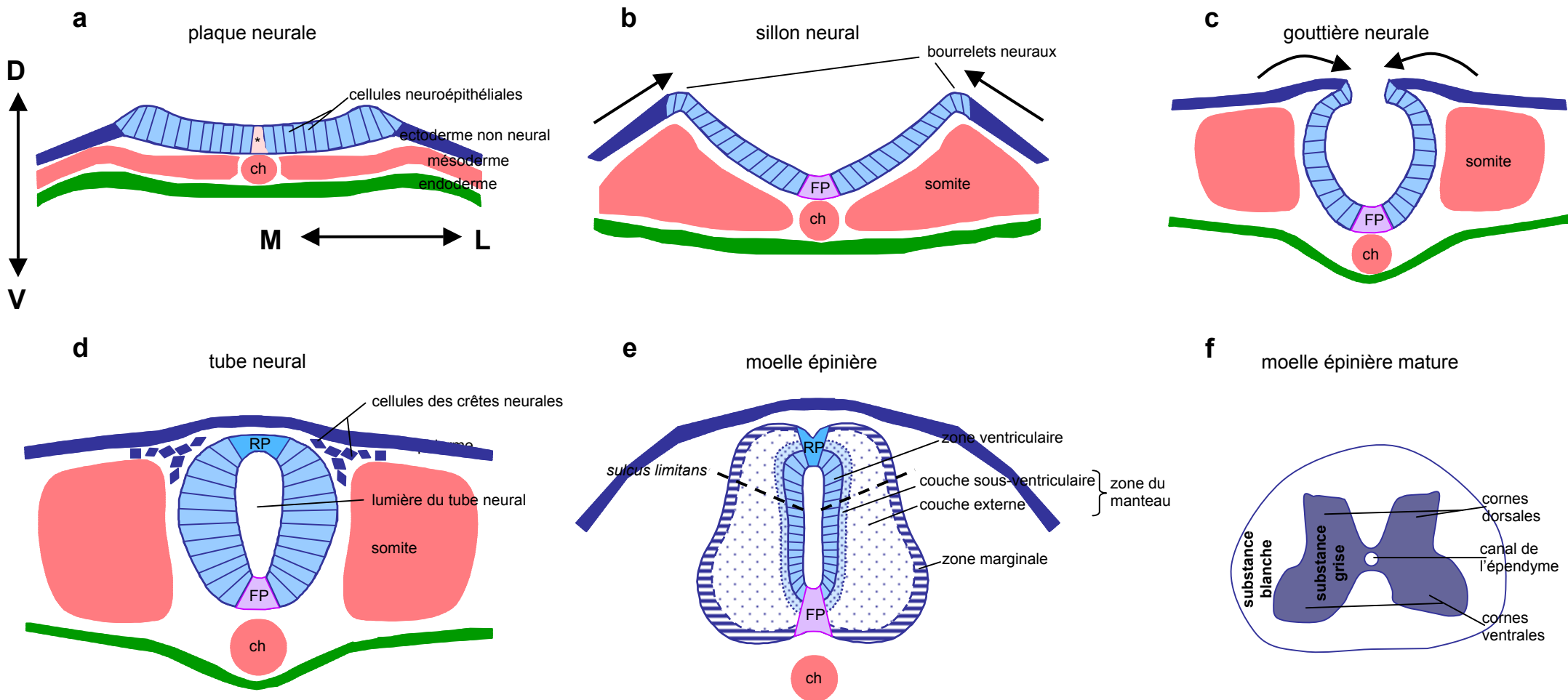


Figure 5 : Représentation schématique, en coupe transversale, du développement de la moelle épinière chez les vertébrés supérieurs. Les axes dorso-ventral et médio-latéral sont représentés par des doubles flèches (D : dorsal ; V : ventral ; M : médian ; L : latéral). a) La plaque neurale, en continuité avec l'ectoderme non neural, est constituée d'un épithélium simple, cylindrique, pseudostratifié, source de toutes les cellules neurales. Les cellules précurseurs de la *floor plate* (*) sont insérées dans la région la plus médiane de la plaque neurale. b) et c) La plaque neurale s'incurve en un sillon et les bourrelets neuraux (frontière entre le neuroectoderme et l'ectoderme non neural) se soulèvent et se rapprochent (flèches), formant la gouttière neurale. d) La formation du tube neural résulte de la fusion des bourrelets neuraux sur la ligne médiane dorsale et de leur séparation de l'épiderme sus-jacent. Le tube neural consiste toujours en un neuroépithélium dont les cellules morphologiquement identiques, en prolifération active, vont entamer la phase de neurogenèse. e) Au cours de ce processus, des cellules déterminées arrêtent de se diviser et migrent hors du neuroépithélium pour se différencier, formant la zone du manteau avec la couche sous-ventriculaire contenant les neurones post-mitotiques indifférenciés et une région plus externe où sont situés les neurones en différenciation et la zone marginale, site des prolongements axonaux des neurones différenciés. f) Plus tard, la zone du manteau devient la substance grise, centrale, formée des corps cellulaires des neurones différenciés et de cellules gliales et ayant l'apparence d'un papillon entourant le canal de l'épendyme avec deux cornes dorsales et deux cornes ventrales. La zone marginale devient la substance blanche, périphérique, au moment de la myélinisation. ch : chorde ; FP : *floor plate* ; RP : *roof plate*.

partie rostrale vers la partie caudale pour former les somites (à l'origine notamment des muscles striés et du squelette axial, dont les vertèbres qui entoureront la moelle épinière).

Chez les oiseaux et les mammifères, la formation du tube neural ainsi décrite ne concerne que les parties antérieures du SNC (encéphale, régions cervicale et thoracique de la moelle épinière) et est appelée neurulation primaire. C'est selon un processus morphogénétique consécutif et différent, la neurulation secondaire, que le tube neural à l'origine des parties lombaire, sacrée et caudale de la moelle épinière se met en place (pour revues, voir Le Douarin *et al.*, 1998 ; Catala, 1999 ; Colas et Schoenwolf, 2001).

III. La neurogenèse

Le tube neural ainsi mis en place consiste toujours en un neuroépithélium pseudostratifié, formé de cellules morphologiquement identiques, lequel va générer l'ensemble des cellules neuronales et gliales du SNC mature. Cette phase qui succède à la neurulation est la neurogenèse. Elle ne se produit pas de manière simultanée dans toutes les régions du névraxe et débute par une période de prolifération active. Après un certain nombre de divisions cellulaires, les cellules neuroépithéliales deviennent déterminées vers un lignage spécifique, cessent généralement de se multiplier et commencent à se différencier. En effet, certains types cellulaires neuraux sont déterminés lors de leur dernier cycle de division, d'autres avant la fin des mitoses mais il en existe aussi pour lesquels ce processus a lieu après (pour revue, voir Edlund et Jessell, 1999). L'arrêt des divisions cellulaires coïncide souvent avec le moment où les cellules neuronales quittent le neuroépithélium pour migrer vers leur localisation finale où elles achèveront leur différenciation.

Ces événements cellulaires (et d'autres tels que des changements de la forme de certaines cellules ou des phénomènes de mort cellulaire physiologique) conduisent à d'importantes modifications de la morphologie du tube neural, selon ses trois axes, aboutissant finalement au SNC adulte. Ainsi, la paroi du tube neural s'épaissit et devient composée de plusieurs couches cellulaires concentriques qui sont de l'intérieur vers l'extérieur (axe médio-latéral) (figure 5 ; pour revue, voir Poh *et al.*, 2002) :

- la zone ventriculaire ou assise germinative bordant la lumière du tube neural (futurs ventricules cérébraux, antérieurement et canal de l'épendyme, postérieurement) et qui contient les cellules neuroépithéliales. C'est le siège d'une prolifération intense. A la fin de la neurogenèse, les cellules de cette zone deviendront ciliées et formeront l'épendyme.

- la zone du manteau (également appelée zone intermédiaire) divisée en une zone sous-ventriculaire contenant les cellules neuronales post-mitotiques non différenciées -sauf dans le télencéphale où elle contient des cellules précurseurs en prolifération (pour revue, voir Campbell, 2003)- et en une région plus latérale où ces dernières se différencient. C'est la future substance grise, formée des corps cellulaires des neurones différenciés et de cellules gliales. Au fur et à mesure de sa formation, elle prend l'apparence d'un papillon avec deux cornes dorsales et deux cornes ventrales, dans la région de la moelle épinière.

- La zone marginale formée par les axones des neurones différenciés qui quittent le tube neural pour aller innervier leur cible. Elle deviendra la substance blanche au moment de la myélinisation.

Cette topographie du tube neural (substance grise centrale et substance blanche périphérique) est retrouvée dans tout le SNC, à l'exception des hémisphères cérébraux et du cervelet dont le cortex (couche superficielle) est la substance grise.

Le fonctionnement correct du SNC nécessite l'établissement d'une grande variété de types cellulaires dont l'identité dépend de la position de leurs cellules précurseurs selon les axes rostro-caudal et dorso-ventral du tube neural et du moment de leur naissance. Les cellules neuroépithéliales sont informées de leur position selon ces axes par les signaux environnants auxquels elles répondent par l'expression de facteurs de transcription spécifiques. Ceux-ci mettront en route les processus moléculaires aboutissant à la différenciation de ces cellules selon un lignage neural bien précis. Les signaux environnants se comportent en quelque sorte comme des repères indiquant aux cellules le destin qu'elles doivent adopter et les facteurs de transcription qui y répondent, comme des interprètes de ces signaux.

Dans un premier temps, ces signaux émanent des structures non neurales (endo-mésoderme et ectoderme) et permettent une régionalisation grossière de l'ébauche neurale, marquée par l'expression de gènes dans des territoires limités. Ensuite, des signaux issus du mésoderme et des cellules neurales, elles-mêmes, vont se combiner aux premiers pour en moduler l'action et affiner cette régionalisation, aboutissant à un découpage du SNC en territoires de plus en plus précis, caractérisés par l'expression de gènes spécifiques. Divers neurones d'identité distincte seront produits dans ces différents territoires. Ainsi, la compartimentation moléculaire du tube neural est à l'origine de la diversité des types cellulaires du SNC. La régionalisation rostro-caudale du névraxe se met en place avant et indépendamment de sa régionalisation dorso-ventrale (pour revues, voir Lumsden et Krumlauf, 1996 ; Altmann et Brivanlou, 2001).

IV. Régionalisation du système nerveux central selon l'axe rostro-caudal

Chez les vertébrés, la régionalisation rostro-caudale du SNC se traduit, aux plans macroscopique et fonctionnel, par la formation de différentes régions encéphaliques, dans sa partie antérieure et de la moelle épinière, dans sa partie postérieure. Cette organisation qui s'établit précocement, dès l'induction neurale, peut être mise en évidence morphologiquement mais aussi grâce à l'utilisation de marqueurs moléculaires (pour revues, voir Lumsden et Krumlauf, 1996 ; Altmann et Brivanlou, 2001).

1. Initiation de la régionalisation rostro-caudale du névraxe

Suite aux expériences d'embryologie classique de Hans Spemann et Hilde Mangold, plusieurs modèles ont été élaborés pour rendre compte de la mise en place de la régionalisation rostro-caudale du SNC, dont deux ont recueilli le plus grand nombre de partisans (figure 6 ; pour revues, voir Lumsden et Krumlauf, 1996 ; Sasai et De Robertis, 1997 ; Altmann et Brivanlou, 2001 ; Stern, 2002).

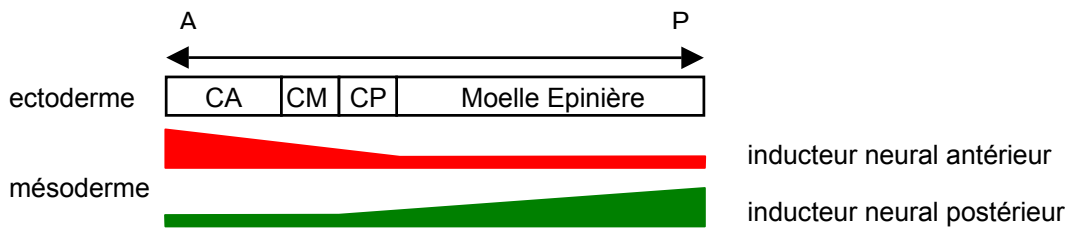
- Le modèle à deux inducteurs, fondé sur les observations d'Otto Mangold réalisées en 1933, propose l'existence de signaux inducteurs de tissu neural antérieur et de signaux inducteurs de tissu neural postérieur.

- Le modèle à deux étapes (ou activation-transformation), établi vingt ans plus tard d'après les expériences de Pieter Nieuwkoop, suggère l'intervention de signaux inducteurs de tissu neural de caractère le plus antérieur et de signaux caudalisants (n'ayant pas d'activité inductrice de tissu neural) dictant des destins plus postérieurs au tissu induit. Les FGFs, les Wnts et l'acide rétinoïque sont des candidats à la fonction caudalisante.

2. Description sommaire de la mise en place des différentes régions du névraxe selon l'axe rostro-caudal

La régionalisation rostro-caudale du SNC est déjà apparente au stade plaque neurale laquelle, dès sa formation, est large dans la région rostrale (futur encéphale) et étroite dans la région caudale (future moelle épinière). Des marqueurs moléculaires des différentes régions de l'encéphale et de la moelle épinière tels que *OtxA*, *En-2*, *Krox20* et *HoxB9* y sont même exprimés, au moins chez le xénope (pour revue, voir Altmann et Brivanlou, 2001). La mise en place du tube neural fait apparaître la vésicule cérébrale primitive, issue de la partie élargie de la plaque neurale. Celle-ci se divise très tôt en trois

A. modèle à deux inducteurs



B. modèle à deux étapes

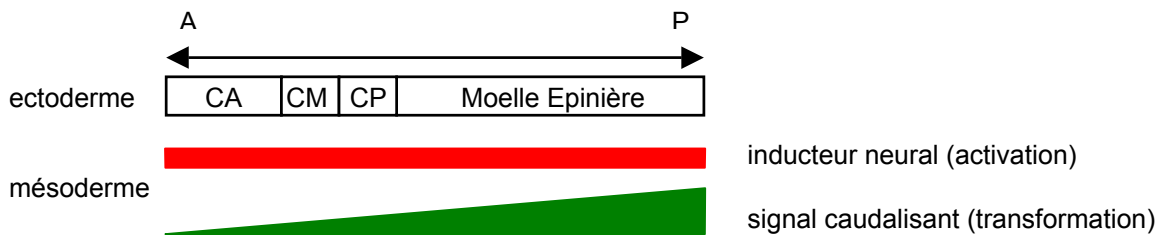


Figure 6 : Modèles schématiques de la mise en place de la régionalisation rostro-caudale du névraxe (d'après Sasai et De Robertis, 1997). A : modèle à deux inducteurs (ou des organisateurs « tête » et « tronc-queue »). Selon cette hypothèse, les premiers tissus invaginés à travers la lèvres dorsale du blastopore entraînent le développement de structures neurales antérieures et les suivants, celui de la moelle épinière. La concentration des deux types d'inducteur neural et/ou leur combinaison déterminera(en)t la mise en place des régions intermédiaires du SNC. B : modèle à deux étapes. Au cours de la première, appelée activation ou induction, des signaux de l'organisateur induisent l'ectoderme sus-jacent à adopter la voie neurale et lui imposent en même temps le caractère le plus antérieur. Lors de l'étape suivante, dite transformation ou caudalisation, des signaux secondaires de l'organisateur (n'ayant pas d'activité inductrice de tissu neural) agissent sur les tissus induits, leur dictant des destins plus postérieurs. La double flèche indique l'axe rostro-caudal ou antéro-postérieur (A : antérieur, P : postérieur). CA : cerveau antérieur, CM : cerveau moyen, CP : cerveau postérieur.

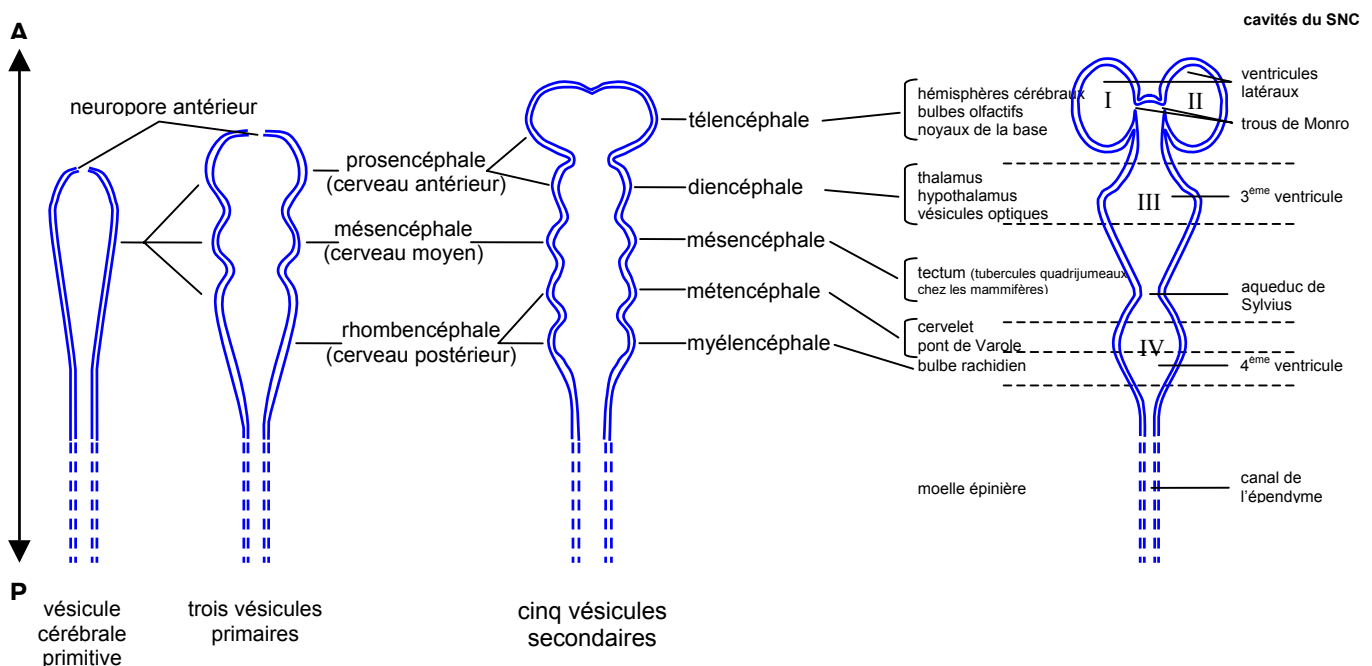


Figure 7 : Schéma en coupe longitudinale de la mise en place des différentes régions du névraxe selon l'axe antéro-postérieur. A : antérieur, P : postérieur, SNC : système nerveux central. Les chiffres romains désignent les ventricules cérébraux.

vésicules appelées, de la plus rostrale à la plus caudale, le prosencéphale (ou cerveau antérieur), le mésencéphale (ou cerveau moyen) et le rhombencéphale (ou cerveau postérieur).

Dans un second temps, la constriction de deux des trois vésicules cérébrales primitives aboutit à l'élaboration de cinq vésicules qui préfigurent les cinq grandes régions de l'encéphale. Le prosencéphale donne naissance au télencéphale, rostralement, et au diencephale, qui contient les vésicules optiques, en arrière. Le télencéphale est à l'origine des hémisphères cérébraux, des bulbes olfactifs et des noyaux de la base et le diencephale, du thalamus et de l'hypothalamus. Le mésencéphale qui fait suite au diencephale, ne se subdivise pas et comprendra le tectum, lequel se différenciera en tubercules quadrijumeaux (relais des voies visuelles, auditives et de l'équilibre), chez les mammifères. Le rhombencéphale forme le métencéphale, en arrière du mésencéphale, duquel émergeront le cervelet (centre de l'équilibre) et les structures pontiques associées et le myélocéphale qui deviendra le bulbe rachidien, continuation rostrale peu différenciée de la moelle épinière. La partie caudale du tube neural conserve sa forme tubulaire et donnera la moelle épinière (figure 7 ; pour revue, voir Altmann et Brivanlou, 2001).

Une régionalisation rostro-caudale est également visible à plus petite échelle, aux niveaux anatomique, cellulaire et moléculaire, au sein de chaque division du SNC. Nous nous intéresserons ici uniquement à la moelle épinière.

3. Régionalisation rostro-caudale de la moelle épinière

En dépit d'une apparence relativement uniforme le long de l'axe rostro-caudal, la moelle épinière présente des variations dans sa composition cellulaire et moléculaire suivant cet axe. En particulier, il existe différents sous-types de neurones moteurs (ou motoneurones) spinaux dont les corps cellulaires sont arrangés en colonnes longitudinales discontinues qui occupent différents niveaux antéro-postérieurs (dorso-ventraux et médio-latéraux) (figures 8 et 9). Outre leur position stéréotypée, le trajet de leurs axones et les muscles qu'ils innervent distinguent ces sous-classes de neurones. Ainsi, les motoneurones situés aux niveaux brachial et lombaire de la moelle épinière ciblent les muscles des membres et sont différents de ceux qui se forment aux niveaux cervical et thoracique. Au sein de ces colonnes, les sous-types de motoneurones sont encore subdivisés en sous-groupes, localisés à différentes positions antéro-postérieures (et dorso-ventrales), sur la base de leur muscle cible. Chaque sous-classe de motoneurones peut être définie par l'expression de différents facteurs de transcription à domaine LIM et les sous-groupes de

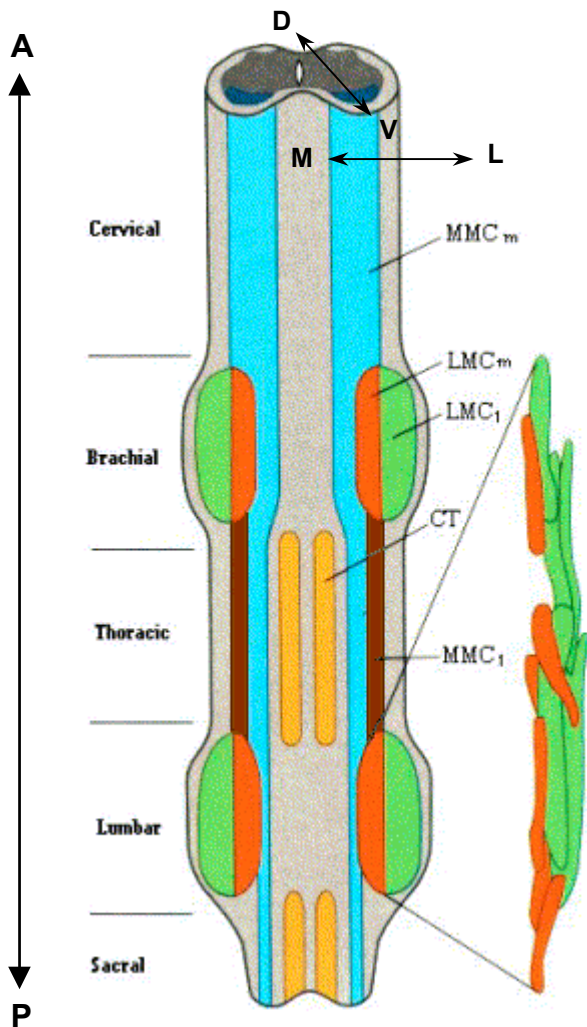


Figure 8 : Diagramme de la moelle épinière embryonnaire de poulet à E5-E8 montrant l'organisation des colonnes motrices (d'après Lumsden, 1995). Les axes antéro-postérieur, dorso-ventral et médio-latéral sont indiqués par des doubles flèches (A : antérieur ; P : postérieur ; D : dorsal ; V : ventral ; M : médian ; L : latéral). L'axe antéro-postérieur, est divisé en cinq régions selon la présence ou l'absence de cinq sous-types de motoneurones : les neurones des colonnes MMC_m (bleu), MMC_l (brun), LMC_m (rouge) et LMC_l (vert) innervent les muscles volontaires du cou et du tronc (MMC) ou des membres (LMC) ; ceux des colonnes CT (orange) innervent le système nerveux autonome. La région agrandie montre les groupes de motoneurones dans la colonne LMC lombaire ; chacun des groupes de neurones localisés latéralement (vert) innerve un muscle dérivé de la masse pré musculaire dorsale du membre postérieur, tandis que les groupes de neurones médians (rouge) ciblent les muscles ventraux. MMC_{m/l} : *medial/lateral division of the median motor column* ; LMC_{m/l} : *medial/lateral division of the lateral motor column* ; CT : *column of Terni*.

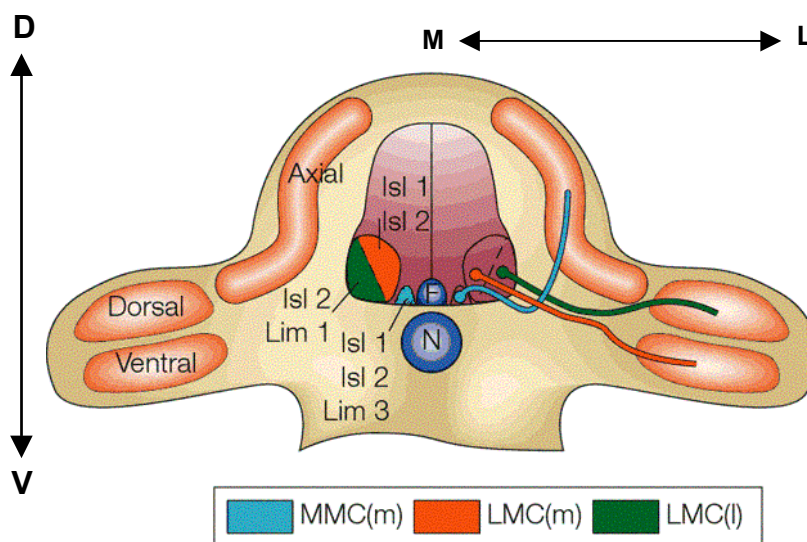


Figure 9 : Organisation spatiale des motoneurones dans la moelle épinière en développement (d'après Jessell, 2000). Coupe transversale schématique de l'embryon de poulet au niveau des membres, montrant la position des colonnes motrices en relation avec le profil des projections axonales vers la périphérie et l'expression des protéines à homéodomaine LIM. Les axes dorso-ventral et médio-latéral sont représentés par des doubles flèches (D : dorsal ; V : ventral ; M : médian ; L : latéral). Les régions oranges indiquent la position des muscles cibles. N, *notochord* ; F, *floor plate* ; LMC(m), *medial division of the lateral motor column* ; LMC(l), *lateral division of the lateral motor column* ; MMC(m) : *medial division of the median motor column*.

motoneurones à l'intérieur de ces sous-classes, identifiés par celle des protéines ETS. Des études génétiques montrent, de plus, que l'expression de différentes combinaisons de facteurs du groupe LIM spécifie l'identité des sous-types de motoneurones et détermine la trajectoire de leurs projections axonales (pour revues, voir Lumsden et Krumlauf, 1996 ; Altmann et Brivanlou, 2001).

De nombreux gènes de la famille Hox (homologues des gènes homéotiques du complexe HOM-C de la drosophile qui confèrent leur identité aux différents segments de la larve) sont exprimés le long de la moelle épinière, avec différentes limites antérieures d'expression, subdivisant la structure en territoires distincts, caractérisés par une combinaison spécifique de gènes *Hox* (figure 10). Cette dernière, par analogie avec les observations réalisées au niveau du rhombencéphale (pour revues, voir Lumsden et Krumlauf, 1996 ; Schneider-Maunoury *et al.*, 1998 ; Catala, 1999 ; Altmann et Brivanlou, 2001), pourrait participer à l'organisation des différents types cellulaires selon l'axe antéro-postérieur dans la moelle épinière. La transposition des régions brachiale et thoracique présomptives du névraxe aboutit à la respécification de l'expression des gènes *Hox* et *Lim* et les sous-classes de motoneurones se développent en fonction de leur nouvelle position (pour revue, voir Lumsden et Krumlauf, 1996). Des résultats récents indiquent que le nœud, principalement *via* le FGF, initie la régionalisation rostro-caudale de l'expression des gènes du complexe Hox-c dans les neurones spinaux et que le mésoderme paraxial affine le profil d'expression de ces gènes, *via* l'acide rétinoïque, au niveau cervical et *via* l'activité de GDF11 (*growth and differentiation factor 11*), un membre de la superfamille du TGF- β (*transforming growth factor- β*), au niveau thoraco-lombaire (figure 11 ; Liu *et al.*, 2001).

V. Régionalisation du système nerveux central selon l'axe dorso-ventral

L'organisation dorso-ventrale du SNC mature, moins marquée morphologiquement que l'antéro-postérieure, se manifeste aux plans histologique et physiologique par la distribution stéréotypée de différentes structures ayant une fonction propre.

Par exemple, le pallium (ou cortex cérébral, à partir des amniotes) est localisé dans la partie dorsale des vésicules télencéphaliques (hémisphères cérébraux) et les noyaux de la base, dans leur partie ventrale. Les différentes populations cellulaires à l'origine de ces formations dérivent de territoires distincts du neuroépithélium télencéphalique, définis par leur morphologie, leur position selon l'axe dorso-ventral et les gènes qu'ils expriment (pour

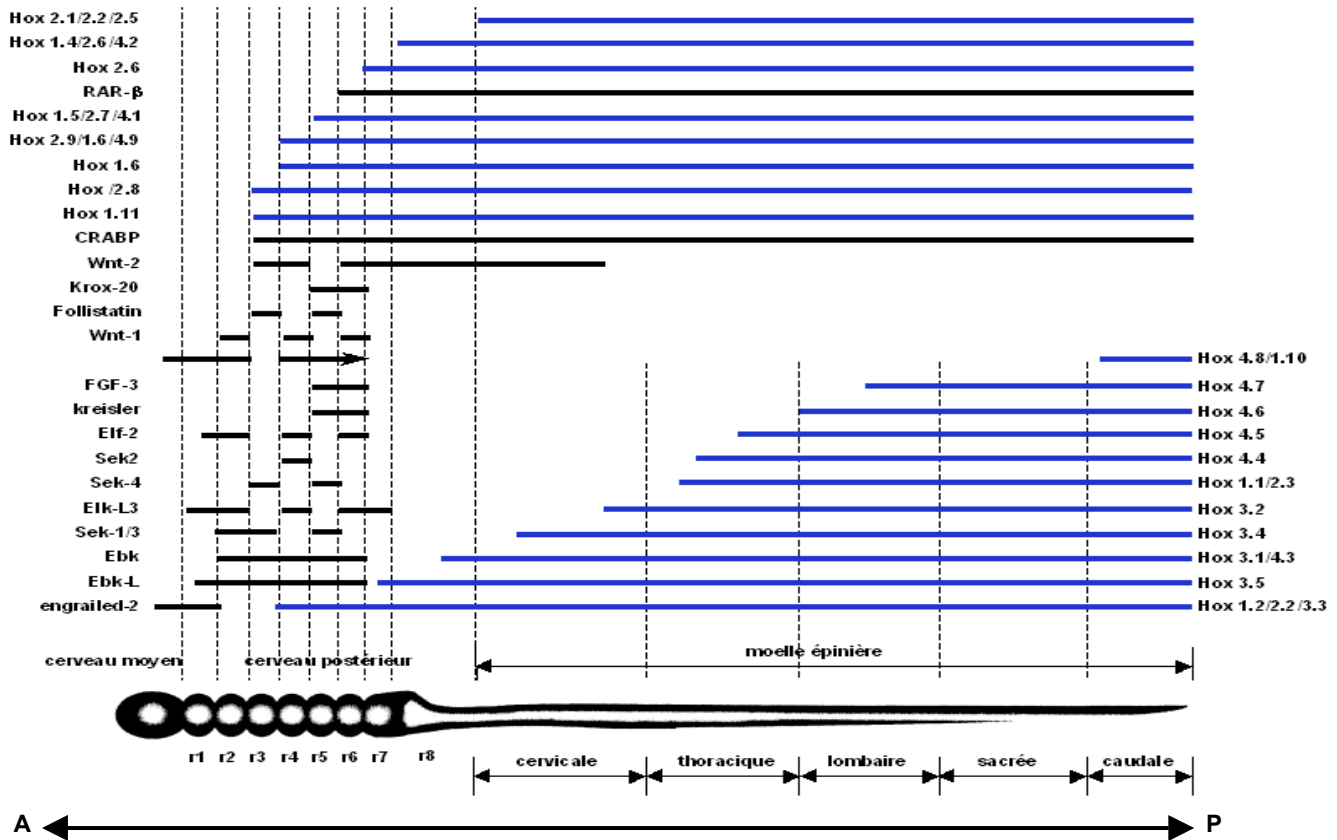


Figure 10 : Expression génique différentielle le long de l'axe antéro-postérieur (d'après Altmann et Brivanlou, 2001). L'axe antéro-postérieur est indiqué par une double flèche (A : antérieur ; P : postérieur). Les patrons d'expression génique sont représentés au dessus d'un diagramme des régions caudales du SNC en développement. L'expression des gènes *Hox* (bleu) présente généralement une frontière antérieure et s'étend aux régions les plus caudales. Les profils montrés ne représentent pas l'expression à un temps donné mais reflètent plutôt l'expression en général. Certains gènes, comme les postérieurs, sont exprimés tardivement alors que les plus antérieurs, le sont plus tôt. r1 à r8 : rhombomères (divisions métamériques du cerveau postérieur ou rhombencéphale).

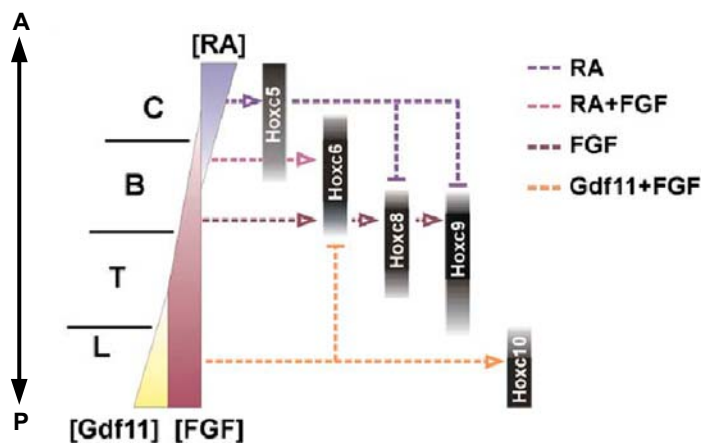


Figure 11 : Schéma résumant l'action combinée des FGFs, de l'acide rétinoïque (RA) et de Gdf11 dans l'établissement du profil d'expression des protéines Hox-c selon l'axe antéro-postérieur de la moelle épinière en développement (d'après Liu *et al.*, 2001). L'axe antéro-postérieur est indiqué par une double flèche (A : antérieur ; P : postérieur). De faibles concentrations de FGF induisent l'expression de Hox-c6 et des concentrations plus élevées induisent celle de Hox-c8 et Hox-c9. Dans la moelle épinière cervicale, RA induit l'expression de Hox-c5. Dans la partie rostrale de la région brachiale, RA régule positivement l'expression de Hox-c6 et inhibe celle de Hox-c8 et Hox-c9. Dans des régions plus postérieures de la moelle épinière, Gdf11 semble agir avec les FGFs dans l'induction de l'expression de Hox-c10 et inhibe celle de Hox-c6. La distribution restreinte de ces facteurs le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon semble établir l'expression régionalisée des protéines Hox-c dans les motoneurones. C : cervical ; B : brachial ; T : thoracique ; L : lombaire.

revue, voir Campbell, 2003). Dans les régions plus postérieures du névraxe, le tectum (ou les tubercules quadrijumeaux, chez les mammifères) et le cervelet forment les structures dorsales du mésencéphale et du métencéphale, respectivement. La région ventrale du mésencéphale est occupée par les pédoncules cérébraux et celle du métencéphale, par le pont de Varole.

Au niveau latéral de la moelle épinière, le *sulcus limitans*, un sillon longitudinal entre les cornes dorsale et ventrale de la substance grise permet de distinguer la partie dorsale de la partie ventrale de cette région du névraxe (pour revue, voir Poh *et al.*, 2002). Cette ségrégation anatomique se retrouve au niveau fonctionnel ; schématiquement, la région dorsale de la moelle épinière (appelée plaque alaire, chez l'embryon) reçoit les messages sensoriels grâce aux interneurons des cornes dorsales et sa région ventrale (plaque basale), communique les informations motrices *via* les motoneurons, contenus dans les cornes ventrales (pour revue, voir Lee et Jessell, 1999).

Au sein des cornes dorsales, il existe plusieurs populations d'interneurons sensoriels et des cornes ventrales, diverses classes d'interneurons ventraux et de motoneurons somatiques qui occupent des positions bien définies (pour revue, voir Poh *et al.*, 2002). Chacune de ces populations neuronales provient d'un territoire précis de la zone ventriculaire, caractérisé par l'expression d'une combinaison spécifique de facteurs de transcription et par sa position dorso-ventrale, sauf les motoneurons qui naissent tous d'un même domaine et qui acquièrent ensuite des caractéristiques les subdivisant en colonnes, puis en sous-groupes (pour revues, voir Jessell, 2000 ; Poh *et al.*, 2002).

L'établissement de la régionalisation dorso-ventrale du SNC a été principalement étudiée au niveau de la moelle épinière du fait de la simplicité de son architecture et de son fonctionnement ; toutefois, des mécanismes similaires sont à l'œuvre dans les régions de l'encéphale (pour revues, voir Tanabe et Jessell, 1996 ; Altmann et Brivanlou, 2001).

1. Initiation de la régionalisation dorso-ventrale du névraxe

L'organisation dorso-ventrale du névraxe commence à s'établir au stade plaque neurale, ébauche dont l'axe médio-latéral correspond au futur axe dorso-ventral. Elle se manifeste initialement par la mise en place des cellules de la *floor plate* dans la partie la plus médiane de la plaque neurale (depuis la région du futur cerveau moyen) et par la spécification des cellules des crêtes neurales, dans ses régions les plus latérales (c'est à dire à la bordure qu'elle forme avec l'ectoderme non neural), suivie de l'émigration de ces

cellules avant ou juste après la fermeture dorsale du tube neural. Ensuite, les cellules les plus dorsales du tube neural forment la plaque du toit ou *roof plate*. Enfin, différentes populations neuronales se mettent en place dans le neuroépithélium, d'abord dans sa partie ventrale, puis dans sa partie dorsale (figure 12).

L'expression de différents marqueurs témoigne également de la régionalisation dorso-ventrale de l'ébauche neurale. Toutes les cellules de la plaque neurale nouvellement formée expriment les gènes codant les facteurs de transcription à homéodomaine Pax3, Pax7 (*paired-homeobox*), Msx1 et Msx2, quelle que soit leur position selon l'axe médio-latéral. Au stade gouttière neurale, ces gènes ne sont plus exprimés dans la partie la plus médiane de l'ébauche du SNC et dans le tube neural, leur expression est restreinte à la région dorsale du neuroépithélium (Liem *et al.*, 1995 ; pour revue, voir Tanabe et Jessell, 1996).

Les étapes initiales de régionalisation dorso-ventrale du SNC dépendent de signaux sécrétés par la corde (dans un premier temps accolée à la ligne médiane/ventrale de la plaque neurale/du tube neural) et par l'ectoderme non neural (qui flanque latéralement, puis recouvre l'ébauche neurale), puis par la *floor plate* et la *roof plate* qui prennent, en quelque sorte, le relais (pour revues, voir Tanabe et Jessell, 1996 ; Lee et Jessell, 1999 ; Jessell, 2000 ; Altmann et Brivanlou, 2001 ; Poh *et al.*, 2002).

2. Mise en place des populations cellulaires ventrales du névraxe

Au début des années 1990, plusieurs études menées *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence l'influence ventralisante de la corde et de la *floor plate* sur le développement du SNC. Par exemple, la greffe d'un segment de corde ou de *floor plate* contre les régions latérale ou dorsale de la moelle épinière embryonnaire aboutissait à la formation d'une *floor plate* et de motoneurones ectopiques et à la disparition de marqueurs dorsaux (Yamada *et al.*, 1991 ; Ericson *et al.*, 1992). De manière intéressante, des expériences de culture ont montré que la *floor plate* acquérait sa capacité à induire la genèse de motoneurones plus tard que la corde et qu'elle la conservait pendant une période développementale plus longue (Yamada *et al.*, 1993). L'activité de ces structures axiales ventrales est médiée par la protéine Sonic hedgehog (SHH) (pour revues, voir Tanabe et Jessell, 1996 ; Jessell, 2000 ; Marti et Bovolenta, 2002 ; Poh *et al.*, 2002).

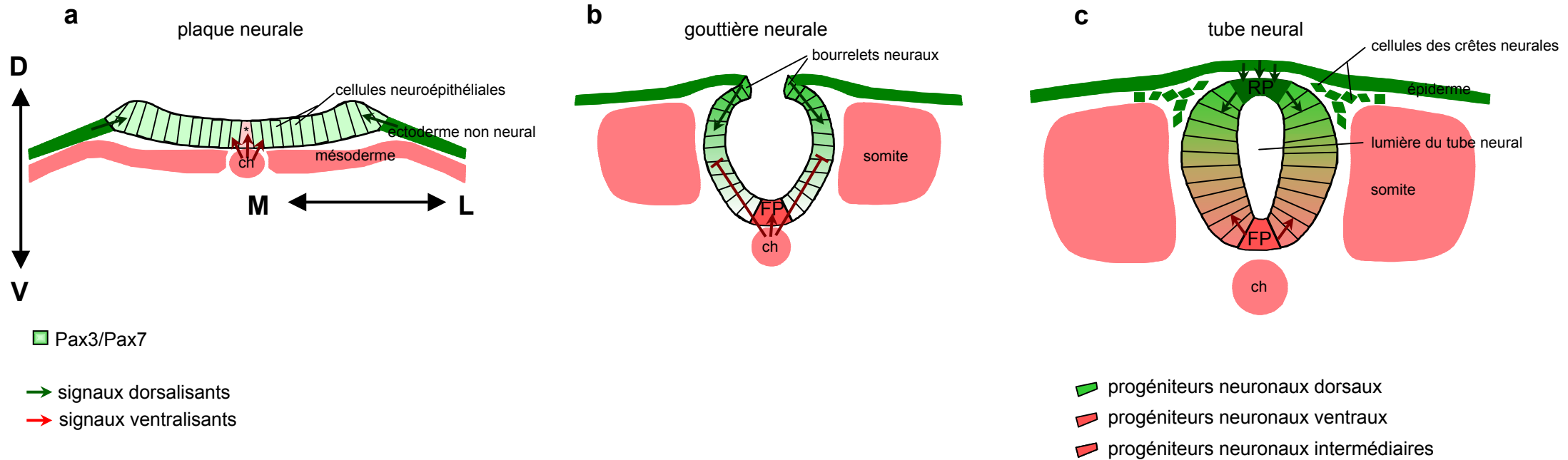


Figure 12 : Représentation schématique, en coupe transversale, de la mise en place de la régionalisation dorso-ventrale de la moelle épinière. Les axes dorso-ventral et médo-latéral sont représentés par des doubles flèches (D : dorsal ; V : ventral ; M : médian ; L : latéral). a) Au stade plaque neurale, toutes les cellules neuroépithéliales expriment les facteurs de transcription Pax3 et Pax7. L'astérisque marque les précurseurs de la *floor plate*. L'ectoderme non neural, qui flanque la plaque neurale de chaque côté, et la corde, accolée à sa région médiane, sécrètent des signaux (flèches) responsables de l'initiation de la régionalisation dorso-ventrale du SNC. b) Des signaux ventralisants (→) issus de la corde entraînent la répression de l'expression de Pax3 et Pax7 dans la région médiane/ventrale de la gouttière neurale et la différenciation des cellules de *floor plate* dans sa partie la plus médiane/ventrale. Des signaux dorsalisants (→) produits par l'ectoderme non neural maintiennent l'expression de Pax3 et Pax7 dans les régions latérales/dorsales de l'ébauche neurale et permettent la mise en place des cellules des crêtes neurales, dans ses parties les plus latérales/dorsales ou bourrelets neuraux. c) Les cellules des crêtes neurales entament leur migration juste avant ou au moment de la fermeture du tube neural et les cellules de la *roof plate* sont générées dans la région la plus dorsale du tube neural sous l'effet de signaux (→) issus de l'ectoderme non neural. La *roof plate* et la *floor plate* sécrètent à leur tour des signaux dorsalisants (→) et ventralisants (→), respectivement, qui vont contrôler la mise en place des différentes populations neuronales de la moelle épinière. ch : corde ; FP : *floor plate* ; RP : *roof plate*.

a. Eléments de la voie de signalisation SHH

Chez les vertébrés, SHH est une glycoprotéine de la famille Hedgehog dont le membre fondateur, hedgehog (Hh), a été découvert chez la drosophile. Elle est exprimée dans des structures embryonnaires connues pour leur propriétés organisatrices telles que le nœud (et ses équivalents chez les anamniotes), la chorde, la *floor plate*, la zone d'activité polarisante du bourgeon de membre où elle participe à la régulation de divers processus dont la mise en place de l'asymétrie gauche-droite de l'organisme et de la polarité dorso-ventrale du SNC et des somites, la morphogenèse des membres et de divers organes. SHH est capable d'agir localement et à distance (pour revues, voir Weed *et al.*, 1997 ; Goodrich et Scott, 1998 ; McMahon, 2000 ; Marti et Bovolenta, 2002).

SHH est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif dont le clivage auto-protéolytique génère deux produits sécrétés : une protéine carboxy-terminale de 25 kDa et une protéine amino-terminale de 19 kDa, laquelle est responsable de toutes les fonctions biologiques connues de SHH. Cette dernière est couplée au cholestérol par son extrémité C-terminale et au palmitate, par son extrémité N-terminale (figure 13a). L'addition covalente de cholestérol facilite la sécrétion régulée et l'activité à distance de SHH et celle de palmitate augmente sa capacité inductrice *in vitro* et *in vivo*. D'ailleurs, au moins chez la drosophile, la sécrétion de Hh couplée au cholestérol nécessite la fonction d'une protéine transmembranaire appelée Disp (Dispatched) (pour revues, voir Weed *et al.*, 1997 ; Litingtung et Chiang, 2000a ; McMahon, 2000 ; Ho et Scott, 2002 ; Marti et Bovolenta, 2002).

La voie de transduction du signal Hh est très conservée au cours de l'évolution (figure 13b). Le récepteur de SHH est un complexe formé de deux protéines transmembranaires : Ptc (Patched), la composante de réception du signal qui lie SHH et Smo (Smoothened), la composante de signalisation. En absence de SHH, Ptc réprime la transcription des gènes cibles *via* l'inhibition de l'activité de Smo. La liaison de SHH à Ptc entraîne la dissociation de ce dernier et de Smo lequel peut alors transmettre le signal en aval (pour revues, voir Weed *et al.*, 1997 ; Litingtung et Chiang, 2000a ; McMahon, 2000 ; Ho et Scott, 2002 ; Marti et Bovolenta, 2002).

Chez les vertébrés, les gènes *Ptc* et *Smo* sont exprimés dans les tissus répondant à SHH selon des patrons très chevauchants. D'ailleurs, SHH stimule la transcription de *Ptc*, dont le niveau d'expression reflète le degré d'activation de la signalisation (pour revues, voir Weed *et al.*, 1997 ; Goodrich et Scott, 1998 ; Litingtung et Chiang, 2000a).

En plus de réprimer la transcription des gènes dépendante de SHH, Ptc séquestre son ligand restreignant ainsi sa diffusion dans les tissus et constituant un mécanisme de rétrocontrôle important de la voie SHH (pour revues, voir Lichtingtung et Chiang, 2000a ; McMahon, 2000 ; Ho et Scott, 2002). D'autres régulateurs de cette voie de signalisation agissant à la surface cellulaire ont été identifiés. Hip (Hedgehog-interacting protein) est une protéine transmembranaire qui lie SHH avec une affinité similaire à celle de Ptc et atténue l'intensité du signal. La vitronectine, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, fixe également SHH directement et potentialise son effet inducteur sur le développement des motoneurones. SHH stimule l'expression de chacune de ces protéines dans la région ventrale du tube neural (pour revues, voir Jessell, 2000 ; Litingtung et Chiang, 2000a ; Marti et Bovolenta, 2002).

L'intervention des facteurs de transcription à doigts de zinc de la famille GLI (*glioblastoma gene products*) est la dernière étape connue de la transduction du signal SHH (pour revues, voir Ruiz i Altaba, 1999c ; Marti et Bovolenta, 2002). Plusieurs études suggèrent néanmoins l'existence d'une signalisation SHH indépendante de l'activité des protéines Gli (pour revues, voir Matisse et Joyner, 1999 ; Ruiz i Altaba, 1999a).

Trois membres de la famille GLI, Gli1, Gli2 et Gli3, ont été identifiés chez les vertébrés, lesquels peuvent tous activer la transcription. Gli2 et Gli3 sont également capables de réprimer la transcription lorsqu'ils sont sous une forme ayant subi une protéolyse les privant d'une portion C-terminale (pour revues, voir Matisse et Joyner, 1999 ; Ruiz i Altaba, 1999a ; Ruiz i Altaba *et al.*, 2003).

Les facteurs Gli sont régulés différemment aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel. SHH active la transcription de Gli1 et de Gli2 et inhibe celle de Gli3. D'ailleurs, en général, Gli1 et Gli2 sont exprimés près de la source de SHH alors que Gli3 l'est à distance (pour revue, voir Ruiz i Altaba, 1999a). D'autre part, SHH semble stimuler la fonction activatrice de Gli2 et inhibe la production de la forme Gli3 inhibitrice (pour revue, voir Ruiz i Altaba *et al.*, 2003). Différentes formes tronquées des facteurs Gli ont des activités transcriptionnelles et une localisation subcellulaire différentes et hautement régulées (pour revue, voir Marti et Bovolenta, 2002). La navigation des protéines Gli entre les compartiments cytoplasmique et nucléaire dépend d'un complexe formé par la sérine-thréonine kinase Fu (Fused), la protéine Su(Fu) (Supressor of Fused) et probablement d'autres composants qui pourraient être associés aux microtubules comme c'est le cas chez la drosophile (pour revue, voir Marti et Bovolenta, 2002). Les facteurs Gli agissent de

manière dépendante du contexte cellulaire, ce qui rend plus complexe la compréhension de leur mode d'action (Ruiz i Altaba, 1999b)

b. Rôle de SHH dans l'établissement des populations cellulaires ventrales du névraxe

Des analyses détaillées de la distribution de la protéine SHH pendant le développement précoce du SNC ont révélé sa présence dans la corde et la *floor plate* au moment où elles présentent leur influence ventralisante sur l'ébauche neurale (figure 14 ; Marti *et al.*, 1995b ; Roelink *et al.*, 1995).

Diverses études de perte et de gain de fonction ont, par la suite, démontré que SHH était à la fois nécessaire et suffisante pour la genèse d'un certain nombre de types cellulaires neuraux ventraux (pour revues, voir Tanabe et Jessell, 1996 ; Jessell, 2000 ; Litingtung et Chiang, 2000a ; Poh *et al.*, 2002). Ainsi, SHH induit le développement de cellules de *floor plate*, de motoneurones et d'interneurones ventraux dans des explants de plaque neurale, la genèse de chacun de ces types cellulaires nécessitant une concentration différente de la protéine (Marti *et al.*, 1995a ; Roelink *et al.*, 1995 ; Ericson *et al.*, 1997). D'autre part, SHH réprime l'expression de Pax3, Pax7 et Msx1 dans les régions latérales de la plaque neurale (futur tube neural dorsal) en culture (Liem *et al.*, 1995 ; Ericson *et al.*, 1996). Inversement, l'inhibition *in vitro* de l'activité de SHH dans la corde et la *floor plate*, au moyen d'anticorps bloquants, montre qu'elle est requise pour le développement de la *floor plate* et des motoneurones dans des explants de plaque neurale (Marti *et al.*, 1995a ; Ericson *et al.*, 1996). Confirmant les données précédentes, les conséquences de l'inactivation du gène *SHH* chez la souris indiquent que la protéine est requise pour le maintien de la corde et le développement de la *floor plate*, des motoneurones et de certaines populations d'interneurones ventraux. De plus, chez ces mutants, le tube neural ventral est dit "dorsalisé" c'est à dire qu'il acquiert des caractéristiques dorsales telles que l'expression de marqueurs dorsaux dont Pax3 et Pax7 (Chiang *et al.*, 1996 ; Pierani *et al.*, 1999).

Dans le tube neural ventral, de la région la plus ventrale à la plus dorsale, se développent la *floor plate*, les interneurones V3, les motoneurones, les interneurones V2, les interneurones V1 et les interneurones V0. De manière frappante, les concentrations de SHH requises pour leur genèse *in vitro* reflètent la position dorso-ventrale à laquelle sont produites ces populations cellulaires *in situ*. De cette façon, le développement des cellules de *floor plate* (les plus proches de la source initiale de SHH -i. e. la corde) demande une dose de SHH supérieure à celle nécessaire pour le développement des motoneurones, elle-

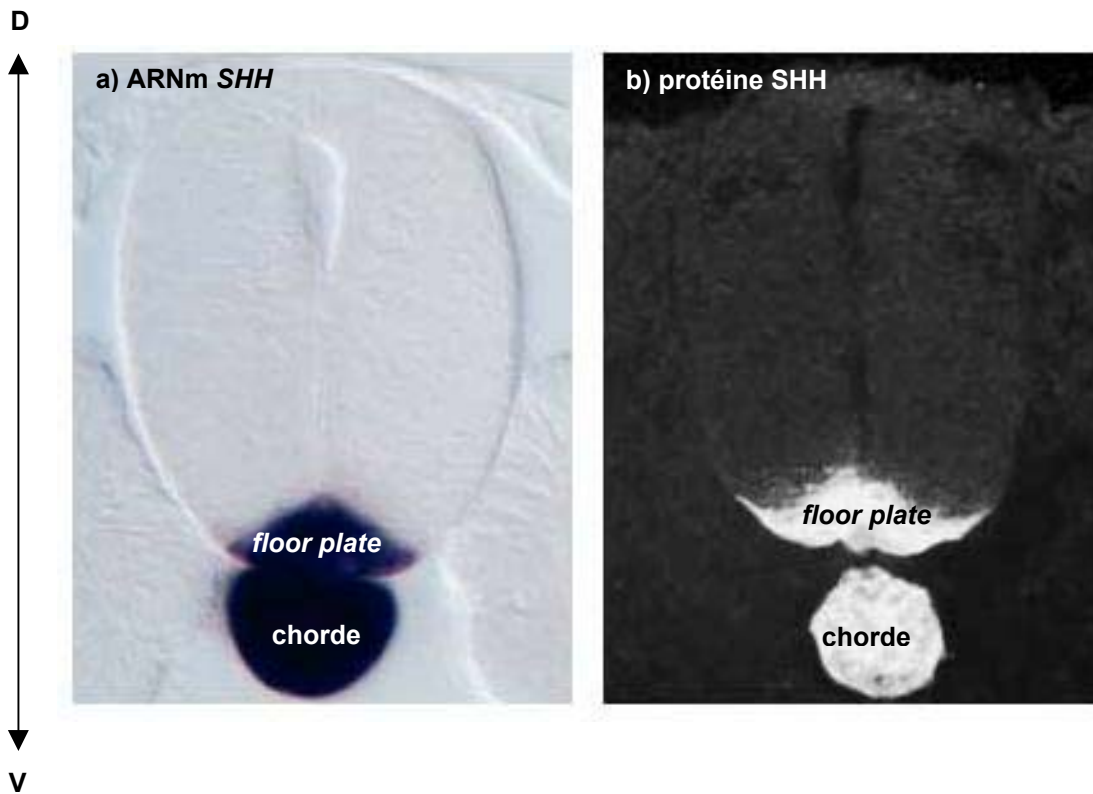


Figure 14 : Expression de SHH dans la moelle épinière embryonnaire de poulet (d'après Jessell, 2000). L'axe dorso-ventral est indiqué par la double flèche (D : dorsal ; V : ventral). a) Coupe transversale de la moelle épinière au stade HH 18 (E3) montrant l'expression des transcrits *SHH* dans la *floor plate* et la chorde sous-jacente. b) Coupe transversale du tube neural montrant l'expression de la protéine SHH dans la *floor plate* et la chorde.

même plus élevée que celle qu'il faut pour la production des interneurons V2 (Marti *et al.*, 1995a ; Roelink *et al.*, 1995 ; Ericson *et al.*, 1997). Ceci a conduit à postuler que SHH, issue de la corde puis de la *floor plate*, fonctionne comme un morphogène, avec un gradient de concentration décroissant de la partie ventrale vers la partie dorsale, pour mettre en place les différentes populations cellulaires du tube neural ventral (figure 15 ; pour revues, voir Briscoe et Ericson, 1999, 2001).

Bien qu'il ait été impossible de détecter SHH hors des cellules qui la produisent dans l'ébauche neurale (Marti *et al.*, 1995b ; Roelink *et al.*, 1995) -jusque récemment (Gritli-Linde *et al.*, 2001)-, l'existence de ce gradient était soutenue par un certain nombre d'indications (pour revue, voir Goodrich et Scott, 1998). Par exemple, la genèse des motoneurons est inhibée par des anticorps bloquants anti-SHH dans des cultures de tube neural ventral (dans lequel on ne détecte ni le messenger *SHH*, ni la protéine SHH), isolé de la *floor plate* (source de SHH), montrant ainsi une activité de SHH à distance de la ligne médiane ventrale (Ericson *et al.*, 1996). Une autre mesure indirecte de l'activité de SHH est l'expression de *Ptc*, une cible transcriptionnelle de cette protéine. Ce gène est transcrit sous la forme d'un gradient décroissant dans la direction ventro-dorsale sur toute la hauteur du tube neural, suggérant une diffusion importante de SHH (Marigo et Tabin, 1996). Dans une étude plus récente, la distribution de SHH selon un profil graduel de la partie la plus ventrale de l'ébauche neurale jusqu'au *sulcus limitans* a pu être visualisée grâce à l'utilisation de conditions non dénaturantes pour les protéoglycanes/glycosaminoglycanes, confortant l'hypothèse que cette protéine agit sur de longues distances (Gritli-Linde *et al.*, 2001). En outre, l'expression *in vivo* d'une forme de *Ptc* incapable de lier son ligand conduit à des effets opposés à ceux exercés par SHH jusque dans des régions dorsales du tube neural et de manière cellulaire autonome, démontrant que SHH fonctionne en effet sur des distances allant au-delà du *sulcus limitans* (Briscoe *et al.*, 2001).

c. Modèle de spécification des populations neuronales ventrales de la moelle épinière

L'ensemble de ces résultats (et d'autres) est à la base de l'élaboration d'un modèle en trois étapes permettant d'expliquer comment le gradient morphogénique de SHH agit pour spécifier les cinq classes de neurones ventraux que sont les motoneurons (MN) et les interneurons V3, V2, V1 et V0 à des positions bien définies selon l'axe dorso-ventral (figure 16 ; pour revues, voir Briscoe et Ericson, 1999, 2001 ; Jessell, 2000 ; Poh *et al.*, 2002). Initialement, SHH établit cinq domaines distincts de progéniteurs neuronaux dans le neuroépithélium ventral (p3, pMN, p2, p1 et p0, de la région la plus ventrale à la plus

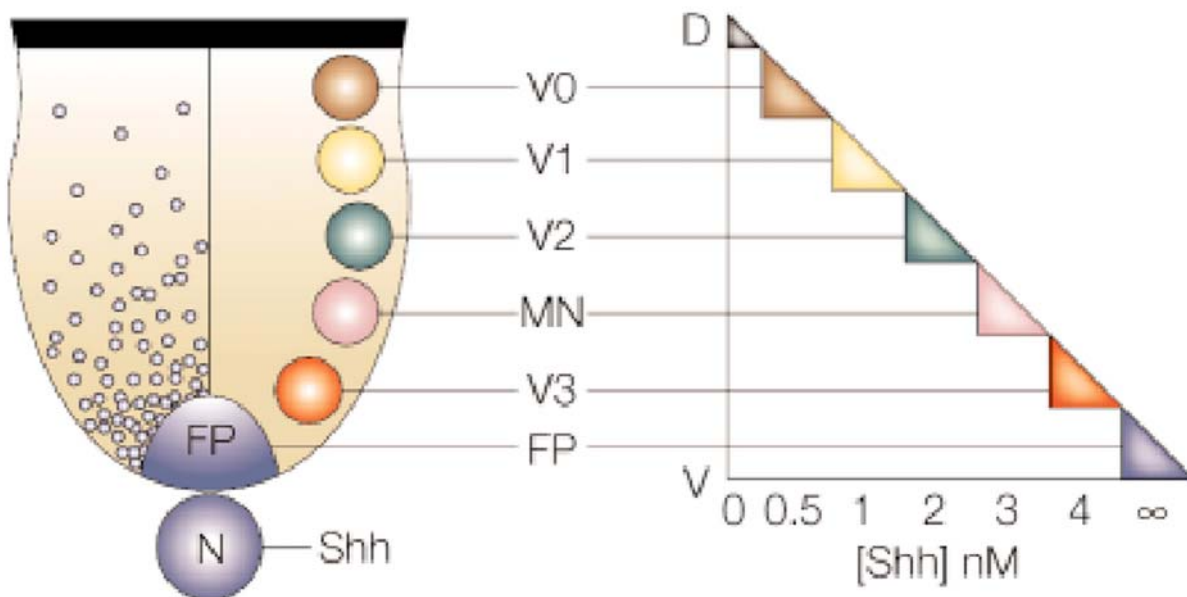


Figure 15 : L'activité graduelle de Shh contrôle la mise en place des populations neuronales ventrales dans le tube neural (d'après Jessell, 2000). A gauche, un schéma de la région ventrale du tube neural en coupe transversale montre le gradient présumé de l'activité Shh (points bleus), élevée ventralement et décroissant vers la partie dorsale et la position de 5 classes de neurones générés en réponse au signal Shh graduel. La nomenclature V0-V3 désigne 4 classes distinctes d'interneurones ventraux, MN, les motoneurones et FP, la *floor plate*. A droite, le diagramme illustre le profil de neuronogenèse dans des explants de plaque neurale intermédiaire cultivés en présence de différentes concentration du fragment amino-terminal recombinant de Shh (N-Shh). D : dorsal ; V : ventral. La concentration de Shh requise pour la genèse de chaque sous-type de neurones *in vitro* est d'autant plus élevée que sa position est ventrale *in vivo*. N : *notochord*.

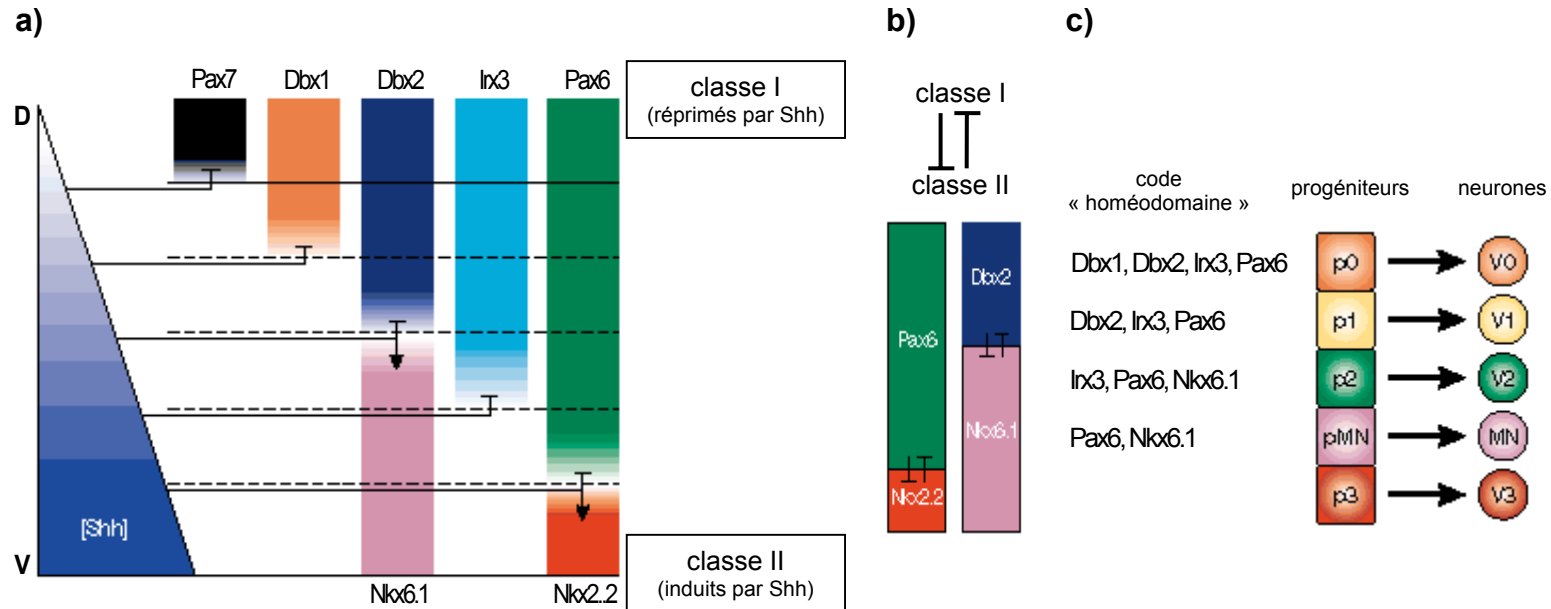


Figure 16 : Modèle en 3 étapes de la spécification des populations neuronales ventrales dans la moelle épinière des vertébrés par le gradient morphogénétique de Shh (d'après Jessell , 2000). a) Shh réprime l'expression des facteurs de transcription à homéodomaine de classe I (Pax7, Dbx1, Dbx2, Irx3 et Pax6) et induit celle des facteurs de transcription à homéodomaine de classe II (Nkx6.1 et Nkx2.2), à des concentrations distinctes pour chacune des protéines de classe I ou de classe II. L'inhibition de l'expression des facteurs de classe I et l'induction de celle des facteurs de classe II dont les domaines d'expression présentent une frontière commune nécessitent la même dose de Shh. La sensibilité différentielle des protéines de classe I, d'une part et de celles de classe II, d'autre part, à la concentration du morphogène permet l'établissement de 5 domaines distincts de progéniteurs neuronaux dans le neuroépithélium ventral, caractérisés par la combinaison spécifique des facteurs de transcription à homéodomaine qu'ils expriment. b) Les facteurs de classe I et de classe II dont les domaines d'expression présentent une limite commune (Pax6 et Nkx2.2 ; Dbx2 et Nkx6.1) répriment mutuellement leur expression, ce qui ajusterait les frontières entre les domaines de progéniteurs et pourrait permettre le maintien de leur intégrité. c) La combinatoire de facteurs de transcription à homéodomaine présents dans chaque domaine du neuroépithélium ou code « homéodomaine » définit 5 groupes de progéniteurs (p0, p1, p2, pMN et p3) et spécifie l'identité des neurones qui en dérivent. D : dorsal ; V : ventral ; MN : motoneurones ; V0-V3 : interneurones ventraux.

dorsale) par la régulation différentielle de l'expression d'un certain nombre de facteurs de transcription à homéodomaine. Les facteurs dont l'expression est réprimée par SHH sont appelés protéines de classe I et appartiennent aux familles Pax, Msx, Irx et Dbx, ceux qui s'expriment en réponse à SHH, les protéines de classe II, parmi lesquelles des membres de la famille Nkx. Ensuite, des répressions mutuelles, cellulaires autonomes, entre les facteurs de transcription de classe I et de classe II exprimés dans des domaines adjacents affinent et maintiennent les limites de ces domaines. Enfin, ces protéines à homéodomaine régulent l'expression de gènes déterminant l'identité neuronale des progéniteurs qui les expriment. Ce modèle est conforté par l'identification récente de facteurs de classe II supplémentaires dont Olig2 et par l'exploration de leur fonction.

Au cours de la première étape, SHH réprime l'expression des facteurs de classe I Pax3, Pax7, Msx1 et Msx2 (initialement présents uniformément le long de l'axe médio-latéral de la plaque neurale) dans la future région ventrale du tube neural ; ceux-ci ne seront alors plus exprimés que dans la partie dorsale du tube neural (Liem *et al.*, 1995). Cet effet qui aboutit à la mise en place d'un domaine dorsal et d'un domaine ventral nécessite de faibles concentrations de SHH (Ericson *et al.*, 1996). La protéine Pax6 est exprimée un peu plus tard, dans l'ensemble du tube neural à l'exception de la *floor plate* en cours de différenciation, selon une progression rostro-caudale qui suit l'individualisation des somites adjacents (Pituello *et al.*, 1999). Son expression est ensuite réprimée ventralement par SHH, formant un gradient croissant de la région ventrale vers la région dorsale (Ericson *et al.*, 1997). L'inhibition totale de l'expression de Pax6 requiert des quantités importantes de SHH ; il s'ensuit que la limite ventrale de son domaine d'expression est plus ventrale que celle du domaine exprimant Pax3 et Pax7. L'expression de Dbx1, Dbx2 et Irx3 est inhibée par des concentrations de SHH intermédiaires par rapport à celles requises pour la répression de l'expression de Pax6 et Pax7 (Pierani *et al.*, 1999 ; Briscoe *et al.*, 2000), leurs domaines d'expression ont par conséquent des limites ventrales localisées entre celles des domaines Pax7 et Pax6 positifs. Inversement, l'expression des protéines de classe II Nkx2.2 et Nkx6.1 est induite par SHH et requiert des doses différentes de la protéine ; leurs territoires d'expression présentent donc des limites dorsales distinctes (Ericson *et al.*, 1997 ; Briscoe *et al.*, 2000). La sensibilité différentielle des facteurs de classe I à l'effet répresseur et des facteurs de classe II à l'effet inducteur de SHH permet ainsi la mise en place de cinq domaines de progéniteurs dans le neuroépithélium ventral, caractérisés par la combinaison de facteurs de transcription qu'ils expriment (Briscoe *et al.*, 2000).

Des études de perte et de gain de fonction *in vivo* montrent des interactions inhibitrices entre des facteurs de classe I et de classe II dont les domaines d'expression présentent une limite commune (pour revues, voir Briscoe et Ericson, 1999, 2001). Par exemple, la frontière ventrale du domaine d'expression de Pax6 (classe I) est confondue avec la limite dorsale du domaine exprimant Nkx2.2 (classe II). Chez les souris *Sey/Sey* (*small eye*), mutants naturels pour la fonction de Pax6, le domaine d'expression de Nkx2.2 s'étend dorsalement bien que la signalisation SHH apparaisse inchangée (Ericson *et al.*, 1997). De plus, Pax6 est suffisante pour réprimer l'expression de Nkx2.2 *in vivo* de manière cellule-autonome et *vice versa* (Briscoe *et al.*, 2000). De la même façon, Nkx6.1 (classe II) et Dbx2 (classe I) exprimés dans des domaines adjacents sont capables d'empêcher mutuellement leur expression (Briscoe *et al.*, 2000 ; Sander *et al.*, 2000). Ce jeu d'inhibitions réciproques et sélectives servirait à ajuster les frontières entre les domaines du neuroépithélium (ce qui expliquerait les limites franches observées entre les différents groupes de progéniteurs) et pourrait permettre de maintenir l'intégrité de ces domaines pendant la croissance rapide du tube neural (Briscoe *et al.*, 2000).

Des analyses fonctionnelles suggèrent que la combinaison de facteurs de transcription présents dans chaque domaine de progéniteurs spécifie l'identité des neurones qui en dérivent (pour revues, voir Briscoe et Ericson, 1999, 2001 ; Jessell, 2000). Ils agiraient en induisant l'expression de protéines dirigeant la genèse d'un sous-type neuronal spécifique et en réprimant celle des déterminants nécessaires pour la formation des sous-types neuronaux qui doivent être produits par les territoires adjacents. Ces déterminants de l'identité des différentes classes de neurones de la moelle épinière commencent à s'exprimer au cours de la dernière division mitotique des progéniteurs neuronaux. Ces événements sont particulièrement bien connus concernant la spécification des motoneurones (figure 17).

Les motoneurones sont générés à partir du domaine pMN caractérisé par l'expression de Nkx6.1 et de faibles niveaux de Pax6. Le territoire pMN est limité ventralement, par le domaine p3, exprimant Nkx6.1 et Nkx2.2 et produisant les interneurones V3 et dorsalement, par le domaine p2 qui contient les progéniteurs des interneurones V2 lesquels expriment Nkx6.1, d'importants niveaux de Pax6 et Irx3. L'activité des facteurs de transcription présents dans ces trois domaines permet la formation des interneurones V3 et V2 et des motoneurones en position correcte (Briscoe *et al.*, 2000). Ainsi, Nkx6.1 induit l'expression de la protéine à domaine bHLH (*basic helix-loop-helix*), Olig2, qui est restreinte au domaine pMN du fait des effets inhibiteurs de

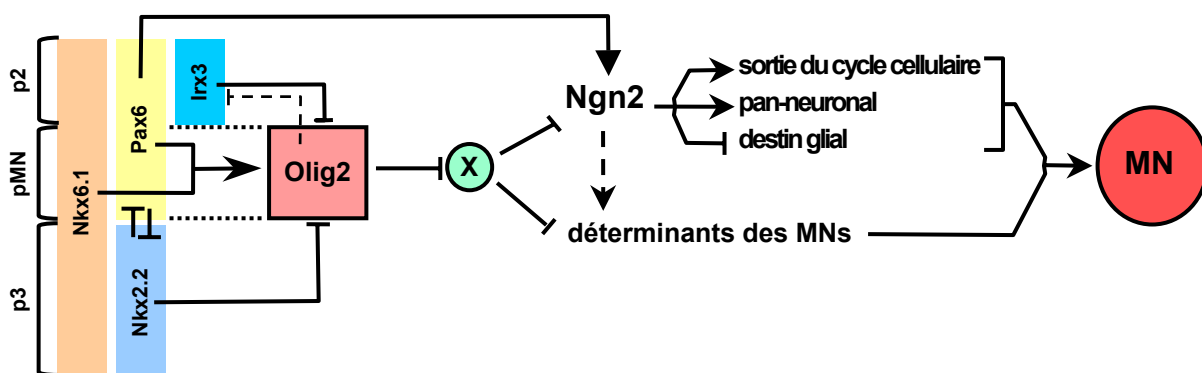


Figure 17 : Mise en place des motoneurones (d'après Marquardt et Pfaff, 2001). Dans le domaine de genèse des motoneurones (pMN), Olig2 inhibe l'expression de Irx3 et d'un répresseur non caractérisé, X, activant des déterminants des motoneurones (tels que MNR2, Lim3, Isl1/2 et HB9) et levant l'inhibition de l'expression de Ngn2. Ngn2 promeut l'arrêt des mitoses, l'acquisition de caractéristiques pan-neuronal et probablement aussi l'activation de déterminants motoneuronaux. Olig2 est régulé positivement par Nkx6.1 et Pax6 et négativement par Nkx2.2 et Irx3. Les interactions représentées en pointillés font référence aux faits que Olig2 réprime l'expression de Irx3 de façon limitée et que Ngn2 est nécessaire mais pas suffisante pour induire des déterminants des motoneurones. MN(s) : motoneurone(s).

Nkx2.2 dans le domaine p3 et de Irx3 dans le domaine p2 (Novitch *et al.*, 2001). Olig2 active l'expression de déterminants spécifiques des motoneurones dont le facteur à homéodomaine MNR2 (*motor neuron restricted 2*), chez le poulet, et de la protéine proneurale à bHLH, Ngn2 (*Neurogenin 2*) (Novitch *et al.*, 2001). MNR2 est présent à partir de la dernière division des progéniteurs et persiste transitoirement dans les motoneurones post-mitotiques. Il est capable, à lui seul, de déclencher la différenciation ectopique de motoneurones (Tanabe *et al.*, 1998). Olig2, directement ou *via* Ngn2, entraîne l'acquisition de caractéristiques pan-neurales et l'arrêt du cycle cellulaire (Novitch *et al.*, 2001). Nkx2.2 qui est nécessaire et suffisant pour la genèse des interneurones V3, réprime celle des motoneurones dans le domaine p3 au moins *via* l'inhibition de l'expression de Olig2 (Briscoe *et al.*, 1999, 2000 ; Novitch *et al.*, 2001). Dans le domaine p2, l'action combinée de Nkx6.1 et de Irx3 induit la formation des interneurones V2 *via* l'activation du déterminant Lim3 qui est suffisant pour conférer l'identité "interneurone V2" (Tanabe *et al.*, 1998 ; Briscoe *et al.*, 2000). Simultanément, Irx3 y réprime la formation des motoneurones *via* l'inhibition de l'expression de Olig2 et de déterminants des motoneurones tels que MNR2 (Briscoe *et al.*, 2000 ; Novitch *et al.*, 2001).

En résumé, dans la région ventrale du tube neural, un gradient de concentration de SHH est converti en un code cellulaire de facteurs de transcription à homéodomaine, dont l'expression est réprimée ou activée à différentes positions selon l'axe dorso-ventral. Ce code dicte ensuite l'identité des différentes classes de neurones qui s'y développeront. L'intérêt de ce modèle est que les interactions répressives entre les facteurs de classe I et de classe II exprimés dans des domaines adjacents du neuroépithélium transforment un gradient continu de morphogène en domaines distincts de progéniteurs neuronaux.

d. Mode d'action de SHH

Les événements intracellulaires médiant l'activité graduelle de SHH et contrôlant l'expression des protéines à homéodomaine dans le neuroépithélium ne sont pas complètement connus. Il apparaît que les facteurs Gli, régulateurs de la transcription dépendante de SHH dans différents tissus, interviennent dans ce processus.

Les transcrits *Gli* sont exprimés dans le tube neural selon un patron chevauchant. *Gli1* est présent dans le neuroépithélium ventral, *Gli2*, dans l'ensemble du neuroépithélium et *Gli3*, également, à un niveau faible ventralement et fort dorsalement (Hui *et al.*, 1994 ; Sasaki *et al.*, 1997).

Chez les souris dont le gène *Gli1* a été inactivé par recombinaison homologue et chez les mutants *extra toes*, présentant une délétion spontanée dans le gène *Gli3*, la moelle épinière se développe apparemment normalement (figure 18a ; Matisse *et al.*, 1998 ; Litingtung et Chiang, 2000b ; Park *et al.*, 2000). En revanche, chez les souris dont le gène *Gli2* a été muté expérimentalement, la *floor plate* ne se forme pas et les interneurons les plus ventraux (V3) sont absents ou produits en nombre réduit, un phénotype non aggravé chez les doubles mutants *Gli1*^{-/-} ; *Gli2*^{-/-} (Ding *et al.*, 1998 ; Matisse *et al.*, 1998) et bien moins sévère que celui résultant de l'inactivation du gène *SHH* (figure 18a). En effet, chez les mutants *SHH*^{-/-} la *floor plate* et les trois classes de neurones les plus ventraux (interneurones V3, V2 et motoneurones) ne sont pas générées et les deux classes les plus dorsales d'interneurones ventraux (V1 et V0) sont présentes mais en nombre réduit et en position anormale -i. e. le long de la ligne médiane du tube neural (Chiang *et al.*, 1996 ; Pierani *et al.*, 1999 ; Litingtung et Chiang, 2000b). De manière intéressante, ces anomalies sont en grande partie corrigées lorsque la fonction *Gli3* est également perdue (figure 18b). Ainsi, la formation de tous les types cellulaires ventraux est restaurée excepté celle de la *floor plate* et des interneurons V3 qui dépend vraisemblablement de la fonction de *Gli2* (Litingtung et Chiang, 2000b). Ensemble, ces résultats indiquent que *Gli1* et *Gli2* jouent un rôle mineur dans le développement de la moelle épinière et que *Gli3* est un facteur inhibiteur de la spécification de la plupart des types de cellules ventrales. Ils suggèrent que, dans ce contexte, une des fonctions de *SHH* serait d'antagoniser l'activité de *Gli3* dans le tube neural ventral.

Par ailleurs, d'autres facteurs de transcription régulés par *SHH* indépendamment des *Glis* tels que le récepteur nucléaire orphelin COUP-TFII (*chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II*) pourraient intervenir dans la mise en place des cellules neurales ventrales (pour revues, voir Jessell, 2000 ; Lee et Pfaff, 2000).

3. Mise en place des populations cellulaires dorsales du névraxe

Au cours des dix dernières années, plusieurs études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont révélé l'influence dorsalisante de l'ectoderme non neural et de la *roof plate* sur le développement du SNC (pour revues, voir Tanabe et Jessell, 1996 ; Lee et Jessell, 1999 ; Altmann et Brivanlou, 2001). Par exemple, des explants de plaque neurale greffés sous l'ectoderme non neural acquièrent l'expression d'ARN messagers dorsaux tels que *Wnt-1* et *Wnt-3a* (Dickinson *et al.*, 1995). En plus d'activer l'expression des marqueurs dorsaux *Wnts*, *Pax3*, *Msx* et *Dsl-1* (dorsalin-1) (Dickinson *et al.*, 1995 ; Liem *et al.*, 1995),

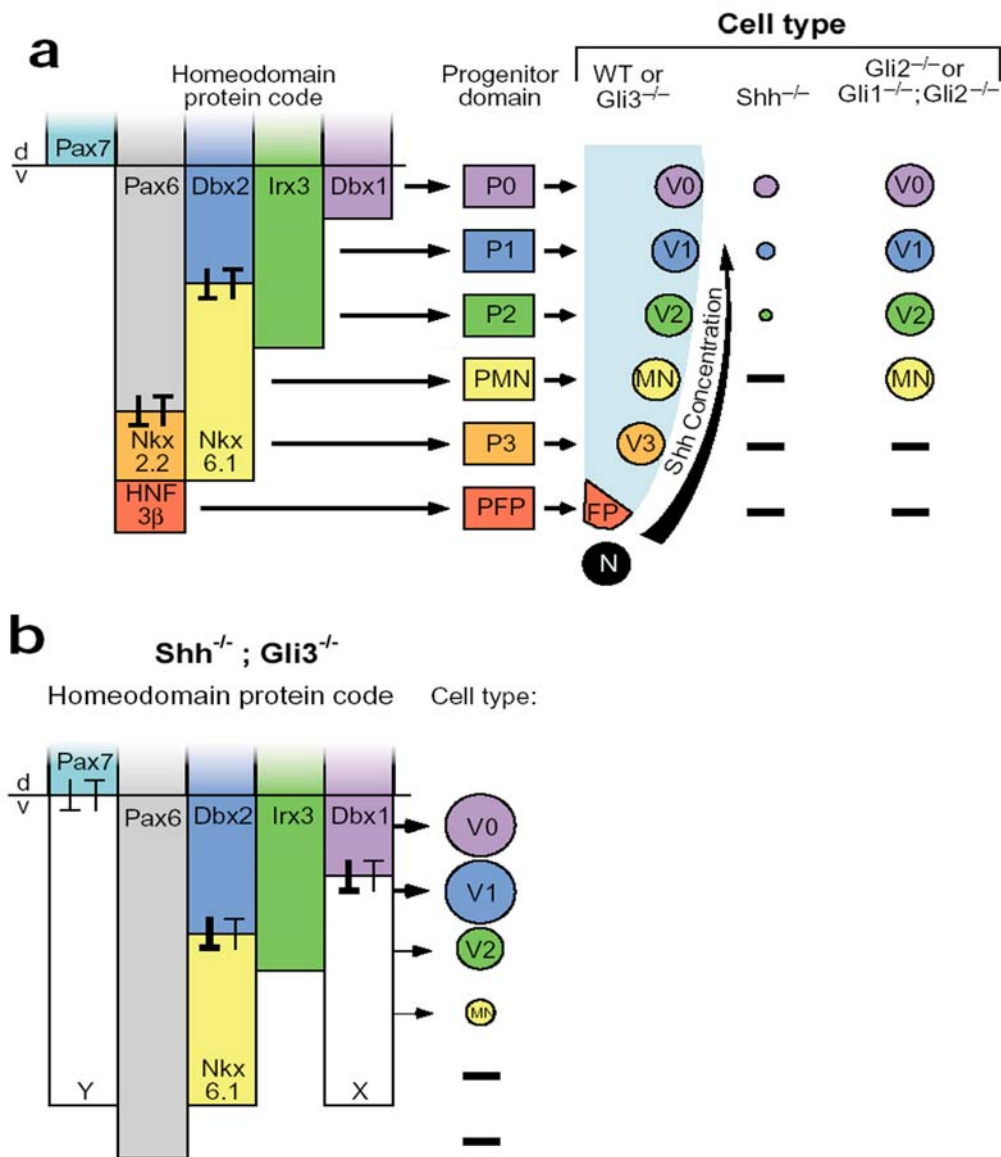


Figure 18 : Profil d'expression des facteurs de transcription à homéodomaine dans le neuroépithélium ventral et développement des neurones ventraux dans la moelle épinière de différents mutants pour des éléments de la signalisation Shh (d'après Stone et Rosenthal, 2000). a) La position et l'identité de 6 types cellulaires de la moelle épinière ventrale d'embryons sauvage et mutants seraient déterminées par un code de protéines à homéodomaine établi par Shh et l'acide rétinoïque. Quatre types d'interneurones (V0, V1, V2 et V3), les motoneurones (MNs) et les cellules de la *floor plate* (FP) sont générés à des positions stéréotypées, à partir de progéniteurs localisés dans des domaines bien précis, définis par l'expression d'une combinaison spécifique de facteurs de transcription à homéodomaine. HNF-3 β définit la floor plate et Nkx2.2, les neurones V3. Nkx6.1, en absence de Irx3, spécifie les motoneurones et en coopération avec Irx3, les neurones V2. Dbx2, en absence de Dbx1, définit les neurones V0 et Dbx1, les interneurones V1. L'expression des protéines à homéodomaine est sous le contrôle d'une activité Shh graduelle. Les protéines de classe I (Pax7, Irx3, Dbx1, Dbx2 et Pax6) définissent les frontières des domaines de progéniteurs neuraux par la limite ventrale de leurs domaines d'expression et sont indépendamment induites par l'acide rétinoïque et de faibles doses de Shh et réprimées par de fortes concentration de Shh. Les protéines de classe II (Nkx2.2, Nkx6.1 et peut-être HNF-3 β) définissent les frontières des domaines de progéniteurs par leur limite dorsale d'expression et sont induites par des doses élevées de Shh. Chez les embryons Shh^{-/-}, l'expression de Pax3/7 s'étend ventralement et confère une identité dorsale à certains progéniteurs exprimant Dbx, réduisant le nombre de cellules V0 et V1. d, dorsal ; v, ventral ; N, *notochord*, une source de Shh. Le code de protéines à homéodomaine est incomplet et reste hypothétique pour les neurones V0 et V1. D'autres protéines de classe II, régulées comme Nkx6.1, pourraient exister et réprimer Dbx1 et Irx3, ainsi que Pax3 et Pax7. b) Profil d'expression des protéines réprimées par Shh (classe I) ou induites par Shh (Classe II) chez les embryons Shh^{-/-} ; Gli3^{-/-}. Des facteurs de classe II hypothétiques, X et Y, qui seraient régulés comme Nkx6.1 pourraient réprimer les protéines de Classe I Dbx1 et Pax3/7, respectivement.

l'épiderme présomptif induit la genèse des cellules de la *roof plate* et de progéniteurs d'interneurones dorsaux (Liem *et al.*, 1997 ; Lee *et al.*, 2000b) dans des cultures de plaque neurale. La *roof plate* entraîne également la production de plusieurs populations d'interneurones dorsaux dans de telles cultures (Liem *et al.*, 1997 ; Lee *et al.*, 1998). L'analyse de souris dont la *roof plate* ne se forme pas, suite à une mutation spontanée dans le gène *Lmx1a* qui code une protéine à domaine LIM (mutants *dreher*) ou à une ablation génétique, indique la nécessité de signaux issus de cette structure pour la genèse des classes d'interneurones sensoriels les plus dorsales (Lee *et al.*, 2000b ; Millonig *et al.*, 2000). La délétion expérimentale de la *roof plate* n'altère pas l'activité inductrice de l'épiderme présomptif mais cette dernière ne compense pas la perte de celle de la *roof plate*, révélant un rôle spécifique de molécules produites par la *roof plate* dans la formation de certaines populations cellulaires dorsales (Lee *et al.*, 2000b). Ceci confirme une hypothèse antérieure selon laquelle les effets inducteurs dorsalisants proviennent initialement de l'ectoderme non neural, qui flanque latéralement puis recouvre dorsalement l'ébauche neurale, et plus tard de la *roof plate* (Lee *et al.*, 2000b). Les premiers permettent la mise en place des cellules de la *roof plate* (et des cellules des crêtes neurales, plus tôt au cours du développement) et les seconds, celle des interneurones les plus dorsaux. L'activité de l'ectoderme non neural et de la *roof plate* dépend de facteurs de la superfamille du TGF- β dont l'activine et plusieurs protéines BMP (pour revues, voir Tanabe et Jessell, 1996 ; Lee et Jessell, 1999 ; Altmann et Brivanlou, 2001).

a. Eléments sur la signalisation de type TGF- β

Les facteurs de croissance de type TGF- β forment une superfamille de polypeptides sécrétés multifonctionnels, composée de plusieurs groupes dont celui des TGF- β , celui des activines et celui des BMPs (figure 19). A l'heure actuelle, la famille des BMPs contient plus de 30 protéines, identifiées chez différentes espèces et réparties en sous-familles en fonction de leurs similarités structurales (pour revues, voir Ducy et Karsenty, 2000 ; Balemans et Van Hul, 2002). Les facteurs de type TGF- β , ainsi que les acteurs de la voie de transduction qu'ils initient, sont conservés au cours de l'évolution depuis les arthropodes et les nématodes (pour revue, voir Whitman, 1998).

Les membres de la superfamille du TGF- β remplissent des fonctions variées tout au long de la vie des métazoaires. Parmi ces protéines, les BMPs sont surtout connues pour leurs nombreux rôles au cours du développement embryonnaire des vertébrés et des

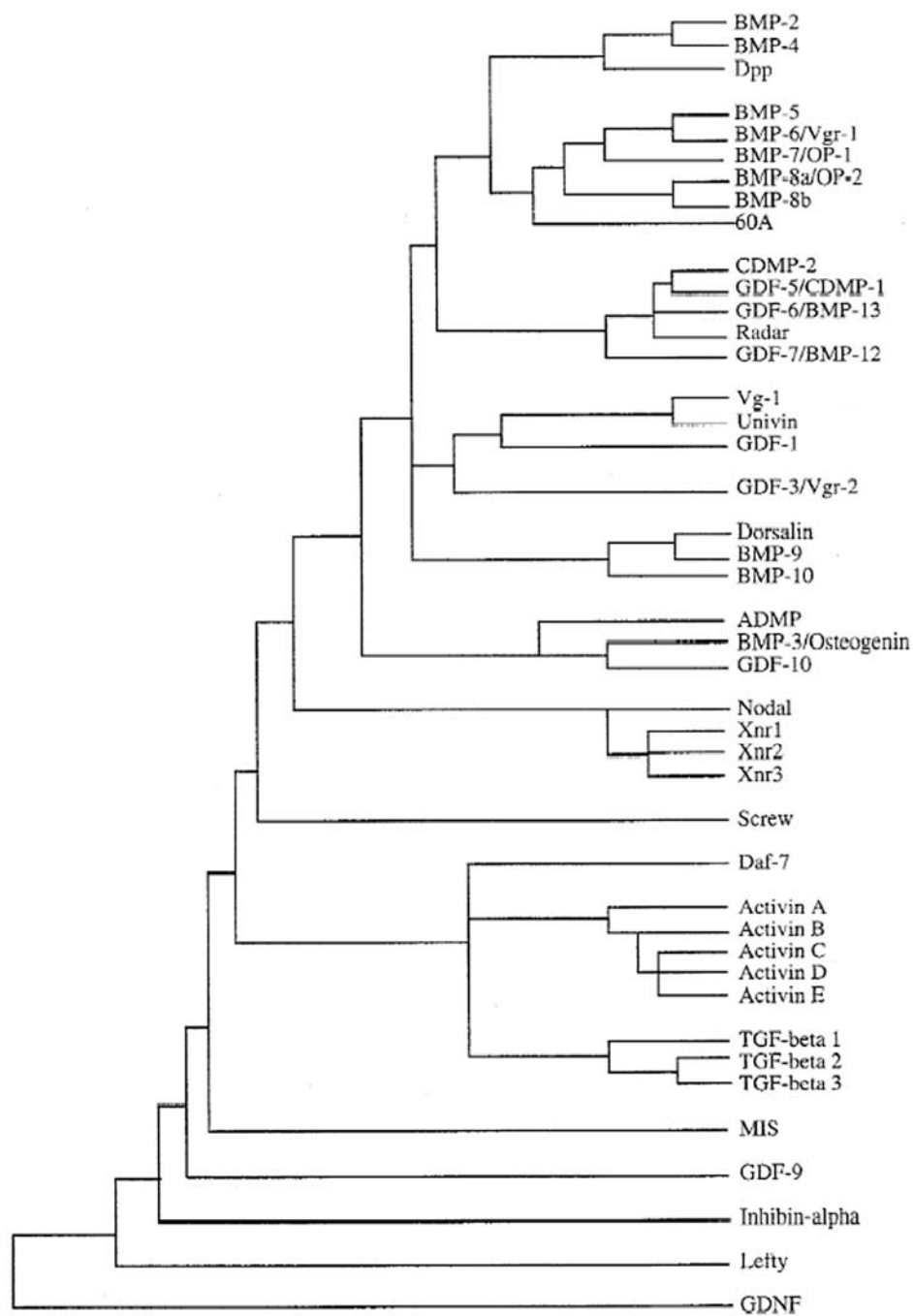


Figure 19 : La superfamille du TGF-β (Derynck et Feng, 1997). Les relations entre les différents facteurs apparentés au TGF-β ont été déterminées à partir de la comparaison de la séquence du domaine mature C-terminal. La plupart des facteurs de type TGF-β représentés sont des protéines de vertébrés, sauf Dpp, 60A et Screw, qui sont des protéines de drosophile et Univin, une protéine d'oursin.

invertébrés. De manière remarquable, elles sont impliquées à toutes les étapes de ce processus complexe où elles participent à la mise en place des axes du corps et à l'élaboration de presque tous les tissus et organes (pour revue, voir Hogan, 1996). En particulier, le rôle majeur de ces molécules dans l'établissement de la polarité selon l'axe dorso-ventral de différents organismes et tissus/organes (embryon de drosophile, blastula d'oursin, mésoderme chez le xénope et la souris, tube neural chez le poulet) est bien décrit (pour revues, voir Kingsley, 1994 ; Hogan, 1996 ; Mehler *et al.*, 1997). Les facteurs de type TGF- β agissent en régulant un grand nombre de fonctions cellulaires (prolifération, détermination, différenciation, migration, adhésion, apoptose...) qui dépendent du contexte (type cellulaire, état et environnement de la cellule) et parmi lesquelles, beaucoup résultent de modifications de l'expression de gènes clés (pour revues, voir Massagué, 1998, 2000). Plusieurs membres de la famille TGF- β dont l'activine et les BMPs opèrent, soit localement, soit à distance *via* un gradient de concentration (d'où leur qualification de morphogènes), les cellules répondant différenciellement, selon la dose de ligand à laquelle elles sont soumises (pour revues, voir Kingsley, 1994 ; Mehler *et al.*, 1997 ; Whitman, 1998 ; Nakayama *et al.*, 2000). Ce second mode de fonctionnement est notamment illustré dans la régulation de l'établissement de la polarité dorso-ventrale du mésoderme chez le xénope et pourrait être un mécanisme fondamental pour assigner l'identité des cellules selon un axe embryonnaire (pour revue, voir Kingsley, 1994).

Les protéines de la superfamille du TGF- β sont synthétisées sous la forme de précurseurs inactifs consistant en une séquence signal amino-terminale, un pro-domaine et un domaine mature carboxy-terminal de 104 à 139 résidus, hautement conservé (figure 20). Il présente en particulier, un motif riche en cystéines, commun à tous les facteurs de type TGF- β , ce qui en fait la signature (pour revue, voir Kingsley, 1994). Après dimérisation, les précurseurs sont clivés au niveau d'un site consensus RXXR localisé dans le pro-domaine, libérant ainsi des dimères C-terminaux matures qui seront sécrétés (pour revues, voir Hogan, 1996 ; Ducy et Karsenty, 2000). La forme dimérique est absolument requise pour la liaison de ces facteurs à leurs récepteurs et pour leur activité biologique (pour revues, voir Reddi, 1997, 2001 ; Balemans et Van Hul, 2002). Les ligands biologiquement actifs sont, soit des homodimères, soit des hétérodimères, lesquels au moins dans le cas de BMP2/BMP5, BMP2/BMP6, BMP2/BMP7 et BMP4/BMP7 présentent une activité bien plus élevée que les homodimères correspondants (pour revues, voir Hogan, 1996 ; Mehler *et al.*, 1997 ; Kawabata *et al.*, 1998 ; Piek *et al.*, 1999). Bien que la formation d'hétérodimères *in vivo* ne soit pas démontrée, sauf pour des ligands BMP2/BMP7 isolés à

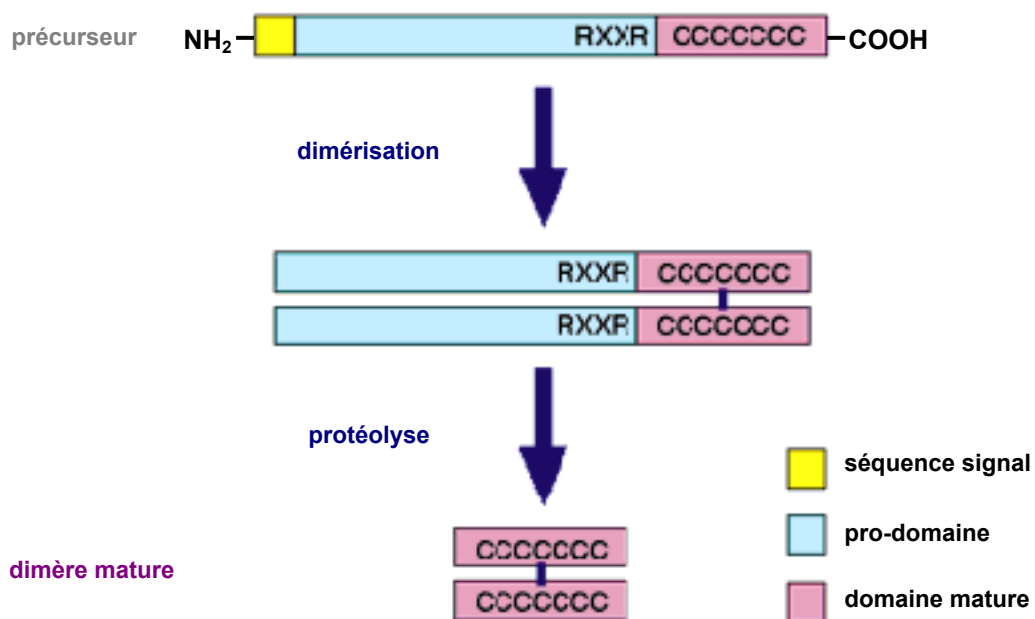


Figure 20 : Maturation protéolytique des précurseurs des BMPs (d'après Dale et Jones, 1999). Les BMPs sont synthétisées sous la forme de longs précurseurs inactifs qui se dimérisent avant la maturation protéolytique () au site consensus RXXR. Le clivage libère des dimères C-terminaux biologiquement actifs qui contiennent 7 cystéines hautement conservées.

partir d'os bovins, la coexpression de plusieurs BMPs dans de nombreux tissus rend ce mécanisme possible (pour revues, voir Hogan, 1996 ; Piek *et al.*, 1999).

Les facteurs de la famille TGF- β exercent leurs effets biologiques *via* la liaison à deux classes de récepteurs transmembranaires à activité sérine/thréonine kinase : les récepteurs de type I et de type II, chacun de ces deux types étant requis pour la transduction du signal (pour revues, voir Attisano et Wrana, 1996 ; Kawabata *et al.*, 1998). Comme pouvait le suggérer la forme dimérique du ligand, ce complexe contient deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II (pour revues, voir Shi et Massagué, 2003 ; Zwijsen *et al.*, 2003). On compte 5 récepteurs de type II et 7 récepteurs de type I (figure 21), nommés en fonction de leur ligand physiologique lorsqu'il est connu. Les récepteurs de type I sont également désignés ALK1 à 7, selon la nomenclature neutre ALK, pour *activin receptor-like kinase* (Massagué, 1998). Deux récepteurs de type I (BMPR-IA/ALK3 et BMPR-IB/ALK6) et un récepteur de type II (BMPR-II) sont décrits comme spécifiques des BMPs et lient ces protéines avec une spécificité de ligand et une affinité différentes (pour revue, voir Kawabata *et al.*, 1998). En plus de ceux-ci, les récepteurs à l'activine sont capables d'interagir avec certaines BMPs, bien qu'avec une affinité moindre, et d'en médier le signal. Il existe éventuellement d'autres récepteurs impliqués dans la signalisation BMP puisque ceux utilisés *in vivo* par certains ligands (BMP10, BMP11/GDF11, GDF1 et GDF8) ne sont pas connus (pour revue, voir Zwijsen *et al.*, 2003).

On compte beaucoup moins de récepteurs que de ligands, cependant plusieurs ligands peuvent partager un complexe de récepteurs donné (pour revues, voir Derynck *et al.*, 1998 ; Piek *et al.*, 1999 ; Derynck et Zhang, 2003), expliquant vraisemblablement les phénomènes de redondance fonctionnelle observés dans certains contextes. Par exemple, BMP7 mime les effets de l'activine dans certains types cellulaires (pour revue, voir Massagué et Weis-Garcia, 1996). A l'inverse, un même ligand peut utiliser différents complexes de récepteurs de types I et II et donc être capable d'exercer des effets distincts en fonction du répertoire de récepteurs exprimé par la cellule réceptrice du signal (pour revues, voir Hogan, 1996 ; Piek *et al.*, 1999 ; Derynck et Zhang, 2003). En fait, de nombreuses combinaisons de récepteurs dont la formation dépend de l'expression desdits récepteurs, de leur distribution au niveau de la membrane plasmique, des agonistes présents dans leur environnement, de leur spécificité de liaison et de leur affinité différentielle pour leurs ligands, sont possibles (pour revues, voir Kingsley, 1994 ; Piek *et al.*, 1999 ; Derynck et Zhang, 2003). Ainsi, ActR-IA/ALK2, BMPR-IA/ALK3 et BMPR-

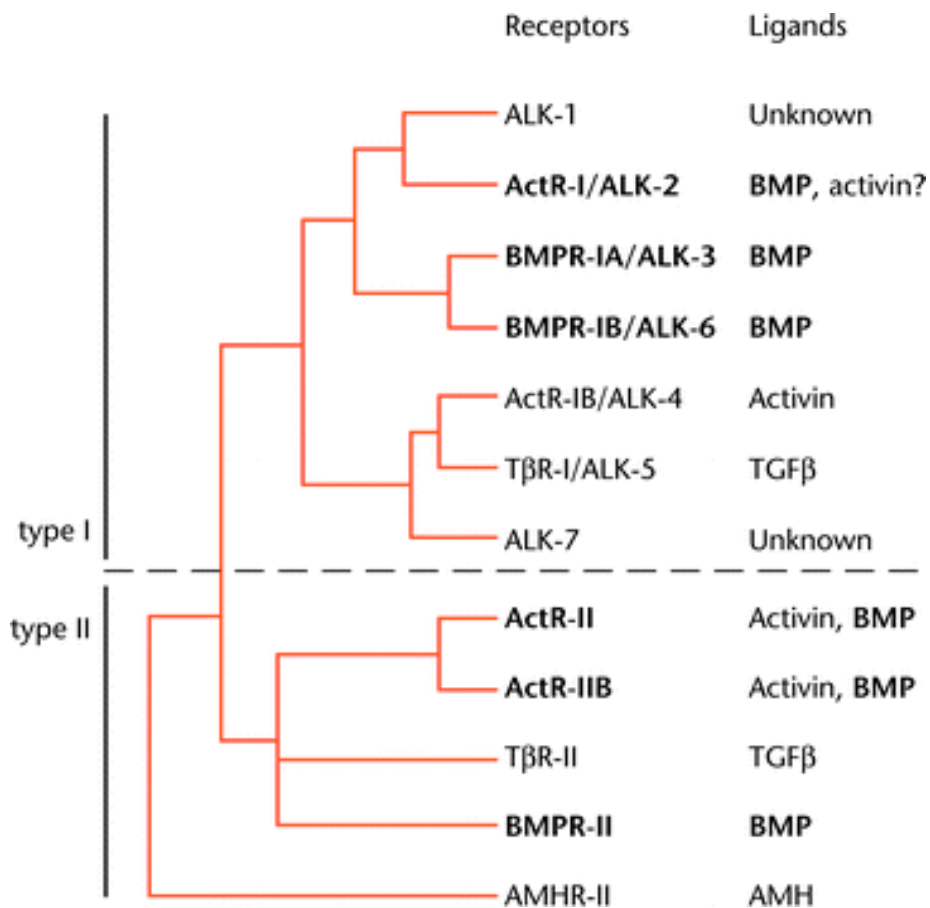


Figure 21 : La famille des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase (Ten Dijke et al., 1999). Cette analyse phylogénétique des récepteurs de type I et de type II chez les mammifères est basée sur les homologies de séquence en acides aminés au niveau du domaine kinase. Les ligands de chaque récepteur sont indiqués. Les récepteurs qui se lient aux BMPs apparaissent en caractères gras.

IB/ALK6 peuvent fonctionner en association avec ActR-IIA, ActR-IIB et BMPR-II pour médier le signal BMP (pour revue, voir Attisano *et al.*, 2001). Cette diversité dans l'association des récepteurs serait en partie à la base de la nature pléiotropique des facteurs de type TGF- β (pour revues, voir Kingsley, 1994 ; Derynck et Zhang, 2003).

La transduction du signal de type TGF- β est initiée par la liaison du ligand qui induit et/ou stabilise l'association d'une paire de récepteurs de types I et d'une paire de récepteurs de type II (figure 22a). Puis, les récepteurs de type II, constitutivement actifs et peu spécifiques, transphosphorylent des résidus sérine et thréonine dans le domaine GS des récepteurs de type I, un motif hautement conservé situé entre les domaines transmembranaire et catalytique (figure 22b ; pour revue, voir Massagué, 1998). Ceci entraîne l'activation des récepteurs de type I et leur permet alors de phosphoryler des substrats intracellulaires (pour revue, voir Massagué et Wotton, 2000). La spécificité du signal est déterminée d'une part, par les récepteurs de type I *via* un motif du domaine kinase, identique chez les récepteurs du même groupe -*i. e.* ceux qui répondent aux BMPs ou ceux activés par les autres cytokines de type TGF- β (pour revue, voir Massagué, 2000) et d'autre part, par le substrat.

Les protéines Smad sont les médiateurs intracellulaires majeurs de la signalisation de type TGF- β et incarnent les premiers substrats identifiés des récepteurs de type I. Elles véhiculent le signal du complexe de récepteurs membranaire à la machinerie de transcription et sont capables de réguler l'expression de multiples gènes cibles. Les Smads, au nombre de 8 chez les mammifères, sont réparties en 3 classes en fonction de leurs propriétés structurales et fonctionnelles (figure 23) (pour revues, voir Balemans et Van Hul, 2002 ; Lutz et Knaus, 2002) :

- Les R-Smads (*receptor-regulated Smads*), Smad1, 2, 3, 5 et 8, sont les substrats directs des récepteurs de type I activés, les AR-Smads (Smad2 et 3) étant phosphorylées par les récepteurs de type I à l'activine et au TGF- β et les BR-Smads (Smad1, 5 et 8), par ceux qui répondent aux BMPs.

- Les Co-Smads (*common mediator Smads*), dont Smad4 est le seul membre identifié chez les mammifères, sont les partenaires obligatoires de toutes les R-Smads.

- Les I-Smads (*inhibitory Smads*), Smad6 et 7, antagonisent la signalisation de type TGF- β .

Les Smads exercent leurs effets exclusivement *via* des interactions protéine-protéine et protéine-ADN, médiées par différentes régions fonctionnelles (figure 24 ; pour

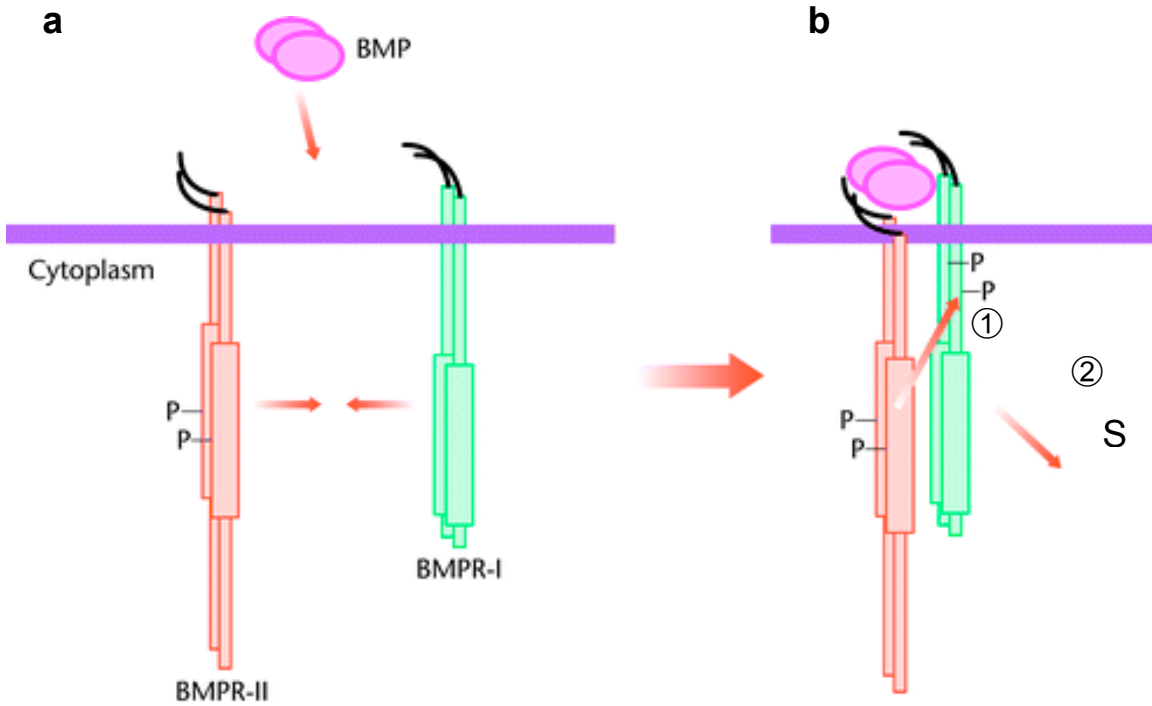


Figure 22 : Modèle d'activation des récepteurs aux BMPs (d'après Ten Dijke *et al.*, 1999). a) Le ligand BMP entraîne et/ou stabilise l'association de 2 récepteurs de type I et 2 récepteurs de type II. b) Le récepteur de type II, constitutivement actif, phosphoryle alors des sérines et thréonines du domaine GS du récepteur de type I (①). Ce dernier ainsi activé phosphoryle les substrats (S, ②).

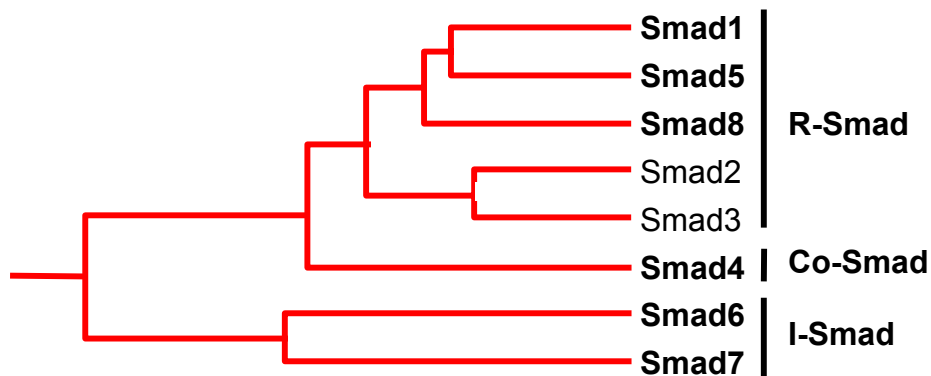


Figure 23 : La famille Smad chez les mammifères (Ten Dijke *et al.*, 1999). Analyse phylogénétique des protéines Smad de mammifères. Les Smads impliquées dans la signalisation BMP sont indiquées en caractères gras.

revues, voir Attisano et Tuen Lee-Hoeflich, 2001 ; Lutz et Knaus, 2002). Les R-Smads se lient spécifiquement et transitoirement aux récepteurs de type I activés qui les phosphorylent, permettant leur association avec Smad4 (figure 25). Les complexes R-Smad/Smad4 sont alors transloqués dans le noyau, où ils sont directement impliqués dans la régulation de la transcription de nombreux gènes cibles, de manière dépendante du type cellulaire dans la plupart des cas (pour revues, voir Derynck *et al.*, 1998 ; Itoh *et al.*, 2000 ; Massagué, 2000 ; Lutz et Knaus, 2002 ; Shi et Massagué, 2003 ; Zwijsen *et al.*, 2003). Les R-Smads (excepté Smad2) et Co-Smads interagissent avec des régions caractéristiques dans le promoteur de leurs gènes cibles, les SBE (*smad binding element*) (pour revues, voir Massagué et Wotton, 2000 ; Shi et Massagué, 2003 ; Zwijsen *et al.*, 2003). Une fois liées de façon stable et spécifique sur les promoteurs cibles grâce à certains cofacteurs (FAST, AP-1, Runx, NF- κ B, OAZ, Vent2, STAT3, Hoxc-8...), les Smads régulent positivement ou négativement la transcription en recrutant des facteurs coactivateurs ou corépresseurs (figure 26 ; pour revue, voir Attisano et Tuen Lee-Hoeflich, 2001). Parmi ceux-ci, les protéines paralogues CBP [*CREB-(cyclic AMP-regulated enhancer-binding protein) binding protein*] et p300, coactivateurs ubiquitaires de la transcription, l'oncoprotéine nucléaire c-Ski (homologue cellulaire de la protéine transformante du rétrovirus aviaire de Sloan-Kettering) et la protéine anti-proliférative Tob (*transducer of ErbB2*) qui agissent en tant que corépresseurs de la transcription dépendante des BR-Smads (pour revues, voir Piek *et al.*, 1999 ; Von Bubnoff et Cho, 2001 ; Ten Dijke *et al.*, 2002 ; Shi et Massagué, 2003 ; Zwijsen *et al.*, 2003).

En résumé, les Smads stimulent ou répriment la transcription de plusieurs centaines de gènes de réponse immédiate aux facteurs de type TGF- β , en liant l'ADN, en recrutant d'autres facteurs de transcription ou des adaptateurs, en mobilisant la machine modifiant la structure de la chromatine (coactivateurs, corépresseurs et histone désacétylases (HDAC) associées) ou par une combinaison de ces différents modes (pour revue, voir Shi et Massagué, 2003 ; Zwijsen *et al.*, 2003).

De façon remarquable, les effets morphogénétiques des facteurs de type TGF- β , se traduisant par des réponses cellulaires dépendantes de la dose, peuvent être reproduits avec des doses croissantes de Smads (pour revues, voir Heldin *et al.*, 1997 ; Massagué, 2000). Les gradients de concentration de BMPs semblent ainsi directement traduits en niveaux correspondants d'activation des Smads et la nature des gènes de réponse ainsi que leur taux d'expression dépendraient de leur seuil d'activation transcriptionnelle.

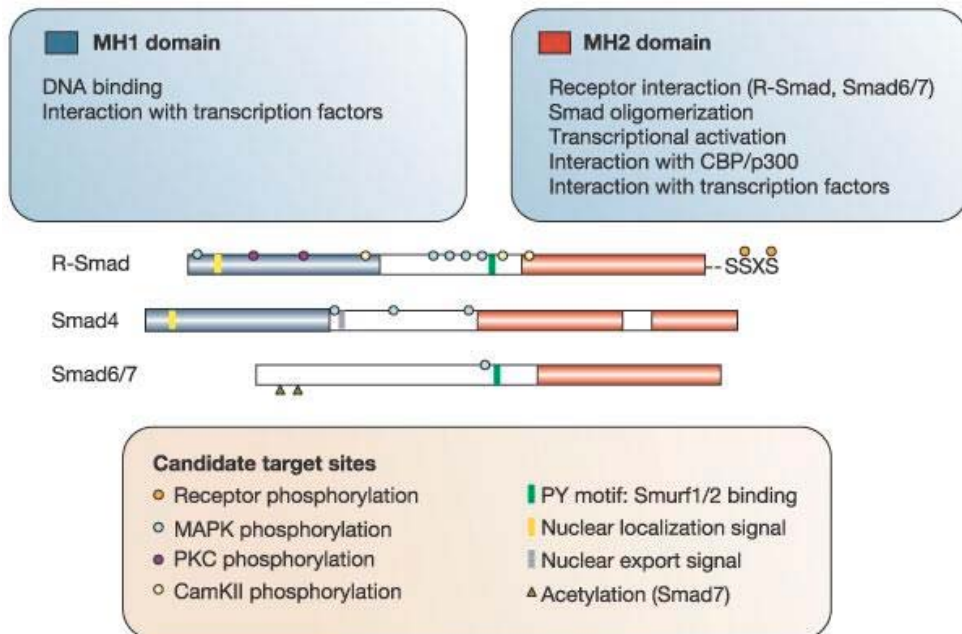


Figure 24 : Organisation structurale des Smads (Zhang et Derynck, 2003). Le rôle des domaines MH1 (N-terminal ; bleu) et MH2 ((C-terminal ; rouge) est indiqué ainsi que les motifs structuraux importants pour la régulation de l'activité des Smads.

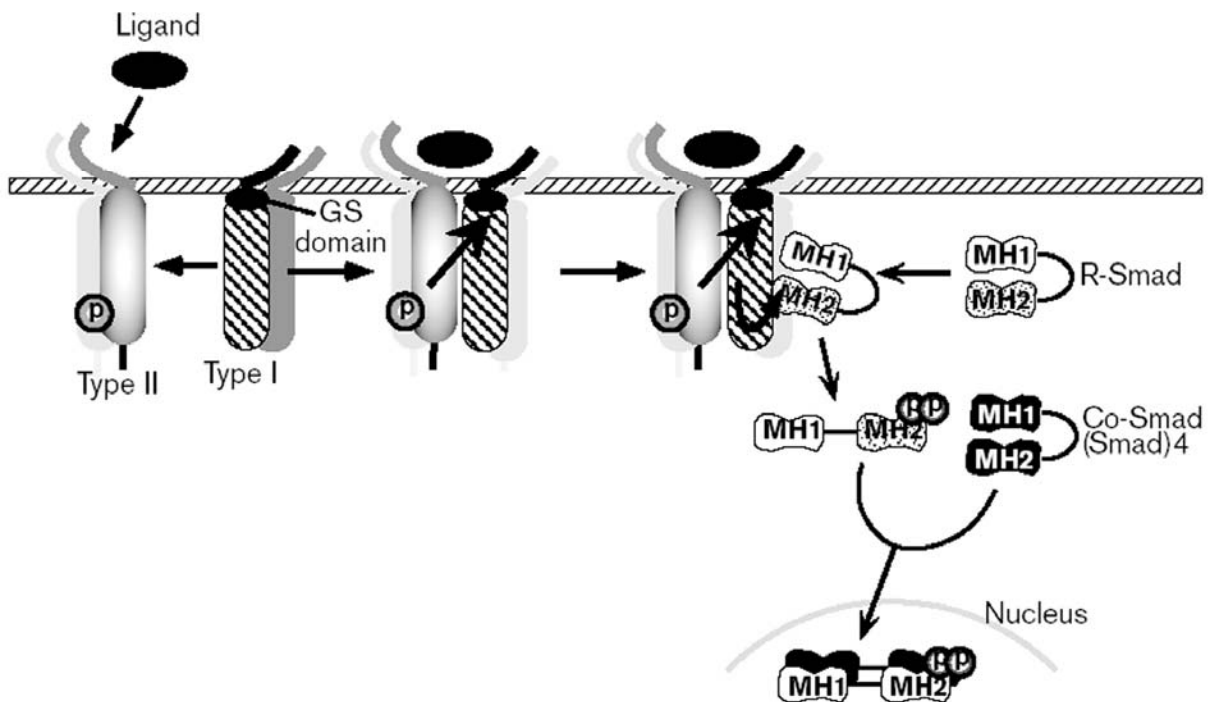


Figure 25 : Mode de signalisation des membres de la superfamille du TGF- β (Attisano et Wrana, 2000). Les facteurs apparentés au TGF- β agissent *via* les récepteurs à activité sérine/thréonine kinase de type I et de type II. La liaison du ligand au récepteur de type II entraîne le recrutement du récepteur de type I. Le récepteur de type II, constitutivement actif, phosphoryle le récepteur de type I au niveau du domaine GS, un motif hautement conservé situé dans la région juxtamembranaire. Le récepteur de type I ainsi activé phosphoryle une R-Smad dans le site consensus SSXS, localisé à l'extrémité C-terminale de la protéine. Ceci aboutit à la dissociation de cette dernière et du complexe de récepteurs, à la dissociation de ses domaines MH1 et MH2 et à la liaison avec Smad4. Le complexe R-Smad/Smad4 subit alors une translocation dans le noyau où il régule la transcription de gènes cibles spécifiques.

Des observations récentes indiquent, par ailleurs, l'existence de voies de transduction des signaux de type TGF- β différentes de la voie canonique TGF- β /Smad (pour revues, voir Massagué, 2000 ; Von Bubnoff et Cho, 2001 ; Derynck et Zhang, 2003 ; Zwijsen *et al.*, 2003). Les BMPs et autres TGF- β peuvent activer les voies MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) parmi lesquelles la voie MAPK classique ou mitogénique encore appelée voie MAPK/ERK (*extracellular signal-regulated protein kinase*) mais surtout les voies MAPK de réponse au stress que sont les voies SAPK/JNK (*stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase*) et P38K (*P38 kinase*) (figure 27). Elles sont également capables de stimuler l'activité de la voie PI3K (*phosphatidyl inositol 3 kinase*) et des caspases.

De manière intéressante, l'activation des voies MAPK ou Smad par les BMPs dépend du mode de liaison du ligand à ses récepteurs (pour revue, voir Botchkarev, 2003). L'association des BMPs aux récepteurs de type I entraînant ensuite le recrutement des récepteurs de type II active la voie MAPK, tandis que la liaison de ces ligands à un complexe préformé des récepteurs des deux types induit la transduction du signal *via* la voie Smad.

On ne sait pas si les voies de transduction BMP/MAPK et BMP/Smad sont liées, mais elles pourraient coopérer au niveau de la régulation de l'expression de gènes cibles des BMPs *via* la phosphorylation par la voie BMP/MAPK de facteurs de transcription qui agiraient en synergie avec les BR-Smads (pour revue, voir Von Bubnoff et Cho, 2001).

L'importance et la multiplicité des fonctions des BMPs, notamment au cours du développement embryonnaire, impliquent une régulation sophistiquée de la signalisation BMP. En effet, du contrôle de l'expression des BMPs à celui de la transcription de leurs gènes cibles, en passant par la régulation de la disponibilité du ligand dans l'espace extracellulaire, toutes les étapes sont étroitement contrôlées, dans le temps et dans l'espace, par un nombre varié de processus. De nombreuses revues traitent de ce sujet (pour revues, voir Piek *et al.*, 1999 ; Massagué et Chen, 2000 ; Miyazono, 2000 ; Nakayama *et al.*, 2000 ; Von Bubnoff et Cho, 2001 ; Balemans et Van Hul, 2002 ; Lutz et Knaus, 2002). Quelques exemples seront brièvement mentionnés ici.

Les BMPs (et autres TGF- β) sont capables d'induire directement leur propre expression et celle des composants de leur voie de signalisation (Miyazono, 2000). Par exemple, l'expression de certains facteurs de transcription tels Xvent2 ou Runx2 qui médient les effets des BMPs, avec les protéines Smads, est induite par ces mêmes ligands

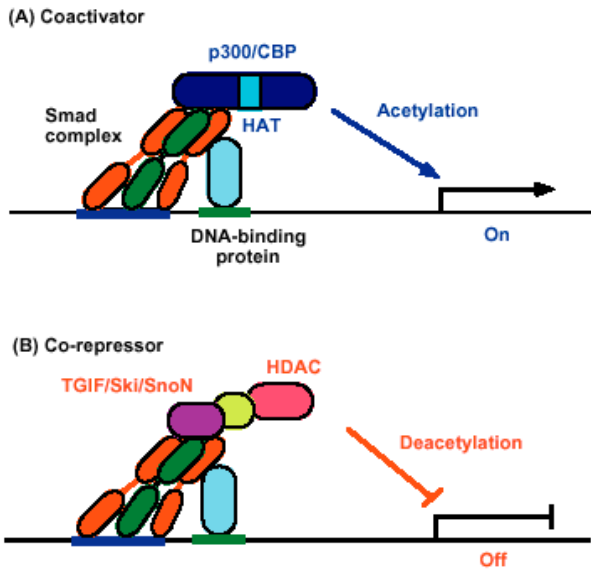


Figure 26 : Régulation de la transcription par les Smads via le recrutement de coactivateurs et corépresseurs transcriptionnels (Miyazono, 2000). Le complexe de Smads (rouge, R-Smads ; vert, Smad4), lié de façon stable et spécifique sur les promoteurs cibles grâce à des cofacteurs (bleu ciel), régule positivement ou négativement la transcription en recrutant des facteurs coactivateurs ou corépresseurs, respectivement. (A) Les coactivateurs transcriptionnels (p300/CBP, bleu marine) induisent l'acétylation des histones via leur activité histone acétyltransférase (HAT) et activent la transcription. (B) Les corépresseurs transcriptionnels, dont TGIF, c-Ski et SnoN, recrutent des histones désacétylases (HDACs, rose) directement ou via des molécules intermédiaires telles que N-CoR et mSin3A (jaune). Ils entraînent la désacétylation des histones et répriment la transcription.

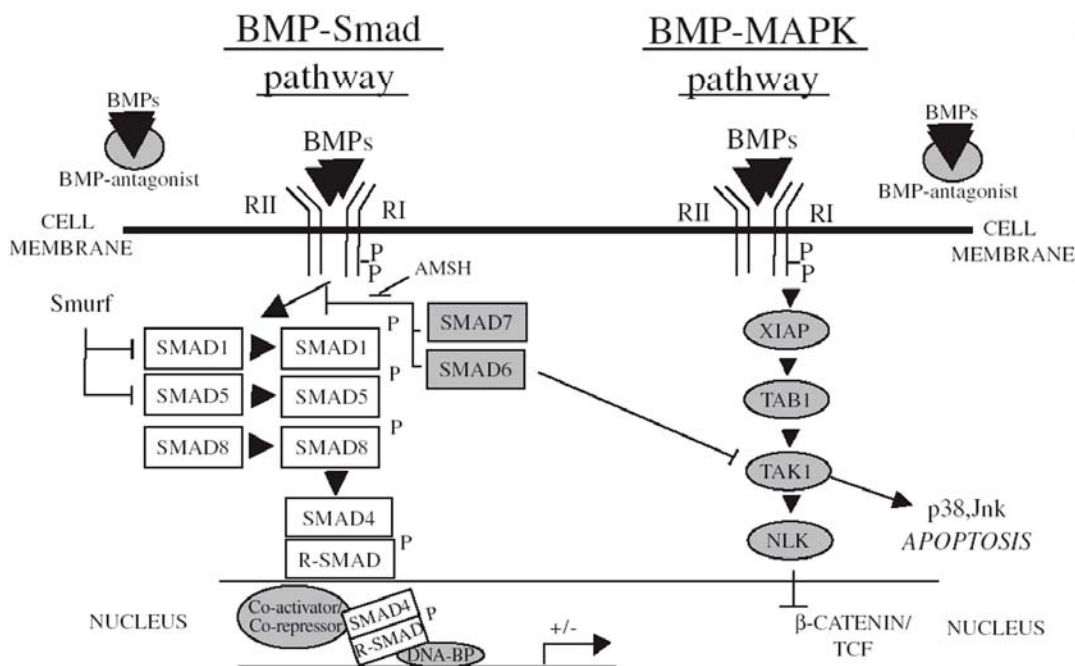


Figure 27 : Représentation schématique des voies canoique BMP/Smad et non canoique BMP/MAPK (Botchkarev, 2003). Les interactions des BMPs avec leurs récepteurs sont régulées par des antagonistes diffusibles qui se complexent directement avec le ligand, l'empêchant d'accéder à et/ou d'activer ses récepteurs. La liaison des BMPs libres aux récepteurs active soit la voie BMP/Smad, soit la voie BMP/MAPK. La première inclut le recrutement et la phosphorylation des R-Smads, suivis par leur association avec Smad4 et la translocation des complexes R-Smad/Smad4 dans le noyau où ils régulent la transcription. La voie BMP/MAPK lie le complexe de récepteurs à la kinase TAK1 par l'intermédiaire des protéines XIAP et TAB1. TAK1 déclencherait l'apoptose via l'activation de la voie P38K/JNK.

(pour revues, voir Miyazono, 2000 ; Zwijsen *et al.*, 2003). Des protéines variées sont également capables de réguler l'expression des BMPs. L'expression ectopique de SHH induit localement celle des gènes *bmp2* et *bmp4* dans certains sites chez l'embryon de poulet (pour revue, voir Hogan, 1996). Le facteur Xnr3 (*Xenopus nodal-related 3*), apparenté aux protéines Nodal, membres de la superfamille TGF- β aussi proches des BMPs que des activines, inhibe la synthèse des BMPs (pour revue, voir Piek *et al.*, 1999).

Une fois sécrétées, les BMPs se lient à des composants de la matrice extracellulaire dont des collagènes, des protéoglycanes à héparanes sulfates, l'héparine. Ces molécules pourraient avoir un rôle physiologique important en protégeant les BMPs de la dégradation protéolytique, contrôlant leur libération lente et limitant leur diffusion, permettant ainsi une régulation précise et locale des processus de signalisation dépendants du contact (pour revues, voir Reddi, 1997 ; Dale et Jones, 1999). Une étude récente montre que la région N-terminale du domaine mature de certaines BMPs, dont BMP2 et BMP4, contient une séquence d'acides aminés basiques très conservés entre les espèces et que trois de ces résidus, capables de lier l'héparine, sont requis pour limiter la diffusion de BMP4 (Ohkawara *et al.*, 2002). En outre, le traitement d'embryons de xénope à l'héparitinase I, qui clive les chaînes héparanes sulfates des protéoglycanes qui en contiennent, élargit le domaine d'activité de BMP4 (Ohkawara *et al.*, 2002).

Dans l'espace extracellulaire, la disponibilité et la distribution des BMPs sont également contrôlées par leur association avec un nombre important d'antagonistes solubles qui appartiennent à des familles de protéines distinctes du point de vue structural et présentent différentes spécificités et affinités de liaison (figure 28 ; pour revues, voir Massagué et Chen, 2000 ; Miyazono, 2000 ; Nakayama *et al.*, 2000 ; Botchkarev, 2003). Ces facteurs diffusibles les empêchent d'accéder à ou d'activer leurs récepteurs contribuant à la formation de gradients d'activité appropriés (pour revues, voir Mehler *et al.*, 1997 ; Dale et Jones, 1999 ; Massagué et Chen, 2000). Parmi ces antagonistes, Noggin est une glycoprotéine sécrétée sous forme de dimères dans différents tissus adultes et embryonnaires de vertébrés, dont l'organisateur de Spemann des amphibiens ou l'équivalent dans d'autres espèces (pour revues, voir Miyazono, 2000 ; Nakayama *et al.*, 2000 ; Balemans et Van Hul, 2002). Elle lie directement certaines BMPs dont GDF6, BMP2, BMP4 et BMP7, avec une plus faible affinité pour BMP7, ce qui les empêche d'interagir avec leurs récepteurs (pour revues, voir Massagué et Chen, 2000 ; Miyazono, 2000 ; Nakayama *et al.*, 2000 ; Balemans et Van Hul, 2002 ; Botchkarev, 2003). En effet, son affinité pour les BMPs est supérieure à celles de ces ligands pour leurs récepteurs

	Comments	BMP-2	BMP-4	BMP-5	BMP-6	BMP-7	GDF-5	GDF-11	Activin	Nodal	Wnt
Noggin		++	++			+	+				
Chordin		++	++			+					
Chordin- <i>like</i>			+	+	+						
Follistatin		+	+			++		+	+++		
FSRP		+			+	++			+++		
DAN		+	+			+	++				
Cerberus		+	+			+			+	+	+
Gremlin		+	+			+					
Dante	Unknown										
PRDC	Unknown										
Sclerostin				+	+						
Sclerostin- <i>like</i>	Unknown										

Figure 28 : Tableau montrant les antagonistes des BMPs et leur spécificité et affinité de ligand (Baemans et Van Hul, 2002).

(pour revue, voir Botchkarev, 2003). Par ailleurs, Noggin possède une affinité importante pour les protéoglycanes à héparanes sulfates présents à la surface de toutes les cellules adhérentes et dans la matrice extracellulaire et ces interactions préservent sa capacité à neutraliser l'activité des BMPs. Ces molécules pourraient contrôler la distribution tissulaire de cet antagoniste et restreindre la compétence des cellules à répondre aux BMPs (pour revue, voir Botchkarev, 2003). Enfin, les BMPs sont capables d'induire l'expression de Noggin, limitant ainsi leur propre activité en retour (pour revues, voir Massagué et Chen, 2000 ; Miyazono, 2000 ; Balemans et Van Hul, 2002 ; Botchkarev, 2003). Des régulations croisées de la signalisation BMP par d'autres voies *via* Noggin sont possibles. Par exemple, TGF- β 1 induit l'expression de cet antagoniste (pour revue, voir Miyazono, 2000).

Au niveau intracellulaire, les Smads inhibitrices, Smad6 et Smad7, régulent négativement les voies BMP et TGF- β , mais Smad6, préférentiellement la voie BMP, par différents mécanismes et à plusieurs niveaux de la cascade de transduction du signal (figures 29 et 30 ; pour revues, voir Piek *et al.*, 1999 ; Itoh *et al.*, 2000 ; Ten Dijke *et al.*, 2002). L'expression des I-Smads est directement activée par les membres de la famille TGF- β et d'autres molécules telles que l'EGF (*epidermal growth factor*) ou l'IFN γ (interféron γ) (pour revues, voir Piek *et al.*, 1999 ; Itoh *et al.*, 2000 ; Massagué et Chen, 2000 ; Massagué, 2000 ; Nakayama *et al.*, 2000 ; Von Bubnoff et Cho, 2001 ; Ten Dijke *et al.*, 2002). Les I-Smads interviennent en effet dans la rétro-régulation de la signalisation de type TGF- β dont elles modulent l'intensité et la durée mais aussi dans la régulation de cette dernière par d'autres voies de transduction (pour revues, voir Massagué, 2000 ; Massagué et Chen, 2000). Ces Smads sont constitutivement nucléaires et transportées dans le cytoplasme suite à la stimulation du complexe de récepteurs, par un processus encore inconnu (pour revues, voir Itoh *et al.*, 2000 ; Massagué et Chen, 2000 ; Shi et Massagué, 2003). Au niveau de la membrane plasmique, les I-Smads se lient au domaine GS des récepteurs de type I activés de façon durable, empêchant ainsi l'accès des R-Smads aux récepteurs et donc, leur activation (figures 29 et 30 ; pour revues, voir Piek *et al.*, 1999 ; Itoh *et al.*, 2000 ; Nakayama *et al.*, 2000 ; Von Bubnoff et Cho, 2001 ; Ten Dijke *et al.*, 2002).

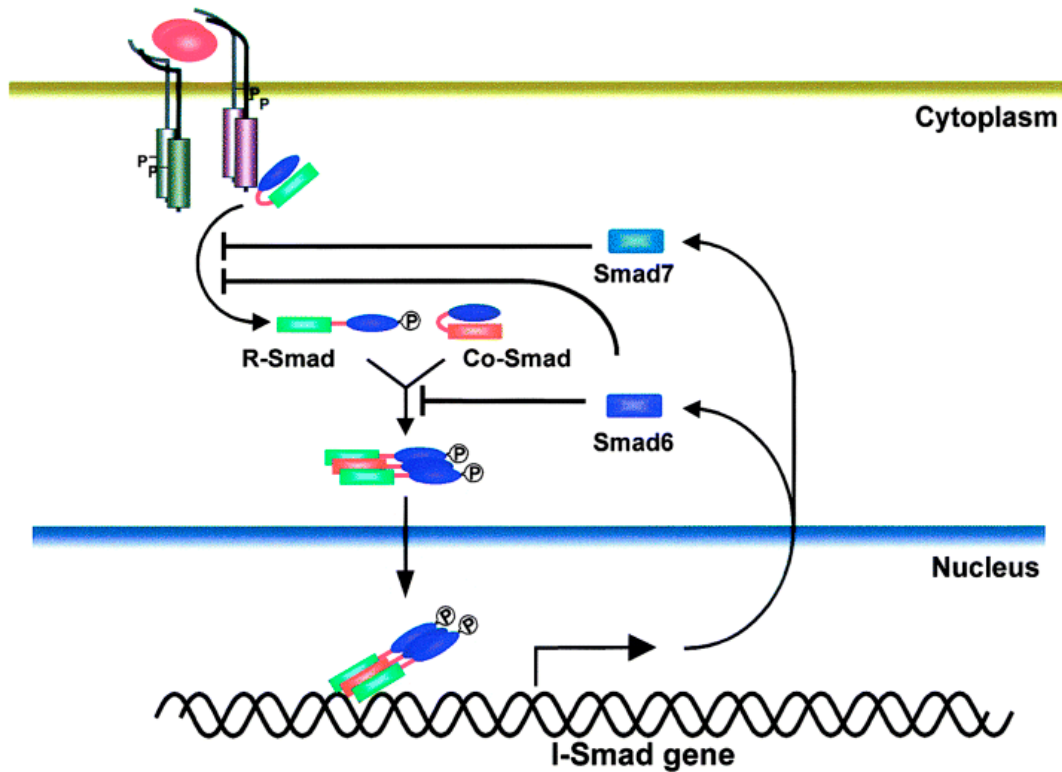


Figure 29 : Mécanisme d'action des I-Smads (Itoh et al., 2000). La régulation négative de la signalisation TGF- β /Smad peut résulter de l'action des I-Smads qui empêchent l'activation des R-Smads et/ou l'association des R-Smads activées avec Smad4. L'expression des I-Smads étant activée par les facteurs de type TGF- β , ces protéines pourraient participer à une boucle de rétrocontrôle négatif de la signalisation.

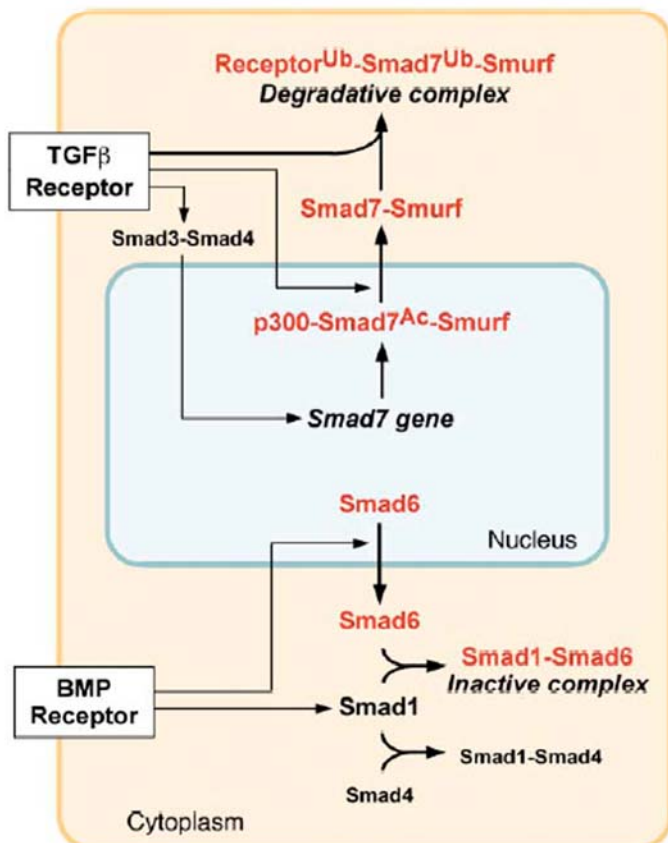


Figure 30 : Schéma de la fonction des I-Smads (Shi et Massagué, 2003). Smad7, dont l'expression transcriptionnelle est activée par la signalisation de type TGF- β , entraîne l'ubiquitination et la dégradation du complexe de récepteurs via le recrutement de Smurf (*Smad ubiquitination regulatory factor*). Smad6 empêche l'association de Smad1 activée à Smad4.

b. Rôle des facteurs de type TGF- β dans l'établissement des populations cellulaires dorsales du névraxe

La distribution de plusieurs membres de la superfamille du TGF- β a été analysée dans et autour de la région dorsale du SNC en développement, au moment de la genèse des cellules neurales dorsales, chez le poulet et la souris (pour revue, voir Lee et Jessell, 1999). Les messagers *BMP4* et *BMP7* sont exprimés dans l'ectoderme initialement en contact avec l'ébauche neurale, dans les plis neuraux et plus tard dans la partie dorsale du tube neural dont la *roof plate* où *Dsl-1*, qui code une protéine de type BMP, commence également à s'exprimer (Basler *et al.*, 1993 ; Liem *et al.*, 1995, 1997 ; Watanabe et Le Douarin, 1996 ; Arkell et Beddington, 1997 ; Nifuji *et al.*, 1997). Les transcrits *BMP5* et *Activine B* sont aussi détectés dans la *roof plate* et les cellules adjacentes (Liem *et al.*, 1997) et *GDF7* (également connu sous le nom BMP12), uniquement dans la *roof plate* (Lee *et al.*, 1998). Le profil d'expression de l'ensemble de ces messagers chez le poulet et la souris présente quelques différences et on trouve, en outre, des ARNm de BMP2 dans l'ectoderme non neural et de BMP6 dans la *roof plate* et les cellules adjacentes, chez la souris (Dudley et Robertson, 1997 ; Lee *et al.*, 1998). Ainsi, au moins six membres de la famille du TGF- β sont exprimés dans des domaines plus ou moins chevauchants du tube neural dorsal (Liem *et al.*, 1997 ; Lee *et al.*, 1998 ; pour revue, voir Lee et Jessell, 1999).

Des études *in vitro* réalisées chez le poulet indiquent que ces protéines de type TGF- β miment les effets de l'épiderme présomptif et de la *roof plate* sur le développement des populations cellulaires dorsales du tube neural (pour revue, voir Lee et Jessell, 1999). Par exemple, BMP4 et BMP7 (les seules BMPs présentes dans l'ectoderme non neural chez le poulet) induisent la formation de cellules de crêtes neurales et de *roof plate* dans des cultures de plaque neurale (Liem *et al.*, 1995, 1997). De plus, l'utilisation d'antagonistes naturels de BMP4 (Noggin) et de BMP7 (Follistatine) montre que ces BMPs sont requises dans l'ectoderme non neural pour la formation de ces deux types cellulaires dorsaux (Liem *et al.*, 1997). Par ailleurs, BMP4, BMP5, BMP7, *Dsl-1* et *GDF7* entraînent la différenciation des interneurones dorsaux de type 1 (dI1 ; *dorsal Interneurones 1*) de manière dépendante de la dose dans la plaque neurale en culture. Dans les mêmes conditions, l'activine induit le développement des cellules dI1, bien que moins efficacement que les BMPs, et des cellules dI3, plus ventrales que les dI1. L'augmentation de la dose d'activine entraîne une diminution du nombre d'interneurones dI1 induits et un accroissement de celui des dI3. Les BMPs sont également capables de promouvoir la formation des cellules dI3 mais à faible concentration et lorsque le début du traitement des

cultures de plaque neurale est retardé. Le développement des neurones dorsaux d'identité différente et à des positions distinctes de l'axe dorso-ventral ferait donc intervenir des variations quantitatives et qualitatives dans la signalisation de type TGF- β ainsi que des changements temporels dans la compétence des cellules neurales (Liem *et al.*, 1997). Enfin, le traitement de cocultures de plaque neurale et de *roof plate* par Noggin (qui bloque l'activité de BMP4 et GDF7) et par Follistatine (qui inhibe celle de BMP6, BMP7 et de l'activine) indique que l'activité de plusieurs membres de type TGF- β produits par la *roof plate* est requise pour la genèse des interneurons dI1 et dI3 (Liem *et al.*, 1997 ; Lee *et al.*, 1998).

L'implication de chacun de ces TGF- β dans la spécification des cellules neurales dorsales *in vivo* a été impossible à évaluer parce que les mutants générés pour certains membres de cette famille soit meurent dès la gastrulation, soit ne présentent pas d'anomalie dans le tissu nerveux probablement en raison d'une redondance fonctionnelle entre ces facteurs (pour revue, voir Lee et Jessell, 1999). Le cas de GDF7 constitue cependant une exception ; l'inactivation expérimentale de son gène indique que sa fonction est nécessaire pour le développement d'une des deux populations de neurones dI1 (Lee *et al.*, 1998).

c. Modèle de spécification des populations neuronales dorsales de la moelle épinière

La mise en place des différentes classes de neurones est bien moins connue dans la région dorsale du tube neural que dans sa région ventrale. Cependant, des travaux tout récents, guidés par le modèle de la régionalisation de la partie ventrale de la moelle épinière, ont commencé à élucider les mécanismes à l'œuvre dorsalement et suggèrent que des stratégies similaires sont utilisées dans les régions dorsale et ventrale du SNC en développement.

Chez la souris, neuf populations d'interneurones dorsaux post-mitotiques ont pu être définies, principalement sur la base du répertoire de facteurs de transcription qu'elles expriment mais aussi en fonction du moment de leur émergence, de leur dépendance vis à vis des signaux provenant de la *roof plate* et de leur voie de migration (figure 31; Gross *et al.*, 2002 ; Müller *et al.*, 2002). Six d'entre elles, les interneurons dI1 précoces et dI2 à dI6 se développent précocement (E10-E10,5) et trois, les cellules dI1 tardives, dIL^A et dIL^B (L pour *late*), plus tardivement (E11-E13). Parmi ces interneurons, les dI1 à dI3 (les plus dorsaux au sortir du neuroépithélium) forment la classe A et dépendent de signaux de la *roof plate* pour leur formation ; les dI4 à dI6, dIL^A et dIL^B (plus ventraux) appartiennent à

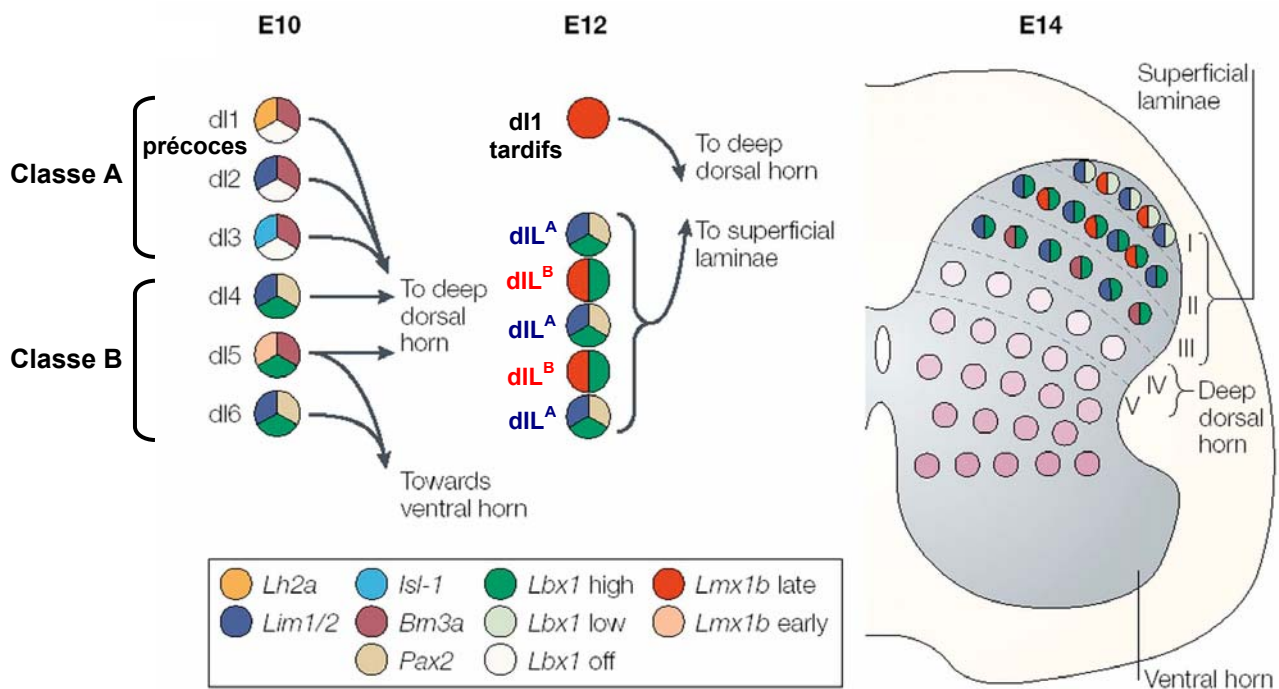


Figure 31 : Schéma de l'organisation des neurones dorsaux de la moelle épinière chez la souris (d'après Caspary et Anderson, 2003). Neuf populations d'interneurones dorsaux post-mitotiques peuvent être distinguées selon la combinaison des facteurs de transcription à homéodomaine qu'elles expriment, le moment de leur émergence, leur dépendance vis à vis de signaux issus de la *roof plate* pour leur spécification et leur voie de migration. Six d'entre elles (dl1 précoces, dl2, dl3, dl4, dl5 et dl6) émergent à E10, les 3 autres (dl1 tardifs, dIL^A et dIL^B), à E12. Les interneurones les plus dorsaux au sortir du neuroépithélium (dl1, dl2 et dl3) requièrent des signaux de la *roof plate* pour leur développement et constituent la classe A, les autres populations, plus ventrales (dl4, dl5, dl6, dIL^A et dIL^B) dites de classe B, se forment en absence de *roof plate*. Les neurones de classe A migrent ventralement et les cellules dl4 ainsi qu'une fraction des cellules dl5, latéralement, pour aller ensemble peupler les couches profondes des cornes dorsales de la moelle épinière (*laminae* IV-V). L'autre partie des neurones dl5 et les dl6 migrent vers les cornes ventrales. Les neurones dIL^A et dIL^B migrent dorsalement jusqu'aux couches superficielles des cornes dorsales (*laminae* I-II-III).

la classe B et se développent en absence de *roof plate* (Lee *et al.*, 2000b ; Müller *et al.*, 2002). Chez le poulet, les neurones dI1 à dI6 ont également été caractérisés (Gross *et al.*, 2002 ; Müller *et al.*, 2002).

Les interneurones dI1 à dI6 dérivent de progéniteurs neuroépithéliaux caractérisés par l'expression d'une combinaison spécifique de facteurs de transcription à homéodomaine (Irx3, Msx1, Msx2, Pax3, Pax6, Pax7, Dbx2) et à domaine bHLH (Math1, Ngn1/2, Mash1) (figure 32 ; pour revues, voir Goulding *et al.*, 2002 ; Caspary et Anderson, 2003 ; Helms et Johnson, 2003). Plus tard, les cellules dIL^A et dIL^B se forment à partir de la population dI4 (et peut-être aussi de la population dI5) (pour revues, voir Matise, 2002 ; Caspary et Anderson, 2003). L'expression des protéines à bHLH définit des domaines non chevauchants dans le neuroépithélium dorsal. Ainsi, Math1 (*mammalian atonal homolog 1*) et Cath1 (*chicken atonal homolog 1*), son homologue chez le poulet, sont exprimés dans les progéniteurs neuraux les plus dorsaux, adjacents à la *roof plate*, qui formeront les interneurones dI1 précoces et tardifs (Lee *et al.*, 1998 ; Gowan *et al.*, 2001). De plus, Math1 est requis pour la genèse de ces cellules dI1 comme l'indique l'analyse du développement des populations cellulaires dorsales de la moelle épinière chez des souris dont le gène *Math1* a été invalidé (Gowan *et al.*, 2001). Ngn1 et Ngn2 sont présentes dans deux domaines distincts du territoire de la zone ventriculaire jouxtant celui qui exprime Math1. Les progéniteurs de ce territoire donnent naissance aux interneurones dI2 et Ngn1 ou Ngn2 est nécessaire à leur formation (Gowan *et al.*, 2001). Mash1 (*mammalian achaete-scute homolog 1*) et Cash1 (chez le poulet) sont exprimés dans une large bande ventrale au domaine contenant Ngn1 et Ngn2. Cette région comprend les progéniteurs des neurones dI3 à dI5, dIL^A et dIL^B (Gowan *et al.*, 2001 ; Müller *et al.*, 2002). La spécification des neurones de la moelle épinière dorsale n'a pas encore été examinée chez les souris mutantes pour le gène *Mash1*. Dans le domaine Mash1 positif, la présence de Pax6 et le niveau d'expression de Pax7 distinguent les progéniteurs des dI3 (Pax6⁻ et Pax7 faible) de ceux des dI4 et dI5 (Pax6⁺ et Pax7 élevé). D'autres facteurs non encore caractérisés permettent vraisemblablement de différencier les progéniteurs des populations dI4 et dI5 (pour revue, voir Helms et Johnson, 2003). Les interneurones dI6 proviennent probablement du domaine ventral à celui contenant Mash1 et qui coexprime les protéines à homéodomaine Pax7 et Dbx2 (Müller *et al.*, 2002).

L'expression de ces facteurs de transcription à bHLH dans des domaines distincts du neuroépithélium dorsal est, au moins en partie, due à des interactions croisées entre ces protéines, comme c'est le cas entre les facteurs à homéodomaine exprimés dans des

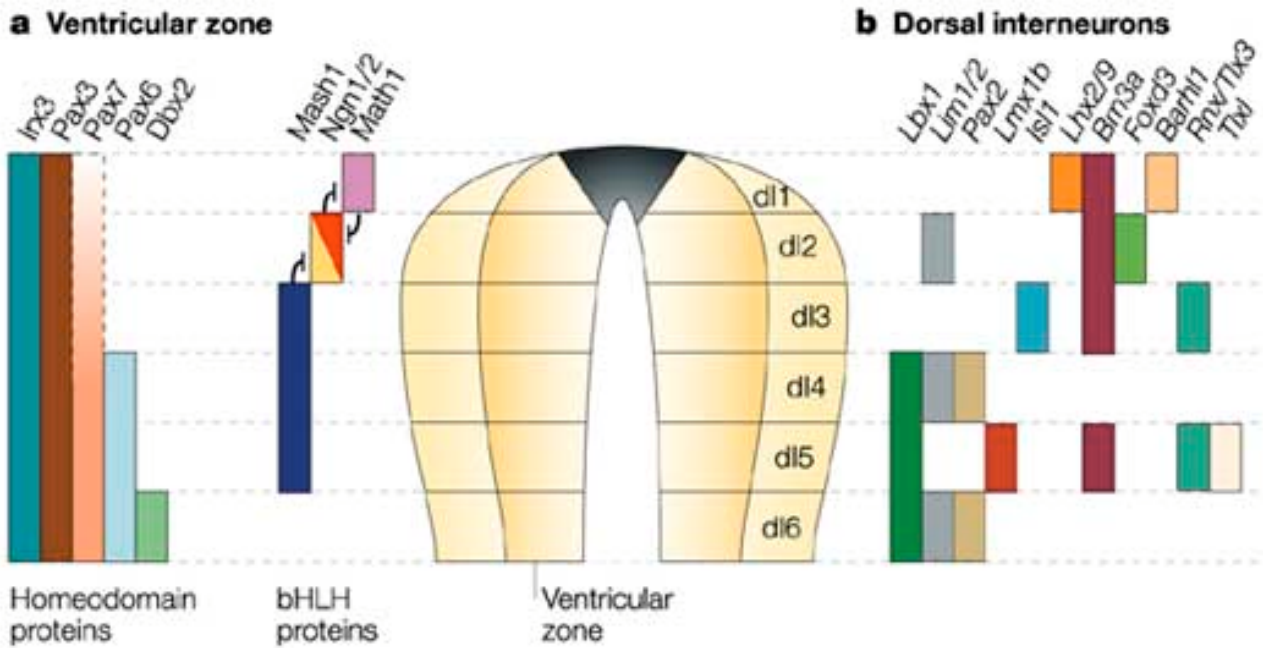


Figure 32 : Un code de facteurs de transcription contrôle la spécification cellulaire dans le neuroépithélium dorsal (Caspary et Anderson, 2003). a) Schéma représentant le patron d'expression des facteurs de transcription dans la région dorsale de la zone ventriculaire. Les domaines d'expression de certaines paires de protéines sont régulés par des répressions mutuelles (barres). b) Schéma montrant les domaines d'expression des facteurs de transcription par les neurones en différenciation ou différenciés qui émergent de chaque domaine de progéniteurs.

domaines adjacents du neuroépithélium ventral. En effet, l'analyse des mutants murins *Math1*^{-/-} et *Ngn1*^{-/-}; *Ngn2*^{-/-} et des études de gain de fonction menées chez le poulet *in vivo* ont démontré que *Math1* réprime l'expression de *Ngn1* et de *Mash1/Cash1* et que *Ngn1* réprime celle de *Math1/Cath1* et *Mash1/Cash1* (Gowan *et al.*, 2001).

Les facteurs de transcription à homéodomaine *Irx3*, *Pax3* et *Pax7* sont présents dans l'ensemble du neuroépithélium dorsal avec *Pax7*, selon un gradient croissant de la partie la plus dorsale à la partie la plus ventrale. *Pax3* et *Pax7* sont des protéines très apparentées et les souris mutantes pour chacun de leur gènes ne présentent pas de défaut évident dans la moelle épinière dorsale, excepté à des stades précédant la mise en place des neurones dorsaux du SNC dans le cas de *Pax3* (*i. e.* au niveau de la fermeture dorsale du tube neural et de l'émigration et/ou de la différenciation des cellules des crêtes neurales). Des doubles mutants *Pax3*^{-/-} ; *Pax7*^{-/-} ont été étudiés avant l'identification de nombreux marqueurs moléculaires des types cellulaires neuraux dont on dispose aujourd'hui. Le rôle éventuel de ces gènes dans la spécification des neurones dorsaux n'est donc pas connu. Cependant, ils pourraient être impliqués dans le développement des cellules dI1 et/ou dI2 dont les axones participent à la formation de la commissure ventrale, localisée sous la *floor plate*, puisque chez les doubles mutants, cette structure est réduite. En revanche, leur importance dans la restriction du développement des neurones ventraux à la région ventrale de la moelle épinière a été démontrée (Mansouri et Gruss, 1998 ; pour revues, voir Caspary et Anderson, 2003 ; Helms et Johnson, 2003).

Bien qu'il ait été difficile de démontrer la nécessité des BMPs dans la spécification des cellules dorsales de la moelle épinière par des analyses génétiques chez la souris pour les raisons mentionnées ci-dessus (*cf.* p.39), une étude récente consistant à manipuler le niveau de la signalisation BMP dans cette région du SNC, *in vivo* chez le poulet, fournit des indications quant au mode d'action de ces protéines dans ce processus (Timmer *et al.*, 2002).

L'activation de la voie de signalisation BMP, au moyen de l'expression de récepteurs constitutivement actifs, entraîne l'expression ectopique des marqueurs dorsaux *Pax7*, *Msx1* et *Msx2* (Timmer *et al.*, 2002), confirmant d'anciennes données obtenues dans des explants de plaque neurale (Liem *et al.*, 1995). La stimulation de la signalisation BMP aboutit également à l'expression de *Cath1*, normalement restreinte aux cellules adjacentes à la *roof plate*, dans l'ensemble du neuroépithélium dorsal (Timmer *et al.*, 2002), en accord avec l'effet de BMP7 ou GDF7 dans des explants de tissu neural chez la souris et le poulet

(Lee *et al.*, 1998). D'importants niveaux d'activité BMP répriment l'expression de *Cash1* dans la partie dorsale de son territoire normal d'expression (Timmer *et al.*, 2002). Sachant que le domaine *Mash1* positif est étendu en direction dorsale en absence de *roof plate* (Lee *et al.*, 2000b), ce résultat laisse penser qu'un degré intermédiaire de signalisation BMP est requis pour la mise en place en position correcte de la frontière dorsale du domaine exprimant *Mash1/Cash1*. *Ngn1* n'est pas exprimée dans le neuroépithélium dorsal, aussi bien après ablation génétique de la *roof plate* (Lee *et al.*, 2000b) qu'en présence d'un niveau élevé d'activation de la signalisation BMP, suggérant qu'un niveau moyen d'activité BMP est nécessaire à son expression dans cette région. En effet, une faible stimulation de la voie BMP induit l'expression de *Ngn1* dans la totalité de la zone ventriculaire dorsale (Timmer *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces résultats peut être résumé dans le modèle suivant. Initialement, les BMPs induisent et maintiennent l'expression des marqueurs *Pax3*, *Pax7*, *Msx1* et *Msx2* dans l'ébauche du SNC, expression restreinte à la région dorsale *via* l'action ventralisante de SHH. Deux domaines de compétence sont ainsi définis, l'un, pour l'établissement des populations neurales dorsales et l'autre, pour la neurogenèse ventrale. Ensuite, un gradient d'activité BMP régule l'expression dorsale de trois facteurs de transcription à domaine bHLH à des niveaux distincts de l'axe dorso-ventral de la moelle épinière. Les domaines en résultant sont maintenus par des régulations croisées entre ces protéines et donnent naissance aux quatre types d'interneurones les plus dorsaux ou de classe A (*dI1* précoces et tardifs, *dI2* et *dI3*) (*cf.* figure 35A et B).

4. Etablissement des populations cellulaires intermédiaires de la moelle épinière

Les populations d'interneurones dorsaux les plus ventraux (*dI4* à *dI6*, *dIL^A* et *dIL^B* formant la classe B) ne dépendent pas de signaux issus de la *roof plate* pour leur spécification (Lee *et al.*, 2000b ; Müller *et al.*, 2002). Ces cellules de classe B se distinguent de celles de classe A, entre autres particularités, par l'expression du facteur de transcription à homéodomaine codé par le gène *Lbx1* (homologue des gènes *lady bird* de drosophile) lorsqu'elles deviennent post-mitotiques (Gross *et al.*, 2002 ; Müller *et al.*, 2002). Cette protéine est essentielle à la formation des neurones de classe B. En effet, chez des souris dont le gène *Lbx1* a été invalidé, les cellules de classe B adoptent des caractéristiques de cellules de classe A (figure 33). Inversement, l'expression ectopique de

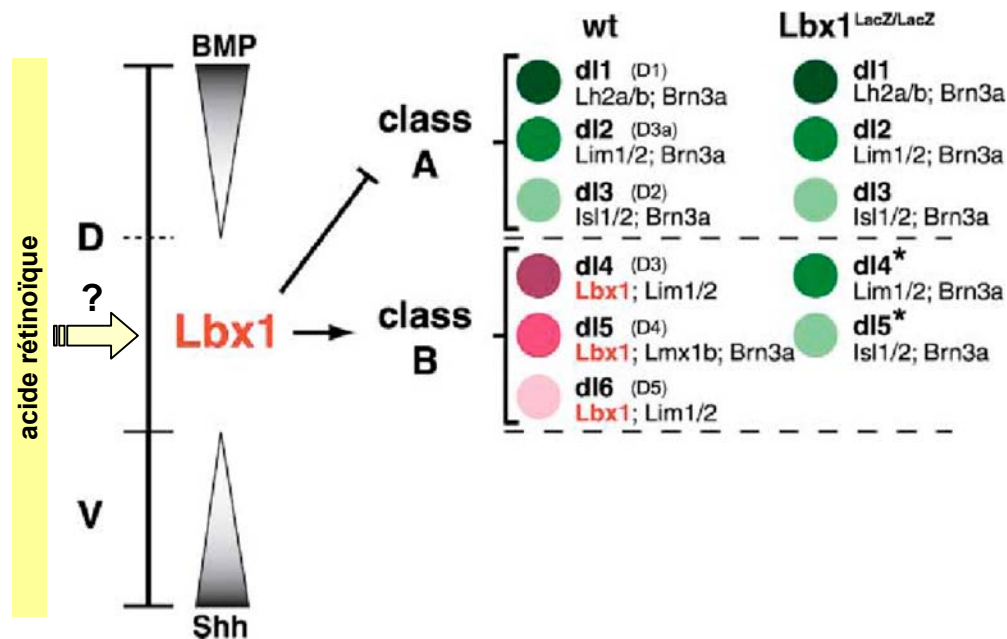


Figure 33 : Diagramme représentant les populations d'interneurones dorsaux dans la moelle épinière et la fonction de *Lbx1* dans leur développement (d'après Müller *et al.*, 2002). La localisation selon l'axe dorso-ventral des sous-types neuronaux dorsaux de classe A (vert) et de classe B (rouge) ainsi que les facteurs de transcription à homéodomaine qu'ils expriment sont schématisés chez les souris sauvage et mutante pour la fonction du gène *Lbx1*. *Lbx1*, exprimé par les neurones de classe B post-mitotiques, est nécessaire à leur développement et agirait en réprimant celui des neurones de classe A puisqu'en son absence, les cellules qui devraient être de classe B adoptent des caractéristiques de cellules de classe A. Les gradients des facteurs BMP et SHH, sécrétés par la *roof plate* et la *floor plate*, respectivement, et gouvernant l'établissement des domaines de progéniteurs neuronaux dorsaux et ventraux sont représentés à gauche. Ces morphogènes ne sont pas requis pour la spécification des neurones de classe B mais régulent la position dorso-ventrale à laquelle ils doivent être générés. Des signaux provenant du mésoderme paraxial (jaune), dont l'acide rétinoïque, et impliqués notamment dans le développement des neurones dl6, pourraient également être des régulateurs de l'expression de *Lbx1*.

Lbx1 dans la moelle épinière dorsale de poulet *in vivo* supprime la formation des cellules de classe A qui sont remplacées par des cellules présentant un phénotype de neurones de classe B (Gross *et al.*, 2002 ; Müller *et al.*, 2002 ; pour revues voir Matisse, 2002 ; Caspary et Anderson, 2003 ; Helms et Johnson, 2003).

Bien que les interneurons *Lbx1* positifs se forment en absence de *roof plate*, ils sont localisés en position plus dorsale que normalement. De manière analogue, ces cellules sont produites dans la moelle épinière des mutants *SHH*^{-/-}, mais dans sa région la plus ventrale (Müller *et al.*, 2002 ; pour revue, voir Caspary et Anderson, 2003). Ceci indique que ni les BMPs exprimées dans la *roof plate*, ni SHH ne sont requises pour le développement de ces interneurons, mais que ces deux types de protéines sont importantes pour définir la position dorso-ventrale à laquelle ils doivent être générés. Des signaux issus du mésoderme paraxial ont été impliqués dans la mise en place de cellules de la région intermédiaire de la moelle épinière, telles que les interneurons dorsaux les plus ventraux (dI6), et pourraient aussi être des régulateurs potentiels de l'expression de *Lbx1* (pour revue, voir Caspary et Anderson, 2003).

Les effets antagonistes des BMPs et de SHH ont également été supposés établir la position des domaines de progéniteurs d'autres types cellulaires de la zone intermédiaire de la moelle épinière. La région intermédiaire du neuroépithélium est définie par l'expression des facteurs de transcription *Dbx* qui englobe quatre domaines distincts de progéniteurs, deux dorsaux qui expriment *Pax7* et deux ventraux dépourvus de cette protéine. Ce sont, de la région la plus dorsale à la plus ventrale, les domaines *Pax7*⁺/*Dbx2*⁺ (lequel donne vraisemblablement naissance aux interneurons dorsaux dI6), *Pax7*⁺/*Dbx2*⁺/*Dbx1*⁺, *Pax7*⁺/*Dbx2*⁺/*Dbx1*⁺ (à l'origine des interneurons ventraux les plus dorsaux ou V0) et *Pax7*⁺/*Dbx2*⁺ (qui contient les progéniteurs des interneurons ventraux V1) (figure 34A ; Pierani *et al.*, 1999). Bien qu'à faible concentration SHH soit suffisante pour induire l'expression de *Dbx1* et *Dbx2*, l'analyse de la moelle épinière des mutants murins *SHH*^{-/-} montre que cette protéine n'est pas essentielle pour ce processus (Pierani *et al.*, 1999). L'acide rétinoïque provenant du mésoderme paraxial ou synthétisé par les cellules neurales elles-mêmes est capable d'activer l'expression de *Dbx1* et *Dbx2*, parallèlement à SHH (Pierani *et al.*, 1999). D'ailleurs, étant donné que la dose de SHH requise pour réprimer l'expression de *Pax7* est similaire à celle nécessaire à l'activation de l'expression de *Dbx*, l'expression dorsale de *Dbx* (dans le domaine *Pax7* positif) ne serait pas due à SHH, mais refléterait plutôt un effet de l'acide rétinoïque. La restriction du domaine exprimant les facteurs *Dbx* à la région intermédiaire de la moelle épinière serait la conséquence des

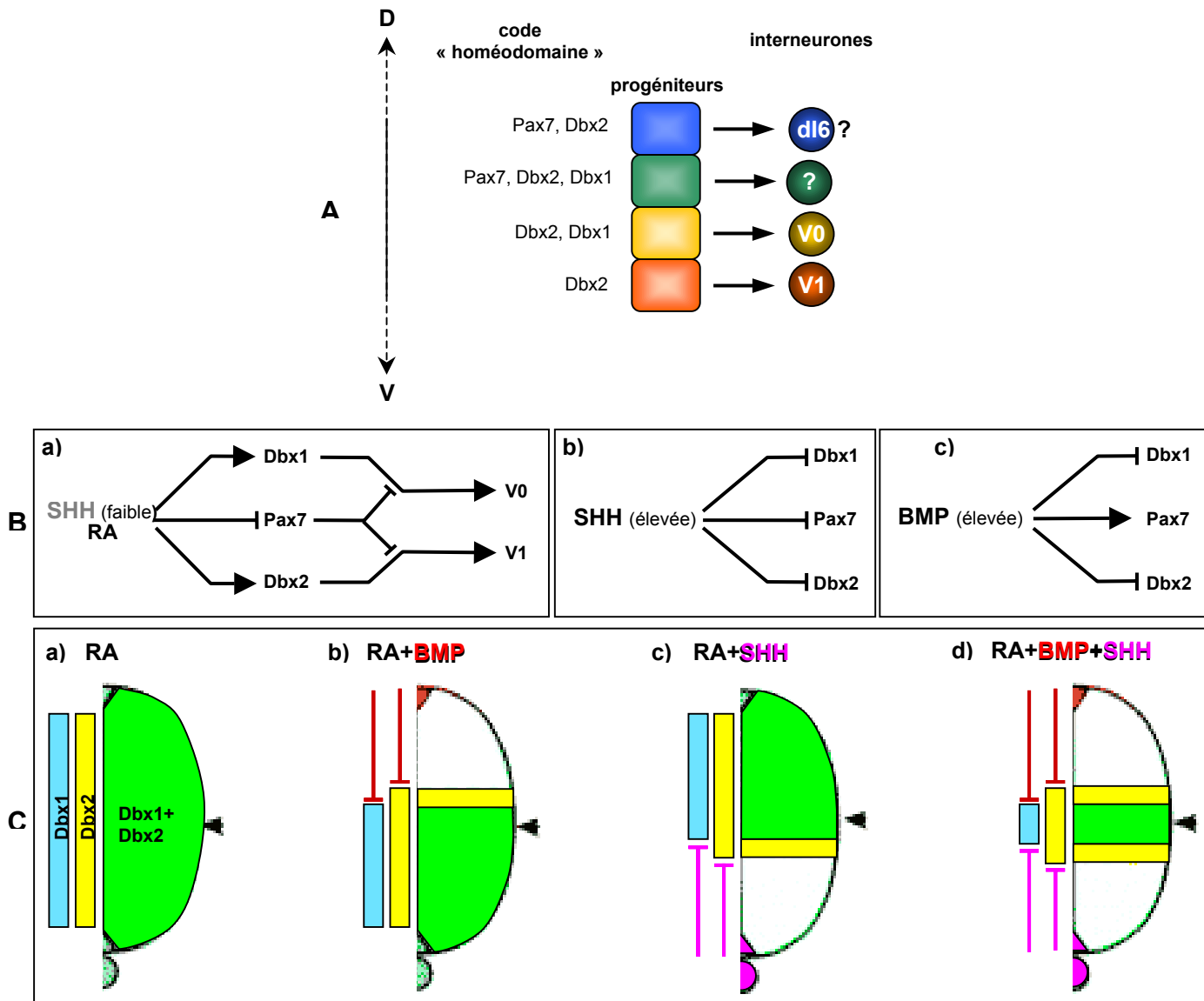


Figure 34 : Régionalisation de la région intermédiaire de la moelle épinière (d'après Pierani *et al.*, 1999). A. L'expression régionalisée des facteurs de transcription à homéodomaine Pax7, Dbx1 et Dbx2 définit 4 domaines de progéniteurs dans le neuroépithélium intermédiaire. Le plus dorsal donne vraisemblablement naissance aux interneurones dorsaux dl6 et les deux plus ventraux, aux interneurones ventraux V0 et V1. B. Régulation de l'expression des facteurs de transcription présents dans les progéniteurs des populations neuronales intermédiaires par SHH, BMP et l'acide rétinoïque. a) Modèle des activités inductrices parallèles d'un faible niveau de signalisation SHH et de l'acide rétinoïque (RA) sur l'expression de Dbx1 et Dbx2 et la genèse des interneurones V0 et V1. La sortie du cycle cellulaire est représentée par une ligne en pointillés. b) Influence de hauts niveaux de signalisation SHH sur l'expression de Dbx1, Dbx2 et Pax7. c) Influence de niveaux élevés de signalisation BMP sur l'expression de Dbx1, Dbx2 et Pax7. C. Patrons d'expression présumés de Dbx1 et Dbx2 dans différentes conditions de signalisation. La tête de flèche marque le centre de l'axe dorso-ventral du tube neural. a) La signalisation RA induirait l'expression de Dbx1 et Dbx2 dans l'ensemble du neuroépithélium. b) Dans le neuroépithélium dorsal, la signalisation BMP graduelle réprimerait l'expression de Dbx1 et Dbx2 induite par RA, à des doses différentes. c) Ventralement, la signalisation SHH graduelle inhiberait aussi l'expression de Dbx1 et Dbx2 médiée par RA, à des concentrations distinctes. d) L'action conjointe de RA et des activités graduelles de BMP et SHH aboutirait à l'établissement d'un domaine central de progéniteurs exprimant Dbx1 et Dbx2 et de 2 domaines, l'un plus dorsal, l'autre plus ventral, contenant des progéniteurs exprimant uniquement Dbx2. Ce diagramme refléterait la situation normale *in vivo*.

fortes activités ventrale de SHH et dorsale de BMP qui sont capables de réprimer l'expression de Dbx1 et Dbx2 *in vitro* malgré la présence d'acide rétinoïque (figure 34B ; Pierani *et al.*, 1999). L'activation de la signalisation BMP dans la moelle épinière *in vivo* réprime également l'expression de Dbx1 et Dbx2 et concernant Dbx2, cet effet pourrait être médié par l'activation de l'expression de Msx1, lequel facteur est capable d'inhiber l'expression de Dbx2 de manière cellule autonome (Timmer *et al.*, 2002). La sensibilité différentielle de Dbx1 et Dbx2 aux actions inhibitrices de SHH et des BMPs permettrait d'établir des domaines Dbx1 et Dbx2 avec des frontières dorsales distinctes et des frontières ventrales également distinctes (figure 34C ; Pierani *et al.*, 1999). Par ailleurs, l'expression de Pax6, qui occupe un grand domaine intermédiaire dans le neuroépithélium, est différentiellement régulée par la signalisation BMP de manière dépendante du niveau d'activation de cette voie mais aussi de la position des cellules cibles selon l'axe dorso-ventral de la moelle épinière (Timmer *et al.*, 2002). L'expression de Pax6 est également contrôlée de manière complexe par SHH : de fortes concentrations de SHH répriment l'expression de Pax6 dans les cellules ventrales et des niveaux plus faibles l'activent dans la région intermédiaire (Ericson *et al.*, 1997). L'action combinée de différents niveaux d'activité BMP et SHH positionne donc les limites du domaine exprimant Pax6. Ainsi, en plus de réguler la spécification des populations cellulaires dorsales de la moelle épinière, *via* leur effet sur l'expression de protéines à bHLH, les BMPs participent avec SHH à la mise en place des populations intermédiaires en position adéquate, *via* le contrôle de l'expression de nombreux facteurs de transcription à homéodomaine (figures 34C et 35).

5. Antagonisme SHH/BMP

Bien que les processus de spécification des cellules dorsales, intermédiaires et ventrales de la moelle épinière aient été abordés séparément, il apparaît de plus en plus clairement qu'ils sont interdépendants.

Ainsi, malgré la distance éloignant la source de SHH de la région dorsale du tube neural, des données indiquent que des signaux issus de la *roof plate* doivent antagoniser la signalisation SHH afin de permettre la mise en place des populations neuronales dorsales et intermédiaires (pour revue, voir Caspary et Anderson, 2003). Ceci a été premièrement suggéré par le fait que la corde et SHH sont capables d'inhiber l'expression des marqueurs dorsaux Msx, Pax3 et Dsl-1 et la genèse des cellules des crêtes neurales dans des explants de tissu neural dorsal, un effet contrecarré par l'ectoderme non neural et les BMPs (Liem *et al.*, 1995). Plus récemment, la découverte de régulateurs négatifs de la voie de signalisation

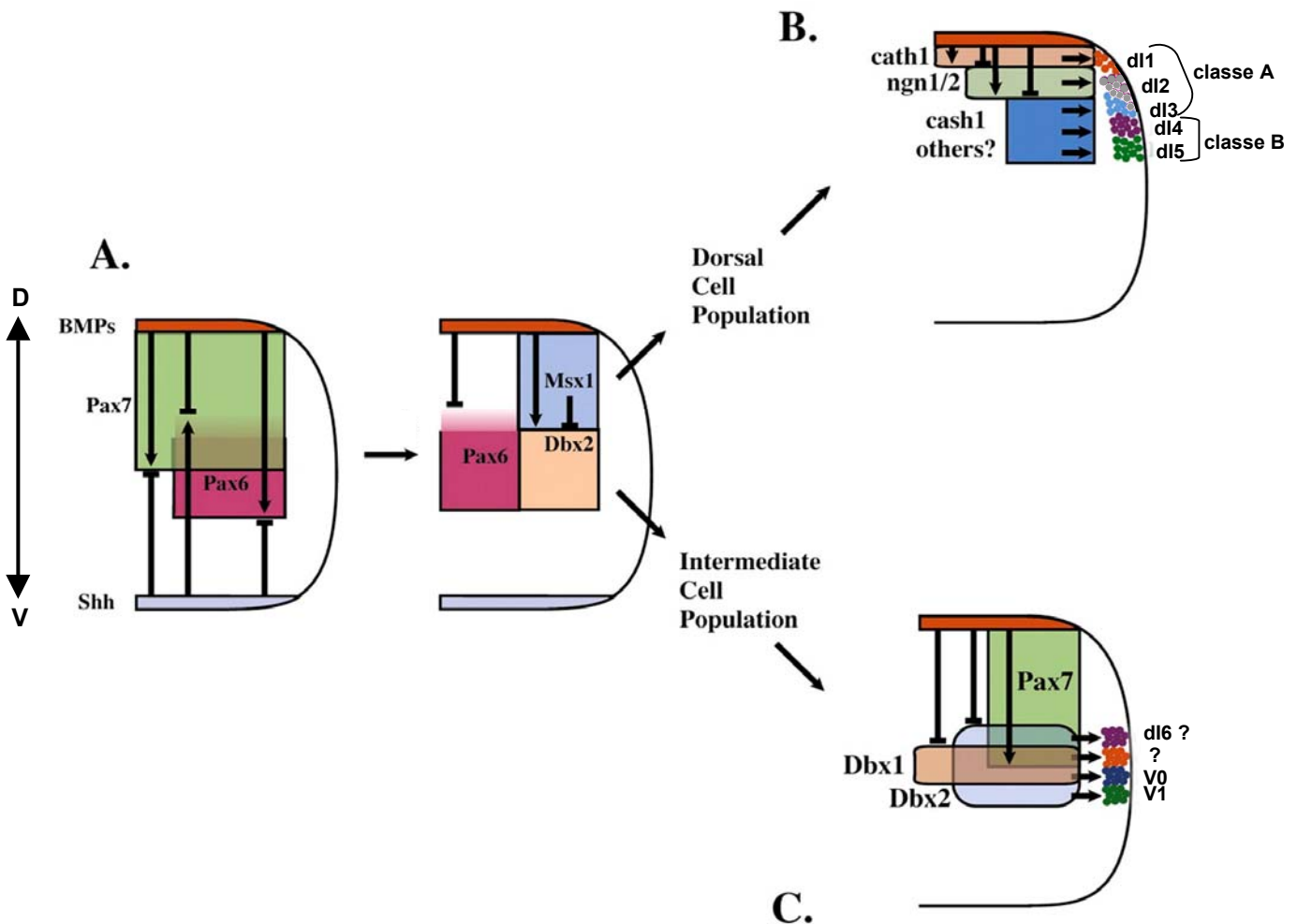


Figure 35 : La signalisation BMP régle plusieurs aspects de la régionalisation dorso-ventrale du tube neural (d'après Timmer *et al.*, 2002). L'axe dorso-ventral est représenté par une double flèche (D : dorsal ; V : ventral). A. L'activité BMP contrôle l'établissement des populations dorsales et intermédiaires *via* la régulation de l'expression de facteurs de transcription à homéodomaine. En coopération avec SHH, les BMPs fixent les frontières des domaines d'expression de Pax6 et Pax7. La limite entre les régions dorsale et intermédiaire, marquée par la frontière dorsale du domaine exprimant de forts niveaux de Pax6, est affinée par l'induction de l'expression de Msx1 par les BMPs, lequel facteur réprime celle de Dbx2. B. La signalisation BMP graduelle régle l'expression de facteurs de transcription à domaine bHLH dans la région dorsale du neuroépithélium. Les limites d'expression des protéines à bHLH sont définies par des niveaux précis d'activité BMP. Les domaines ainsi établis donnent naissance à différents types de neurones dorsaux. C. Les BMPs participent avec SHH à la mise en place des populations intermédiaires. La sensibilité différentielle de Dbx1 et Dbx2 aux activités BMP, dorsalement, et SHH, ventralement, se traduit par l'établissement de 3 domaines dans le neuroépithélium intermédiaire ; l'un coexprime Dbx1 et Dbx2 au centre de l'axe dorso-ventral, et les deux autres, localisés de part et d'autre, que Dbx2. La régulation de l'expression de Pax7 par les BMPs et par SHH permet de distinguer deux populations de progéniteurs Dbx1 et Dbx2 positifs. Chacun des domaines génère un type défini d'interneurones.

SHH, requis pour le développement des populations neuronales intermédiaires et dorsales du tube neural, étaye cette notion (Eggenschwiler *et al.*, 2000 ; Persson *et al.*, 2002).

Les souris *open brain (opb)* présentent une moelle épinière ventralisée -i. e. les cellules dorsales ne se forment pas et les progéniteurs exprimant des marqueurs ventraux occupent des domaines étendus en direction dorsale (Günther *et al.*, 1994 ; Spörle *et al.*, 1996 ; Kasarskis *et al.*, 1998). Le phénotype *opb* est dû à des mutations non sens, naturelles (*opb*¹ ; Günther *et al.*, 1994 ; Spörle *et al.*, 1996) ou induites chimiquement (*opb*² ; Kasarskis *et al.*, 1998), dans le gène *Rab23* qui code une protéine d'une famille de petites GTPases, lesquelles sont impliquées dans le transport des vésicules au cours des processus d'endocytose et de sécrétion (Eggenschwiler *et al.*, 2001). L'analyse des doubles mutants *opb* ; *SHH*^{-/-} indique que *Rab23* est un régulateur négatif de la voie de signalisation SHH (Eggenschwiler *et al.*, 2001), comme pouvait le suggérer l'expansion dorsale de la région exprimant SHH et des domaines de progéniteurs ventraux en l'absence de *Rab23* (Günther *et al.*, 1994 ; Eggenschwiler *et al.*, 2000). Les transcrits *Rab23* sont initialement présents dans l'ensemble du tube neural et leur expression devient ensuite restreinte à la moitié dorsale de l'ébauche neurale (figure 38 ; pour revue, voir Caspary et Anderson, 2003). Cette distribution est préservée chez les mutants *SHH*^{-/-} indiquant que d'autres signaux sont responsables de la présence de *Rab23* dans la région dorsale du tube neural (Eggenschwiler *et al.*, 2001). Ces signaux sont probablement issus de la *roof plate* puisque dans la région caudale des souris *opb*, où cette structure ne se forme pas, l'expression dorsale de *Rab23* est perdue (Günther *et al.*, 1994 ; Eggenschwiler *et al.*, 2000, 2001). Ainsi, une fonction essentielle des facteurs dorsalisants de la *roof plate* tels que les BMPs est d'antagoniser la signalisation SHH au moins *via* l'activation de l'expression de *Rab23*, ce qui pourrait participer au mécanisme par lequel ces facteurs spécifient les cellules neurales dorsales (Eggenschwiler *et al.*, 2001 ; pour revue, voir Caspary et Anderson, 2003).

La fonction inhibitrice de *Gli3*, qui agit en grande partie en réprimant les réponses à SHH, comme le montre le phénotype des souris *SHH*^{-/-} ; *Gli3*^{-/-} (figure 36), est également requise pour la mise en place correcte des populations cellulaires intermédiaires du tube neural (interneurones dorsaux dI4, dI5 et dI6 et ventraux V0, V1 et V2 ; figure 37 ; Persson *et al.*, 2002). En effet, chez les mutants *extra toes*, les progéniteurs des interneurones intermédiaires les plus ventraux (V2, V1, V0 et dI6) sont spécifiés jusque dans des régions plus dorsales que chez des embryons normaux et ce, aux dépens de la genèse des cellules



Figure 36 : Schéma de la régionalisation dorso-ventrale de la moitié ventrale de la moelle épinière chez les souris sauvage et mutantes *SHH*^{-/-} et *SHH*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} (d'après Litingtung et Chiang, 2000b). L'axe dorso-ventral est indiqué par la double flèche (D : dorsal ; V : ventral). Les lignes colorées à droite représentent la distribution étendue des neurones ventraux restaurés. FP : *floor plate*.

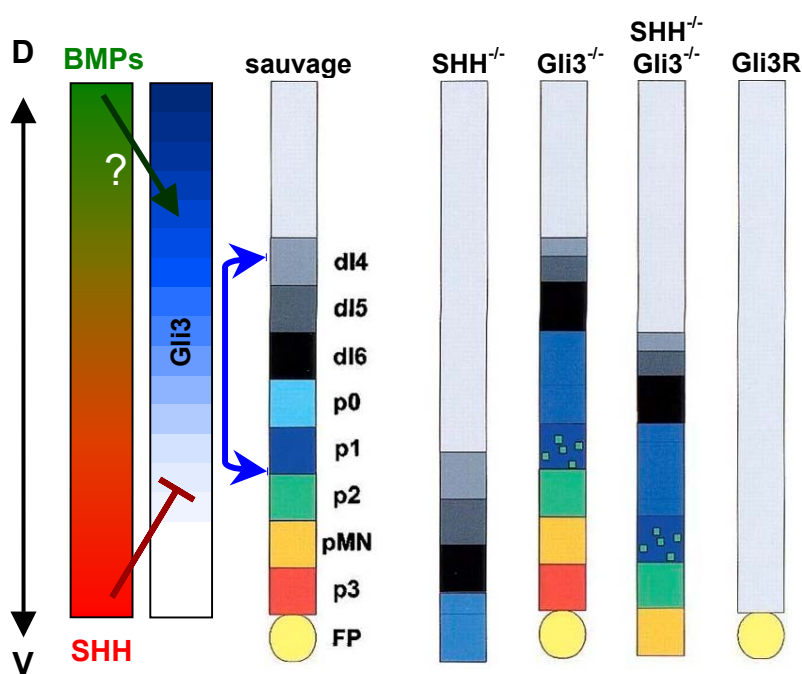


Figure 37 : Schéma montrant les altérations de l'identité des progéniteurs neurax dans les régions intermédiaire et ventrale du neuroépithélium des souris déficientes pour les fonctions SHH et Gli3, séparément et ensemble, et chez des souris exprimant une protéine Gli3 tronquée (Gli3R) qui fonctionne comme la forme inhibitrice endogène (d'après Persson *et al.*, 2002). L'axe dorso-ventral est indiqué par la double flèche noire (D : dorsal ; V : ventral). L'expression de Gli3 selon un gradient croissant de la région ventrale vers la région dorsale du neuroépithélium (dégradé bleu) résulte de l'effet inhibiteur de SHH ventralement (rouge) et peut-être également d'une influence inductrice des BMPs dans les régions dorsale et intermédiaire (vert). La double flèche bleue marque la région du neuroépithélium où la fonction inhibitrice de Gli3 est nécessaire pour la genèse correcte des populations neuronales.

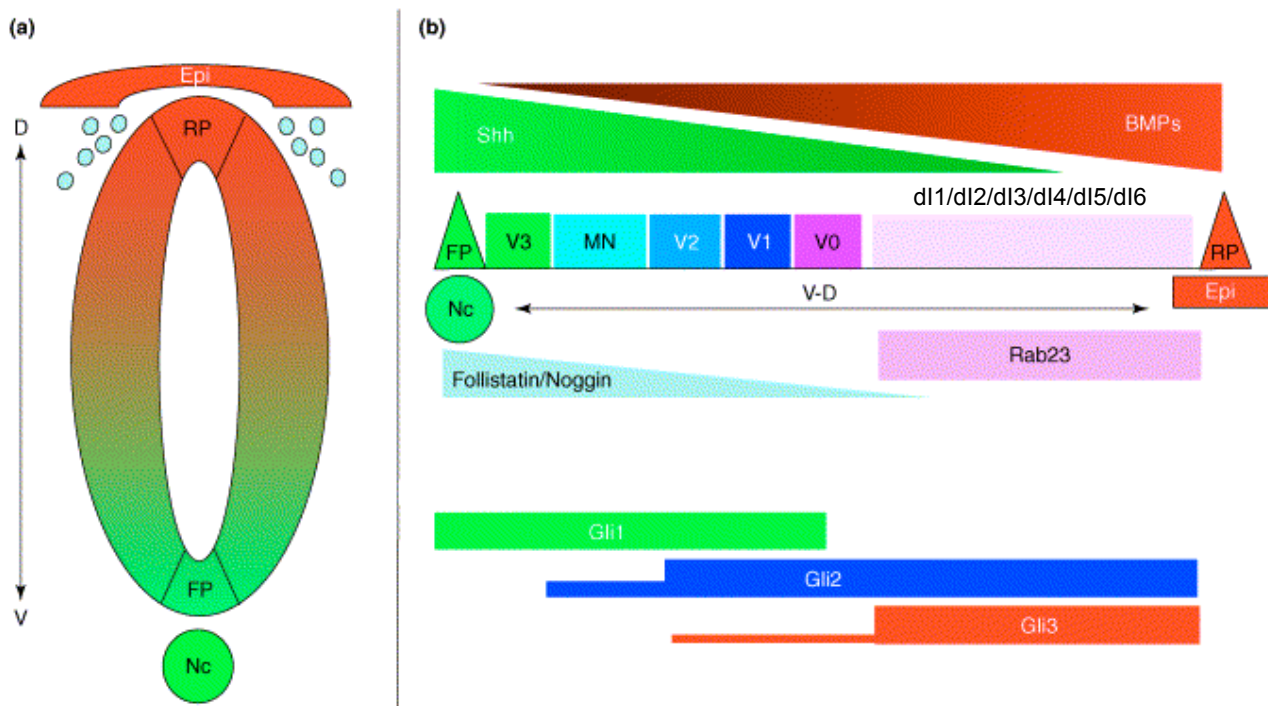


Figure 38 : Régionalisation dorso-ventrale du tube neural (d'après Ruiz i Altaba *et al.*, 2003). L'axe dorso-ventral est indiqué par la double flèche (D : dorsal ; V : ventral). (a) Représentation schématique d'une coupe transversale du tube neural des vertébrés montrant la position des groupes de cellules polaires, la *floor plate* (FP ; vert), ventralement, et la *roof plate* (RP ; rouge), dorsalement. Les ronds bleu clair représentent les cellules des crêtes neurales quittant le tube neural dorsal. L'épiderme (Epi ; rouge) recouvrant la région dorsale du tube neural et la chorde (Nc ; vert), sous la région ventrale, sont également indiqués. La régionalisation dorso-ventrale est évoquée par le dégradé bicolore (rouge à vert). (b) Distribution des types cellulaires neurax sur un diagramme représentant un côté de la moelle épinière étalé à plat. Les domaines d'expression approximatifs des facteurs de transcription Gli, dont l'étendue et les limites évoluent au cours du temps, et la localisation de la GTPase Rab23 sont indiqués. Les activités graduelles, le long de l'axe dorso-ventral, de SHH (vert) et des BMPs (rouge) ainsi qu'un gradient potentiel d'antagonistes des BMPs, Follistatin et Noggin (bleu clair), sont symbolisés par des triangles rectangles.

intermédiaires plus dorsales (dI4 et dI5) qui sont présentes en nombre réduit. Ce phénotype est sauvé par l'expression d'une protéine Gli3 tronquée qui se comporte comme la forme de Gli3 inhibitrice endogène. L'expression de Gli3 selon un gradient croissant de la région ventrale vers la région dorsale résulte de l'effet répresseur de SHH ventralement, comme l'indique son expression uniforme dans le tube neural des mutants *SHH*^{-/-} (Litingtung et Chiang, 2000b ; Park *et al.*, 2000), mais peut-être aussi d'une influence des BMPs. Ces protéines sont en effet capables de maintenir l'expression de Gli3 dans des explants de plaque neurale, ce qui pourrait être un moyen par lequel les BMPs antagonisent la signalisation SHH (Meyer et Roelink, 2003). Enfin, la surexpression d'une forme tronquée de Gli3, qui fonctionne comme un répresseur constitutif de la transcription, dans le tube neural de poulet, entraîne une dorsalisation de ce dernier. Cela se traduit par l'expression de marqueurs dorsaux et intermédiaires tels que Pax7, Pax6, Irx3 et Dbx, jusque dans les régions ventrales du tube neural et par l'extinction de celle des marqueurs ventraux dont Nkx6, Nkx2.2 et Olig2, de manière cellule autonome (Persson *et al.*, 2002 ; Meyer et Roelink, 2003). Les BMPs sont également capables de dorsaliser le tube neural comme en témoignent l'induction de marqueurs dorsaux ventralement, suite à l'activation ectopique de la signalisation BMP (Timmer *et al.*, 2002) et l'atténuation des réponses des cellules neurales ventrales à SHH telles que la répression de l'expression de Pax7 et Pax6 et l'induction de celle de Nkx6.1 et Nkx2.2 (Liem *et al.*, 2000). Sachant que cet antagonisme de la signalisation SHH par les BMPs opère à une étape proximale de la voie SHH (Liem *et al.*, 2000) et que les facteurs de transcription Smad, médiateurs des effets des facteurs de type TGF- β , interagissent physiquement avec des formes de Gli3 dont la partie C-terminale est tronquée (Liu *et al.*, 1998), il est tentant d'imaginer que les BMPs antagonisent les effets de SHH *via* Gli3.

Les résultats des études génétiques mentionnées ci-dessus laissent penser que l'absence de *SHH* et de *Gli3* ou *Rab23* pourrait démasquer la régionalisation du tube neural imposée par les BMPs (et/ou d'autres facteurs dorsalisants) (Persson *et al.*, 2002 ; pour revue, voir Lee et Pfaff, 2001).

Parallèlement à la nécessité d'inhiber la signalisation SHH dans les régions intermédiaire et dorsale de la moelle épinière, antagoniser la signalisation BMP dans sa région ventrale semble également être un prérequis à la spécification correcte des populations neurales ventrales.

D'une part, les BMPs sont capables d'inhiber la genèse des motoneurones induite par la *floor plate* ou la chorde dans des cultures de plaque neurale (Basler *et al.*, 1993) et

celle de la *floor plate in vivo* (Arkell et Beddington, 1997). De plus, ces protéines altèrent la réponse des cellules neurales à SHH : l'addition simultanée de BMPs et de SHH dans des explants de plaque neurale entraîne la formation de neurones plus dorsaux que ceux produits sous l'effet de SHH seule (Liem *et al.*, 2000).

D'autre part, des données récentes montrent que les cellules ventrales du tube neural sont soumises à une activité BMP provenant probablement de la région dorsale de l'ébauche neurale. L'ablation unilatérale de la partie la plus dorsale du tube neural et de l'ectoderme de surface adjacent ainsi que l'insertion d'une feuille d'or d'un côté du tube neural, afin d'empêcher la diffusion de signaux dorsaux, aboutissent à une expansion dorsale de la *floor plate* du côté ipsilatéral (Patten et Placzek, 2002). La follistatine, un antagoniste naturel de certaines BMPs, exprimé dans le mésoderme paraxial et la corde, sensibilise les cellules neurales à l'effet de SHH. Cette protéine entraîne une conversion de l'identité de ces cellules vers un destin plus ventral *in vitro* et *in vivo* (Liem *et al.*, 2000). Un autre antagoniste de l'activité de certains membres de la famille BMP exprimé dans la corde, Chordin, présente un effet similaire *in vivo* (Patten et Placzek, 2002).

Enfin, le fait que SHH seule soit incapable d'induire la formation d'une *floor plate* ectopiquement mais le devient en présence de Chordin, révèle la nécessité d'antagoniser la signalisation BMP afin de permettre aux cellules neurales de répondre à SHH de manière appropriée (Patten et Placzek, 2002). Cette conclusion est supportée par le phénotype des souris dont le gène *Noggin*, qui code un antagoniste de l'activité de certaines BMPs exprimé dans la corde, a été muté expérimentalement. Dans la région caudale de la moelle épinière de ces individus, plusieurs classes de neurones ventraux et la *floor plate* sont absents, malgré une expression normale de SHH dans la corde (McMahon *et al.*, 1998).

B. LE DEVELOPPEMENT DU LIGNAGE OLIGODENDROCYTAIRE

Les données actuelles concernant la mise en place des oligodendrocytes suggèrent que la spécification de ces cellules est gouvernée par des mécanismes comparables à ceux mis en jeu au cours de la genèse des populations neuronales. Avant d'aborder cette question, il est utile de décrire le développement du lignage oligodendrocytaire et, en particulier, les marqueurs des oligodendrocytes.

Les oligodendrocytes sont des cellules très arborisées, localisées le long des trajets axonaux dans le SNC et ont pour rôle premier l'augmentation de l'efficacité de la

conduction de l'influx nerveux grâce à la myélinogenèse (pour une revue très complète sur les oligodendrocytes et la myéline, voir Baumann et Pham-Dinh, 2001).

Les oligodendrocytes, comme les astrocytes et les neurones, dérivent des cellules neuroépithéliales du tube neural. Une fois induites à se différencier selon la voie oligodendrocytaire par des signaux adéquats, ces cellules dites spécifiées puis déterminées sont appelées précurseurs des oligodendrocytes. Elles émergent plusieurs jours (voire plusieurs semaines, chez l'homme) avant le début de la myélinisation (Hajihosseini *et al.*, 1996 ; pour revue, voir Rogister *et al.*, 1999). Les précurseurs donnent progressivement naissance aux progéniteurs, préoligodendrocytes, oligodendrocytes immatures, oligodendrocytes matures non myélinisants et enfin, aux oligodendrocytes matures myélinisants c'est à dire fonctionnels. L'élaboration du lignage à partir du précurseur débute par une période d'intense prolifération suivie de la différenciation qui prend fin lorsque les cellules atteignent le stade d'oligodendrocyte immature. Des étapes de maturation conduisent ensuite l'oligodendrocyte immature à la cellule myélinisante. Ces phases de développement successives sont caractérisées par des modifications de la morphologie des cellules, des propriétés de prolifération et de migration différentes, une dépendance différentielle à des facteurs environnementaux de croissance et l'expression de diverses molécules de surface ou marqueurs (figure 39 ; pour revues, voir Miller, 1996 ; Lubetzki *et al.*, 1997 ; Miller *et al.*, 1999 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001). Parmi ces derniers, certains sont bien adaptés pour déterminer le stade de progression du lignage dans des cultures de cellules oligodendrogiales purifiées mais difficiles à utiliser *in situ* du fait de leur expression dans d'autres types cellulaires *in vivo* (pour revues, voir Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Deng et Poretz, 2003). D'autres sont spécifiques aux oligodendrocytes mais ne définissent pas un stade précis de développement de ces cellules (pour revue voir, Deng et Poretz, 2003). Ces composants doivent être considérés comme des éléments modulaires qui en combinaison avec d'autres génèrent un patron unique (pour revue, voir Baumann et Pham-Dinh, 2001). Le développement du lignage oligodendrocytaire a été essentiellement étudié chez les rongeurs (pour revue, voir Miller *et al.*, 1999).

I. Du précurseur à l'oligodendrocyte différencié

1. Le précurseur oligodendrocytaire

Le précurseur d'oligodendrocyte est une cellule neuroépithéliale qui se divise activement. Son identification dans le temps et dans l'espace est rendue difficile du fait de

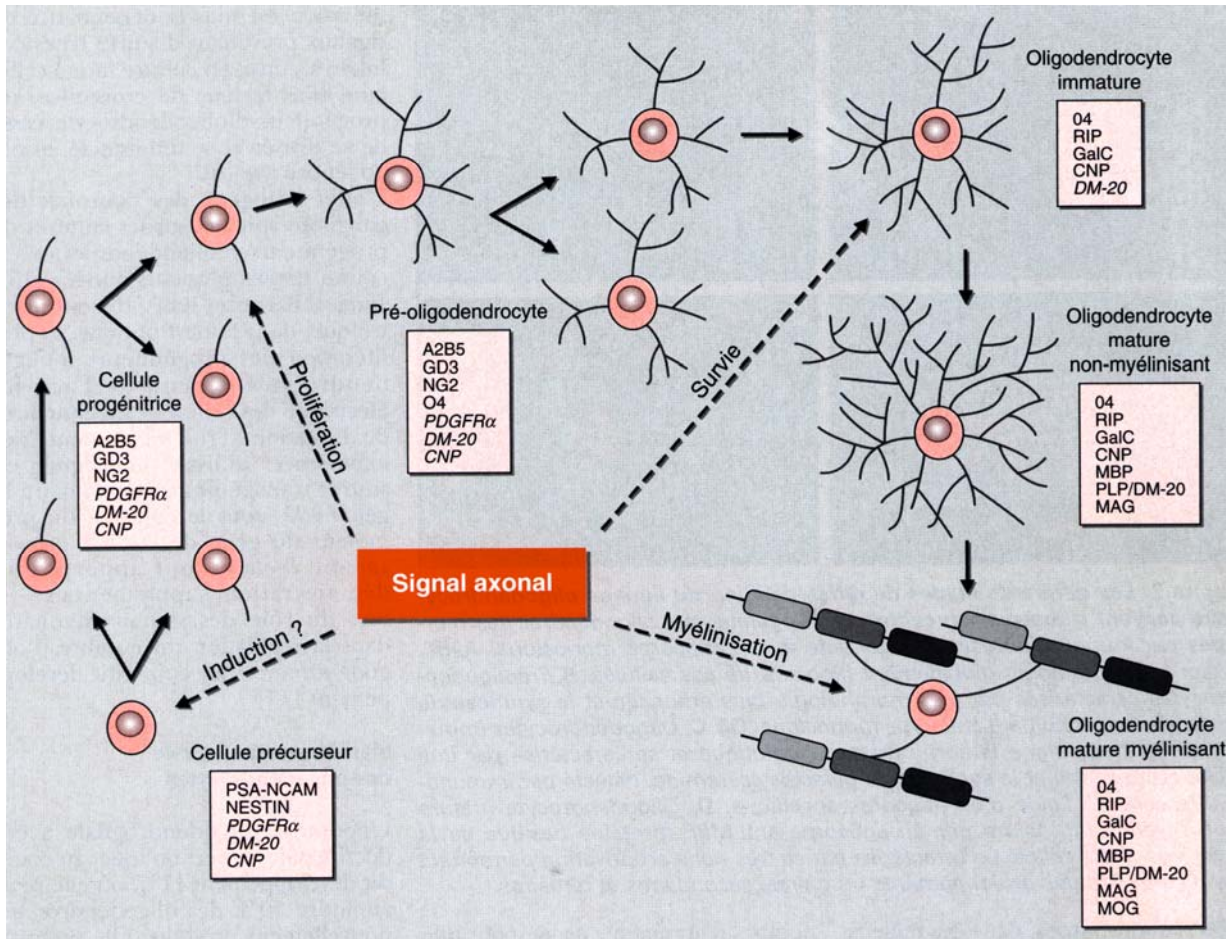


Figure 39 : Représentation schématique des étapes du développement du lignage oligodendrocytaire (Lubetzki et al., 1997). Au cours de la différenciation du lignage oligodendrocytaire, la cellule précurseur devient successivement progénitrice, préoligodendrocyte puis oligodendrocyte immature, cellule postmitotique. Suit la période de maturation avec apparition de l'oligodendrocyte mature non myélinisant puis enfin myélinisant. Chacune de ces étapes se caractérise par des modifications morphologiques et la synthèse de marqueurs indiqués dans les cartouches. Pour certains de ces marqueurs (notés en italique) seul l'ARNm et non la protéine correspondante, a été détecté. Les sites d'action des signaux neuronaux ou axonaux sont indiqués. PDGFR : *platelet-derived growth factor receptor* ; CNP : (2'-3')-cyclique-nucléotide phosphodiesterase ; GalC ; galactosylcéramide ; MBP : protéine basique de la myéline ; MAG : glycoprotéine associée à la myéline ; PLP : protéolipide protéine ; MOG : *myelin/oligodendrocyte protein* ; NCAM : *neural-cell adhesion molecule*. A2B5, GD3, NG2, O4, RIP : anticorps monoclonaux.

l'absence de marqueurs précoces qui soient spécifiques au lignage oligodendrocytaire et propres à cette étape.

L'expression de la PSA-NCAM, forme polysialilée embryonnaire de la N-CAM (*neural cell adhesion molecule*), définit le stade précurseur oligodendrocytaire, en absence de l'expression du ganglioside GD3 (pour revue, voir Baumann et Pham-Dinh, 2001). Ces précurseurs (puis les progéniteurs) sont également caractérisés par l'expression de la nestine, une protéine de filaments intermédiaires très proches des neurofilaments, qui distingue les cellules neuroépithéliales pluripotentes des cellules plus différenciées du tube neural (pour revues, voir Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Deng et Poretz, 2003). L'expression de la PSA-NCAM et de la nestine décline au cours de la différenciation oligodendrocytaire mais aucune des deux n'est spécifique du lignage oligodendrogial (pour revues, voir Lubetzki *et al.*, 1997 ; Deng et Poretz, 2003).

Les travaux de Richardson et collaborateurs ont initialement suggéré que l'expression du message du récepteur α au PDGF (*platelet-derived growth factor*), R α -PDGF, permettait de distinguer les précurseurs oligodendrocytaires des autres cellules neuroépithéliales et définirait ainsi des cellules très précoces du lignage dans la moelle épinière, chez le rat à 14 jours de développement embryonnaire (E14), la souris à E13 et le poulet à E7 (Pringle et Richardson, 1993 ; Pringle *et al.*, 1996 ; pour revues, voir Thomas *et al.*, 2000 ; Woodruff *et al.*, 2001). Ces auteurs ont ensuite montré, chez le rat, que les cellules positives pour le R α -PDGF isolées de cette région (à E17) ou du cerveau (à E19) par immunosélection, se différencient toutes en oligodendrocytes dans des conditions de culture appropriées (Hall *et al.*, 1996 ; Tekki-Kessararis *et al.*, 2001) et qu'inversement, la lyse médiée par le complément de ces cellules dans des cultures de moelle épinière aboutit à l'absence quasi-totale d'oligodendrocytes (Hall *et al.*, 1996). Ces données indiqueraient que toutes les cellules R α -PDGF⁺ de la moelle épinière embryonnaire (de rat) appartiennent au lignage oligodendrocytaire et que la plupart des, sinon tous les, oligodendrocytes se développent à partir de ces cellules. Cependant, dans la mesure où des cellules supposées être des précurseurs neuronaux expriment des ARNm du R α -PDGF, ce marqueur n'est sans doute pas restreint à l'oligodendrogie (Pringle et Richardson, 1993). Une étude récente mentionne l'expression de la protéine R α -PDGF chez la souris, dès E8,5, dans les cellules neuroépithéliales de l'ébauche du tube neural et des neurones en cours de différenciation (Andræ *et al.*, 2001). Le fait que l'expression du R α -PDGF soit difficile à détecter dans les neurones par hybridation *in situ* pourrait indiquer que les

mécanismes de régulation de l'expression du gène *Rα-PDGF* dépendent du type cellulaire (Andræ *et al.*, 2001).

L'équipe de Richardson a également observé l'expression de transcrits de CNP (*2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*), une enzyme de la myéline, dans la même région que celle des messagers *Rα-PDGF* à E14 dans la moelle épinière de rat (Yu *et al.*, 1994). Cet autre marqueur des précurseurs oligodendrocytaires n'est toutefois pas spécifique du lignage ; il est aussi détecté dans le SNP, la peau et, à E12, dans les neurones du SNC et leurs précurseurs (Yu *et al.*, 1994).

Un autre groupe de chercheurs a mis en évidence la présence de transcrits de l'isoforme DM20 de la PLP (*proteolipid protein*), la plus abondante des protéines de la myéline du SNC, dans des cellules neuroépithéliales de la moelle épinière de souris à E14,5 (Timsit *et al.*, 1995). En outre, l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle des séquences régulatrices de *PLP* est restreinte aux cellules oligodendrogiales dans le SNC (Spassky *et al.*, 1998).

Dans la moelle épinière du poulet, les précurseurs les plus précoces des oligodendrocytes peuvent être spécifiquement identifiés au moyen de l'anticorps O4 (Ono *et al.*, 1995), qui reconnaît initialement un antigène non caractérisé et appelé POA (*pro-oligodendroblast antigen*) puis plus tard, un sulfatide (Bansal *et al.*, 1989, 1992 ; Ono *et al.*, 1995). En effet, les cellules O4⁺ immunopurifiées à partir de cette région se différencient toutes en oligodendrocytes et leur destruction médiée par le complément aboutit à l'absence de cellules oligodendrocytaires (Ono *et al.*, 1995 ; Miller *et al.*, 1997). L'expression de O4 apparaît dès E5,5/6 dans le neuroépithélium de la moelle épinière de poulet (Ono *et al.*, 1995 ; Poncet *et al.*, 1996 ; Soula *et al.*, 2001), moment de la détermination des oligodendrocytes dans cette région (Soula *et al.*, 2001), et persiste pendant la maturation cellulaire (Ono *et al.*, 1995). De nombreux travaux indiquent que ce marqueur apparaît plus tardivement chez les rongeurs *-i. e.* au stade préoligodendrocyte (Bansal *et al.*, 1989 ; Miller *et al.*, 1997 ; pour revues, voir Lubetzki *et al.*, 1997 ; Miller *et al.*, 1999 ; Thomas *et al.*, 2000 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Deng et Poretz, 2003). Cependant, une étude récente montre que O4 est exprimé dans la moelle épinière de souris dès E12, c'est à dire aussi précocement que chez le poulet (Wada *et al.*, 2000).

En plus de ces molécules de surface ou cytoplasmiques, des facteurs de transcription exprimés par les précurseurs oligodendrocytaires ont été mis en évidence, mais aucun n'est spécifique au lignage. Dans la moelle épinière de poulet, les cellules neuroépithéliales desquelles les précurseurs des oligodendrocytes dérivent, expriment la

protéine à homéodomaine Nkx2.2 (Xu *et al.*, 2000 ; Soula *et al.*, 2001 ; Fu *et al.*, 2002). Ce facteur est également détecté dans les cellules oligodendrogiales chez la souris mais plus tardivement (Fu *et al.*, 2002). L'expression de Nkx2.2 s'éteint au cours de la différenciation des oligodendrocytes (Xu *et al.*, 2000). Les facteurs de transcription à domaine bHLH Olig1 et Olig2 sont exprimés dans les précurseurs oligodendrocytaires de la moelle épinière embryonnaire de souris, un à deux jours avant les messagers $R\alpha$ -PDGF (Lu *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2000 ; pour revues, voir Wegner, 2001 ; Woodruff *et al.*, 2001). Sox10, un facteur de transcription dont le domaine de liaison à l'ADN est une boîte HMG (*high mobility group*), commence à s'exprimer dans les précurseurs des oligodendrocytes au même moment que Olig2 (Zhou *et al.*, 2000 ; pour revues, voir Wegner, 2001 ; Woodruff *et al.*, 2001). Olig1/2 et Sox10 sont donc considérés, à l'heure actuelle, comme les marqueurs les plus précoces du lignage oligodendrocytaire (Lu *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2000 ; pour revues, voir Wegner, 2001 ; Woodruff *et al.*, 2001). Contrairement à celle du $R\alpha$ -PDGF, leur expression persiste au-delà de la période embryonnaire et est détectée dans les oligodendrocytes du SNC adulte des rongeurs (Lu *et al.*, 2000 ; pour revues, voir Wegner, 2001 ; Woodruff *et al.*, 2001 ; Rowitch *et al.*, 2002).

2. Le progéniteur oligodendrocytaire

Au cours du développement embryonnaire, les précurseurs oligodendrocytaires migrent hors du neuroépithélium, en se différenciant, pour aller se positionner le long des axones qui seront myélinisés (c'est à dire dans la future substance blanche). La transition du stade précurseur au stade progéniteur s'opère dès que ces cellules quittent le neuroépithélium (pour revues, voir Lubetzki *et al.*, 1997 ; Thomas *et al.*, 2000).

Les progéniteurs possèdent des propriétés migratoires et prolifèrent activement durant leur migration (pour revues, voir Lubetzki *et al.*, 1997 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001). Ce sont des cellules bipolaires repérables par l'expression de gangliosides tels que GD3 et ceux reconnus par l'anticorps A2B5, lesquels ne sont pas encore complètement caractérisés (pour revues, voir Lubetzki *et al.*, 1997 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Deng et Poretz, 2003). Ces gangliosides disparaissent au cours du développement ultérieur des oligodendrocytes (pour revues, voir Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Deng et Poretz, 2003). Les anticorps anti-GD3 et A2B5 sont de bons marqueurs en culture mais reconnaissent d'autres types cellulaires dont des neurones *in vivo* (pour revue, voir Baumann et Pham-Dinh, 2001). Les progéniteurs expriment également le protéoglycane à chondroïtine sulfate NG2 (pour revues, voir Lubetzki *et al.*, 1997 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Deng et

Poretz, 2003). C'est à ce stade que les cellules oligodendrogiales acquièrent l'expression de Nkx2.2 chez la souris (Fu *et al.*, 2002).

Des progéniteurs d'oligodendrocytes ont pu être isolés initialement à partir du nerf optique (Raff *et al.*, 1983), puis d'autres régions du SNC en développement, chez le rat nouveau-né (pour revues, voir Rogister *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2000a ; Baumann et Pham-Dinh, 2001). Ces cellules ont permis nombre d'études *in vitro* dont des analyses clonales et la caractérisation des propriétés de croissance et de différenciation des cellules oligodendrogiales (pour revue, voir Rogister *et al.*, 1999). Ce sont des cellules bipotentes qui, en culture, ont la capacité de donner naissance à des oligodendrocytes de manière constitutive et à des astrocytes de type 2 en présence de sérum, ce qui leur a valu l'abréviation de O-2A pour *oligodendrocyte-type 2 astrocyte progenitor cells* (pour revues, voir Miller *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2000a ; Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Deng et Poretz, 2003). Les potentialités de différenciation de ces cellules *in vivo* sont incertaines en absence d'évidence montrant l'existence d'astrocytes de type 2 *in situ* (pour revues, voir Miller *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2000a ; Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Deng et Poretz, 2003).

Un progéniteur oligodendrocytaire aux caractéristiques proches de, mais non superposables à, celles de la cellule O-2A dérivée du nouveau-né a été décrit chez l'adulte (pour revue, voir Lee *et al.*, 2000a). Ce progéniteur O-2A^{adulte} qui est unipolaire, moins motile que son homologue périnatal et qui a une durée de cycle cellulaire supérieure, présente des potentialités de différenciation identiques (pour revue, voir Lee *et al.*, 2000a).

Jusqu'à récemment, le progéniteur O-2A était considéré comme la cellule aux potentialités oligodendrogéniques la plus précoce que l'on puisse directement isoler du SNC. Une nouvelle population de cellules A2B5⁺, restreintes à la genèse de cellules macrogliales, a été identifiée dans la moelle épinière du rat, plus tôt au cours du développement -i. e. à E13,5 (Rao *et al.*, 1998 ; pour revue, voir Lee *et al.*, 2000a). Ces cellules appelées GRP (pour *glial restricted precursor cells*) se distinguent des progéniteurs O-2A par trois propriétés (pour revue, voir Lee *et al.*, 2000a) : (1) elles n'expriment pas le R α -PDGF initialement (Rao *et al.*, 1998), (2) sont tripotentes, pouvant générer des oligodendrocytes et deux types d'astrocytes *in vitro* (Rao *et al.*, 1998) et (3) sont capables de se différencier en oligodendrocytes et en astrocytes *in vivo*, après transplantation dans le cerveau nouveau-né ou adulte (Herrera *et al.*, 2001).

Une étude récente montre que ces GRP peuvent donner naissance à des cellules bipotentes *in vitro*, qui possèdent les caractéristiques antigéniques et de différenciation des progéniteurs O-2A (Gregori *et al.*, 2002). Les auteurs proposent le modèle selon lequel le lignage oligodendrocytaire se développe à partir de cellules neuroépithéliales pluripotentes qui passent par les stades GRP (tripotent), puis O-2A (bipotent) avec une restriction concomitante des potentialités de développement (Gregori *et al.*, 2002).

3. Le préoligodendrocyte et l'oligodendrocyte immature

La genèse du préoligodendrocyte a lieu au cours de la migration des progéniteurs le long des trajets axonaux (pour revues, voir Lubetzki *et al.*, 1997 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001). Cette cellule plus arborisée est moins mobile voire post-migratoire, garde la capacité à se diviser, et, chez les rongeurs, acquiert l'immunoréactivité à l'anticorps O4 (pour revues, voir Lubetzki *et al.*, 1997 ; Miller *et al.*, 1999 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Deng et Poretz, 2003). Les cellules oligodendrocytaires sont marquées par O4 au cours de leur développement ultérieur puisque cet anticorps reconnaît, en plus de l'antigène précoce POA, des sulfatides plus tardifs présents dans les oligodendrocytes et la myéline (pour revue, voir Deng et Poretz, 2003).

Le préoligodendrocyte devient ensuite un oligodendrocyte immature caractérisé par la perte de l'expression des antigènes GD3 et A2B5 et l'apparition de celles de GalC, lipide myélinique majoritaire et de CNP, la plus précoce des protéines spécifiques de la myéline à s'exprimer dans les oligodendrocytes (pour revues, voir Lubetzki *et al.*, 1997 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Deng et Poretz, 2003). Cet oligodendrocyte nouvellement différencié, qui est richement arborisé et a perdu la capacité à se diviser, va ensuite subir des étapes de maturation (pour revue, voir Lubetzki *et al.*, 1997).

4. La maturation oligodendrogliale

La synthèse des protéines myéliniques MBP (*myelin basic protein*), PLP et MAG (*myelin-associated glycoprotein*) débute juste avant la capacité à élaborer la myéline et désigne un oligodendrocyte mature non myélinisant (pour revue, voir Baumann et Pham-Dinh, 2001). L'apparition de ces composés se fait de façon séquentielle *in vitro* comme *in vivo*, au cours du développement (pour revues, voir Lubetzki *et al.*, 1997 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001).

L'expression de MOG (*myelin/oligodendrocyte glycoprotein*), une protéine spécifique de la myéline du SNC uniquement présente chez les mammifères, signe la fin de la maturation oligodendrogliale et l'engagement de la cellule dans la voie de myélinisation (pour revues, voir Lubetzki *et al.*, 1997 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001). Cet oligodendrocyte est dit mature myélinisant c'est à dire fonctionnel. L'étape suivante est l'élaboration des gaines de myéline par enroulement des prolongements oligodendrogliaux autour des axones.

5. Les facteurs de régulation extrinsèques

La myélinisation des axones sur toute leur longueur nécessite que le nombre d'oligodendrocytes généré soit exactement adapté au nombre d'axones à myéliniser (pour revue, voir Miller, 2002). Le nombre d'oligodendrocytes dans une région donnée du SNC dépend de la quantité de progéniteurs qui atteignent cette région, de la capacité de prolifération des cellules oligodendrogliales avant de se différencier et de la mort cellulaire (pour revues, voir Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Deng et Poretz, 2003). Le comportement des différents types de cellules oligodendrogliales élaborés au cours du développement du lignage est influencé par divers facteurs qui, seuls ou en combinaison, régulent leur prolifération, survie, migration et différenciation (pour revues, voir Dubois-Dalcq et Murray, 2000 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Deng et Poretz, 2003). La plupart des données concernant la régulation du développement des oligodendrocytes proviennent d'études réalisées *in vitro* (figure 40).

Parmi les facteurs de croissance impliqués dans ces événements, le PDGF et le bFGF (*basic fibroblast growth factor*), tous deux produits par les neurones et les astrocytes, sont les mieux caractérisés (pour revues, voir Orentas et Miller, 1998 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Miller, 2002 ; Deng et Poretz, 2003).

Le PDGF est un puissant mitogène pour les progéniteurs oligodendrocytaires (qui expriment le R α PDGF), il favorise également leur migration et leur survie (pour revues, voir Orentas et Miller, 1998 ; Dubois-Dalcq et Murray, 2000 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Miller, 2002 ; Deng et Poretz, 2003). Ces effets ont premièrement été montrés grâce à des études *in vitro*, puis confirmés *in vivo* (pour revues, voir Dubois-Dalcq et Murray, 2000 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Miller, 2002). L'inactivation du gène codant le PDGF-A chez la souris aboutit à une réduction sévère du nombre de progéniteurs et

Factor	Response				
	Proliferation	Migration	Survival	Differentiation	Regeneration
PDGF	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑	-
FGF	↑↑	?	?	↓↓↓	↑↑
IGF-1	↑	-	↑↑↑	↑↑	↑↑
NT-3	↑	?	↑↑	↑	?
NT-4/5	↑	?	?	?	?
NGF	↑	?	?	?	?
BDNF	↑	?	↑	↑	↑
NRG	↑↑	?	↑↑	↓↓	?
TGF-β	↓↓	-	?	↑↑	-
LIF/IL-6	-	?	↑↑	-	?
IL-2	↑	?	↓↓	↑	?
CNTF	-	?	↑↑	?	?
TNFα	?	?	↓↓	↓↓	?
INF-γ	↓↓	?	↓	↓	?

Figure 40 : Rôle des facteurs de croissance et cytokines sur la prolifération, migration, survie, différenciation et régénération des cellules du lignage oligodendrocytaire (Deng et Poretz, 2003). Les symboles indiquent le degré relatif auquel un facteur promeut (↑) ou inhibe (↓) le comportement des cellules du lignage. (-) pas d'effet ; (?) non déterminé ou résultats contradictoires. Facteurs de croissance : bFGF (*basic fibroblast growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), IGF-1 (*insulin-like growth factor*). Neurotrophines : NGF (*nerve growth factor*), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), NT-3 (neurotrophine-3), NT-4/5 (neurotrophine-4/5). Neurégulines : [NRG ou GGF (*glial growth factors*)]. Cytokines : TNFα (*tumor necrotic factor-α*), CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), LIF (*leukemia inhibitory factor*), TGF-β (*transforming growth factor-β*), INF-γ (interféron-γ), IL-2 (interleukine-2) et IL-6 (interleukine-6).

d'oligodendrocytes dans la moelle épinière (Fruttiger *et al.*, 1999). Le résultat inverse est obtenu lorsque ce gène est surexprimé dans les neurones (Calver *et al.*, 1998).

Les cellules progénitrices prolifèrent également en réponse au bFGF (encore appelé FGF2) (pour revues, voir Orentas et Miller, 1998 ; Dubois-Dalcq et Murray, 2000 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Miller, 2002). Ce facteur augmente aussi la migration des progéniteurs *in vitro*, ce qui est confirmé par le fait que des progéniteurs exprimant un récepteur dominant négatif au FGF et transplantés *in vivo* ne sont pas capables de migrer (pour revue, voir Dubois-Dalcq et Murray, 2000). Les préoligodendrocytes ont perdu la réponse proliférative au PDGF mais continuent à se multiplier en présence de bFGF, lequel bloque ainsi leur différenciation (pour revues, voir Orentas et Miller, 1998 ; Deng et Poretz, 2003). Les oligodendrocytes différenciés ne sont plus sensibles aux effets mitogènes du PDGF et du bFGF (pour revue, voir Orentas et Miller, 1998).

La combinaison du PDGF et du bFGF maintient les cellules au stade de progéniteurs et cause une prolifération cellulaire à long terme (pour revues, voir Orentas et Miller, 1998 ; Deng et Poretz, 2003 ; Miller, 2002). De façon intéressante, les préoligodendrocytes cultivés en présence de PDGF et de bFGF sont capables de redevenir des progéniteurs (pour revues, voir Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Deng et Poretz, 2003). Inversement, le retrait de ces facteurs permet la différenciation oligodendrocytaire (pour revue, voir Deng et Poretz, 2003). Il est probable que le bFGF allonge la période développementale pendant laquelle les cellules oligodendrogiales sont capables de répondre au PDGF puisqu'il augmente l'expression du R α -PDGF (pour revues, voir Orentas et Miller, 1998 ; Dubois-Dalcq et Murray, 2000 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Miller, 2002 ; Deng et Poretz, 2003).

Au cours de leur progression dans le développement du lignage, les cellules oligodendrogiales présentent des réponses variées au bFGF, vraisemblablement en conséquence de la régulation différentielle de l'expression des transcrits des récepteurs de haute affinité pour ce facteur, FGFR1 à 3 (*FGF receptor-1 to 3*) durant ce processus (Bansal *et al.*, 1996 ; pour revues, voir Orentas et Miller, 1998 ; Dubois-Dalcq et Murray, 2000 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Miller, 2002 ; Deng et Poretz, 2003). L'expression des messagers de FGFR1 augmente au fur et à mesure de la progression dans le lignage, les ARNm de FGFR2 sont présents de manière prédominante dans les oligodendrocytes différenciés alors que ceux de FGFR3 atteignent un pic d'expression dans les préoligodendrocytes (Bansal *et al.*, 1996 ; pour revues, voir Orentas et Miller, 1998 ; Dubois-Dalcq et Murray, 2000 ; Miller, 2002).

L'hormone thyroïdienne T3 (3,3',5-triiodothyronine) est essentielle pour l'oligodendrogenèse et la myélinogenèse ; elle exerce des effets pléiotropiques sur le lignage oligodendrocytaire et agit à plusieurs stades du développement de ces cellules (pour revues, voir Rogister *et al.*, 1999 ; Dubois-Dalcq et Murray, 2000 ; Deng et Poretz, 2003). Elle augmente d'une part, la prolifération des précurseurs et d'autre part, la maturation des oligodendrocytes immatures post-mitotiques en stimulant l'expression de gènes de la myéline (pour revue, voir Deng et Poretz, 2003). Ces actions distinctes sont médiées par différentes isoformes de récepteurs, qui appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires et qui sont exprimées différenciellement durant l'oligodendrogenèse (pour revues, voir Dubois-Dalcq et Murray, 2000 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Deng et Poretz, 2003). Le récepteur α à l'hormone thyroïdienne, THR α (*thyroid hormone receptor α*) est présent dans les progéniteurs puis son expression diminue au moment de la différenciation terminale des oligodendrocytes, ce qui suggère que cette isoforme est plutôt responsable des effets sur la prolifération (pour revue, voir Deng et Poretz, 2003). A l'inverse, le THR β (*thyroid hormone receptor β*) qui est fortement exprimé dans les cellules matures serait associé à la maturation des oligodendrocytes et à la myélinisation (pour revue, voir Deng et Poretz, 2003). A l'appui de cette possibilité, le promoteur des gènes *MBP* et *PLP*, codant les protéines majoritaires de la myéline, présente des éléments de réponse pour le THR β (pour revue, voir Dubois-Dalcq et Murray, 2000).

Comme le PDGF, le GGF (*glial growth factor*), une neuréguline qui a un rôle démontré dans la prolifération et la survie des cellules de Schwann, l'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), le CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) et la NT3 (neurotrophine 3) exercent à la fois des effets mitogènes et anti-apoptotiques sur les cellules oligodendrogiales (pour revues, voir Lubetzki *et al.*, 1997 ; Dubois-Dalcq et Murray, 2000 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001). L'IGF-1, le CNTF et la NT3 ont des effets mitogènes s'ils agissent en combinaison avec d'autres facteurs mitogènes dont le PDGF (pour revues, voir Miller *et al.*, 1999 ; Dubois-Dalcq et Murray, 2000 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001). Le LIF (*leukemia inhibitory factor*) et l'IL-6 (interleukine-6), deux cytokines apparentées au CNTF, sont des facteurs de survie pour les cellules oligodendrocytaires, sans effet sur leur prolifération (pour revues, voir Lubetzki *et al.*, 1997 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001).

L'oligodendrogliose possède une variété de récepteurs/canaux ioniques pour des neurotransmetteurs, dépendant du ligand et du voltage et dont les niveaux d'expression diffèrent d'un stade de l'oligodendrogenèse à un autre (pour revues, voir Baumann et

Pham-Dinh, 2001 ; Deng et Poretz, 2003). Le glutamate fait partie des neurotransmetteurs impliqués dans la formation des oligodendrocytes les mieux caractérisés (pour revues, voir Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Deng et Poretz, 2003). Il intervient notamment dans la régulation de la prolifération et de la différenciation oligodendrocytaires ; c'est un facteur antimitotique pour les précurseurs et progéniteurs dans des cultures de coupes de cervelet (pour revues, voir Dubois-Dalcq et Murray, 2000 ; Baumann et Pham-Dinh, 2001 ; Deng et Poretz, 2003). Le récepteur D3 à la dopamine est exprimé tôt au cours du développement du lignage et absent de la surface des oligodendrocytes matures. Il est impliqué dans la modulation temporelle de la maturation de ces cellules et de l'élaboration de la myéline (pour revue, voir Baumann et Pham-Dinh, 2001). Le récepteur μ aux opioïdes est présent dans les cellules oligodendrogiales précoces et sa stimulation entraîne une réponse proliférative. Le récepteur κ est détecté plus tard, au moment de l'expression de MBP (pour revue, voir Baumann et Pham-Dinh, 2001).

II. Origine embryonnaire et spécification des oligodendrocytes

Si le développement des cellules déterminées selon la voie oligodendrocytaire est relativement bien connu, les étapes initiales de la formation de ce lignage commencent seulement à être élucidées.

Bien que la myélinogenèse soit un phénomène assez tardif dans le développement du SNC, la mise en place des oligodendrocytes débute lors des phases précoces de l'embryogenèse, après la production des motoneurones dans la moelle épinière (Soula *et al.*, 2001). Contrairement aux différentes populations de neurones centraux, localisées de manière stéréotypée selon leur fonction et leur cible, les oligodendrocytes myélinisants sont distribués dans toutes les régions du SNC adulte, de manière prépondérante dans la substance blanche. Des études principalement réalisées dans la région caudale du tube neural indiquent, cependant, que les oligodendrocytes sont générés à partir de régions bien définies du neuroépithélium (Pour revues, voir Miller, 1996, 2002 ; Richardson *et al.*, 1997 ; Orentas et Miller, 1998 ; Woodruff *et al.*, 2001 ; Rowitch *et al.*, 2002).

L'origine restreinte du lignage oligodendrocytaire a été premièrement suggérée par des expériences de culture. En effet, lorsque les régions ventrale et dorsale de la moelle épinière en développement, séparées au niveau du *sulcus limitans*, sont cultivées isolément, seule la partie ventrale est initialement capable de donner naissance à des oligodendrocytes. Ceci a été montré à E14, chez le rat (Warf *et al.*, 1991 ; Hall *et al.*,

1996) ; E12,5, chez la souris (Timsit *et al.*, 1995) ; E4 et E6, chez le poulet (Ono *et al.*, 1995 ; Trousse *et al.*, 1995 ; Pringle *et al.*, 1998). La région dorsale de la moelle épinière acquiert la capacité à générer ces cellules plus tard au cours du développement, c'est à dire à partir de E16, chez le rat (Warf *et al.*, 1991 ; Hall *et al.*, 1996) et entre E6 et E7, chez le poulet (Ono *et al.*, 1995 ; Trousse *et al.*, 1995).

L'apparition des oligodendrocytes dans le tube neural dorsal semble associée à la migration de leurs cellules précurseurs depuis la région ventrale. Dans des cultures de segments de moelle épinière de rat, dont des cellules ventrales ont été colorées au Di-I, des oligodendrocytes marqués sont retrouvés dans les régions dorsales (Warf *et al.*, 1991). Par ailleurs, des expériences d'incorporation de BrdU (5-bromodeoxyuridine), un analogue de thymidine qui s'intègre dans l'ADN des cellules en mitose, suggèrent que les précurseurs oligodendrocytaires en prolifération sont initialement localisés dans la zone ventriculaire ventrale de la moelle épinière, puis que ces cellules et/ou leurs progénies migrent dorsalement et latéralement pour aller peupler la future substance blanche (Noll et Miller, 1993).

L'ensemble de ces données a été précisé par l'étude de l'expression de marqueurs précoces du lignage oligodendrocytaire.

Les cellules exprimant les transcrits du R α -PDGF, qui codent une protéine exprimée par les progéniteurs des oligodendrocytes (Hall *et al.*, 1996), forment deux colonnes longitudinales (une de chaque côté de la lumière du tube neural) restreintes à un petit domaine du neuroépithélium ventral, situé à quelques diamètres cellulaires de la *floor plate* dans la moelle épinière à E14, chez le rat (Pringle et Richardson, 1993), E13, chez la souris et E6,5/7, chez le poulet (Pringle *et al.*, 1996 ; Soula *et al.*, 2001). Puis, des cellules marquées apparaissent dans la moitié ventrale de la zone du manteau. Par la suite, le nombre de ces cellules continue à augmenter et elles sont dispersées dans les zones du manteau et marginale de la moelle épinière, selon un gradient croissant de la région ventrale vers la région dorsale, qui s'atténue pour quasiment disparaître vers E18 chez le rat (Pringle et Richardson, 1993), un profil retrouvé chez la souris et le poulet (Pringle *et al.*, 1996). Ces observations suggèrent que les cellules du lignage oligodendrocytaire proviennent d'une région précise de la zone ventriculaire ventrale, à partir de laquelle elles migrent et prolifèrent pour aller coloniser l'ensemble de la moelle épinière (Pringle et Richardson, 1993 ; Pringle *et al.*, 1996).

Les transcrits de CNP, un autre marqueur des cellules oligodendrogiales, sont exprimés dans la même région que ceux du R α -PDGF dans la moelle épinière de rat à E14 et les cellules marquées migrent ensuite hors du neuroépithélium (Yu *et al.*, 1994).

L'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle des séquences régulatrices de *PLP* qui est restreinte aux cellules oligodendrocytaires dans le SNC et celle des transcrits de l'isoforme DM20 de la PLP marquent deux foyers bilatéraux de cellules neuroépithéliales ventrales de la moelle épinière de souris dès E14,5 (Timsit *et al.*, 1995 ; Spassky *et al.*, 1998). Ensuite, cette population cellulaire augmente, peuplant progressivement les parties ventrale puis dorsale de la moelle épinière (Timsit *et al.*, 1995).

Cependant, les marqueurs *R α -PDGF* et *PLP/DM20* ne sont pas nécessairement présents dans les mêmes territoires, en particulier dans le cerveau, et même lorsqu'ils le sont, comme dans la moelle épinière, il semblerait qu'ils définissent des cellules distinctes. Ainsi, ces données suggèrent que ces deux marqueurs pourraient définir deux lignages oligodendrocytaires (Spassky *et al.*, 1998 ; pour revues, voir Spassky *et al.*, 2000 ; Thomas *et al.*, 2000). L'observation intéressante que dans le tube neural caudal de l'embryon de rat, les messagers *PLP/DM20* s'expriment plus tôt que les ARNm *R α -PDGF* et *CNP* (E12 *versus* E14) et dans une région plus ventrale, c'est à dire jouxtant la *floor plate*, avait déjà laissé entrevoir cette hypothèse (Yu *et al.*, 1994). La possibilité de l'existence de plusieurs lignages d'oligodendrocytes est soutenue par les résultats de diverses études à l'origine de différentes classifications des oligodendrocytes sur des critères morphologiques (nombre de prolongements cytoplasmiques, taille du corps cellulaire, taille et épaisseur de la gaine de myéline formée), ultrastructuraux (densité du cytoplasme, aspect de la chromatine nucléaire) ou biochimiques (pour revue, voir Baumann et Pham-Dinh, 2001). Alternativement, *PLP/DM20* et *R α PDGF* marqueraient tous deux des précurseurs oligodendrocytaires d'un même lignage mais à des stades différents (pour revues, voir Richardson *et al.*, 2000 ; Thomas *et al.*, 2000). A l'appui de cette dernière hypothèse, dans la moelle épinière embryonnaire de poulet, les messagers *PLP/DM20* ne sont pas exprimés dans les cellules neuroépithéliales et apparaissent vers E6,5/7, lorsqu'elles ont migré, dans le parenchyme (Perez Villegas *et al.*, 1999).

Dans la moelle épinière de poulet, les cellules les plus précoces du lignage oligodendrogial peuvent être spécifiquement identifiées au moyen de l'anticorps O4 (Ono *et al.*, 1995), lequel reconnaît un antigène exprimé au moment de la spécification des précurseurs oligodendrocytaires, ce qui en fait un marqueur de la détermination de ces cellules chez cet organisme (Soula *et al.*, 2001). L'immunoréactivité O4 apparaît

initialement vers E5,5 dans deux foyers de la zone ventriculaire ventrale, symétriques par rapport à la lumière du tube neural et près de la *floor plate* (Soula *et al.*, 2001). Rapidement après, vers E6, O4 est également exprimé dans des cellules du manteau s'étendant en direction de la zone marginale ventrale (Ono *et al.*, 1995 ; Poncet *et al.*, 1996). A E6,5, les cellules O4 positives sont localisées dans le même domaine du neuroépithélium ventral que les cellules exprimant les transcrits *Rα-PDGF* (Soula *et al.*, 2001). Aux stades suivants, le nombre de cellules O4⁺ s'accroît et elles peuplent des régions progressivement plus dorsales des zones du manteau et marginale de la moelle épinière en développement (Ono *et al.*, 1995 ; Poncet *et al.*, 1996).

Utilisant les différents marqueurs mentionnés ci-dessus, un patron similaire d'oligodendrogenèse a été décrit dans la moelle épinière embryonnaire chez l'homme, suggérant une origine ventrale des oligodendrocytes, restreinte à un petit domaine neuroépithélial proche de la *floor plate*, conservée entre les espèces (Hajihosseini *et al.*, 1996).

En contraste avec les données énoncées ci-dessus, des expériences de transplantations isotopiques et isochroniques de différentes portions de tube neural d'embryons de caille chez le poulet et réciproquement, où la production et la migration des oligodendrocytes de caille peuvent être spécifiquement suivies, suggèrent que ces cellules proviennent à la fois des régions ventrale et dorsale de la moelle épinière *in vivo* (Cameron-Curry et Le Douarin, 1995). Toutefois, une analyse de chimères caille-poulet similaires indique, au contraire, que les oligodendrocytes dérivent exclusivement du neuroépithélium ventral confirmant la majorité des informations obtenues quant à l'origine du lignage oligodendrogial dans la moelle épinière (Pringle *et al.*, 1998). Les raisons des différences majeures de résultats obtenus par ces deux séries d'expérience pourtant identiques restent encore obscures.

La spécification des oligodendrocytes, comme celle de nombreux autres types cellulaires ventraux de la moelle épinière, dépend de l'influence de la corde et/ou de la *floor plate*, ce qui explique, au moins partiellement, la restriction ventrale du domaine d'émergence de ce lignage. En effet, des segments de corde ou de *floor plate* entraînent la différenciation de nombreux oligodendrocytes dans des cultures d'explants de tube neural dorsal (Trousse *et al.*, 1995 ; Orentas et Miller, 1996). En outre, la greffe d'un segment de corde ou de *floor plate* contre la région dorsale de la moelle épinière en développement aboutit à l'induction de précurseurs oligodendrocytaires, arrangés en deux foyers bilatéraux dans le neuroépithélium dorsal *in vivo* (Orentas et Miller, 1996 ; Poncet *et al.*, 1996).

Enfin, l'analyse de la moelle épinière de souris mutantes hétérozygotes *Danforth's short tail* (Sd^{+}) qui présentent une corde et une *floor plate* discontinues dans la région caudale, montre que les précurseurs oligodendrocytaires ne se forment pas en absence de ces structures axiales ventrales (Pringle *et al.*, 1996). L'effet inducteur du développement des oligodendrocytes de la corde ou de la *floor plate* est reproduit par la protéine SHH dans le tube neural dorsal en culture (Poncet *et al.*, 1996 ; Orentas *et al.*, 1999). De plus, SHH est nécessaire pour initier la détermination des oligodendrocytes puisque l'inhibition de son activité au moyen d'anticorps bloquants, juste avant cet événement qui débute entre E5 et E5,5 dans la moelle épinière de poulet, empêche l'émergence des précurseurs oligodendrocytaires *in vitro* et *in vivo* (Orentas *et al.*, 1999 ; Soula *et al.*, 2001).

Des analyses de la distribution des précurseurs des oligodendrocytes par rapport aux domaines d'expression des facteurs de transcription à homéodomaine dans le neuroépithélium ventral, qui sont établis sous l'effet de doses précises de SHH, ont été réalisées afin de comprendre le mode d'action de cette protéine morphogène dans la spécification du lignage oligodendrocytaire.

Ces études ont montré que dans la moelle épinière de l'embryon de poulet, les précurseurs oligodendrogliaux sont localisés dans le domaine exprimant la protéine Nkx2.2, limité dorsalement, par la région Pax6 positive et ventralement, par le territoire de la *floor plate* (Xu *et al.*, 2000 ; Soula *et al.*, 2001). En outre, ces précurseurs expriment Nkx2.2 et cette expression persiste au cours de leur progression dans le lignage, jusqu'à ce qu'ils se différencient (Xu *et al.*, 2000 ; Soula *et al.*, 2001).

En revanche, dans la moelle épinière embryonnaire de souris, les précurseurs des oligodendrocytes sont situés dans la partie la plus ventrale du domaine exprimant le facteur de transcription Pax6 (Sun *et al.*, 1998), lequel génère les motoneurones plus tôt au cours du développement (Ericson *et al.*, 1997 ; Tanabe *et al.*, 1998).

Ces observations ont conduit à suggérer d'une part, une origine des oligodendrocytes différentes chez les oiseaux et les mammifères (Xu *et al.*, 2000 ; Soula *et al.*, 2001) et d'autre part, l'existence de précurseurs communs aux motoneurones et aux oligodendrocytes chez ces derniers (Sun *et al.*, 1998 ; pour revue, voir Richardson *et al.*, 2000). Cette seconde hypothèse est étayée par le fait que les concentrations de SHH requises pour l'induction des motoneurones et des oligodendrocytes sont similaires (Pringle *et al.*, 1996 ; Orentas *et al.*, 1999) et par l'expression de deux nouveaux facteurs de transcription à bHLH identifiés en rapport avec le développement oligodendrogliol, Olig1 et Olig2, dans le domaine neuroépithélial qui génère les motoneurones puis les

oligodendrocytes, au moment de la spécification de ces deux types cellulaires (Lu *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2000). De plus, Olig2 est nécessaire à la genèse des motoneurones et des oligodendrocytes (voir ci-après).

Une étude détaillée de l'expression de Olig2, de Nkx2.2 et d'autres marqueurs des précurseurs oligodendrocytaires dans la moelle épinière embryonnaire de poulet a permis de concilier l'idée que ces cellules dérivent exclusivement du domaine Nkx2.2 positif (Soula *et al.*, 2001) avec l'idée d'une origine commune d'au moins une fraction des oligodendrocytes et des motoneurones. Elle montre que, juste avant la détermination des oligodendrocytes, le domaine d'expression de Nkx2.2 s'étend dorsalement dans la région Olig2 positive, qui a précédemment généré les motoneurones et suggère l'existence de deux populations de précurseurs oligodendrocytaires (Zhou *et al.*, 2001). L'une coexprime Olig2 et Nkx2.2 et dérive de la région d'origine des motoneurones ; l'autre, uniquement Nkx2.2 et émerge plus ventralement (Zhou *et al.*, 2001). Une étude similaire menée chez le poulet et la souris confirme ces données et les étend au modèle murin, à la différence près qu'au moins pendant les phases précoces de l'oligodendrogenèse chez la souris, les cellules oligodendrocytaires originaires du domaine exprimant Olig2 acquièrent l'expression de Nkx2.2 seulement après qu'elles aient quitté le neuroépithélium (figure 41 ; Fu *et al.*, 2002). D'autre part, chez le poulet, les progéniteurs oligodendrogliaux issus du domaine Nkx2.2⁺/Olig2⁻ commencent à exprimer Olig2 au cours de leur migration et des résultats obtenus *in vitro* suggèrent qu'il pourrait en être de même chez la souris (Fu *et al.*, 2002). Il semblerait ainsi que malgré une origine spatiale distincte, les deux populations de précurseurs oligodendrocytaires donnent naissance à des progéniteurs qui finissent par coexprimer Olig2 et Nkx2.2 à la fois chez le poulet et la souris mais que pour les progéniteurs issus du domaine Olig2⁺, cet événement n'a pas lieu au même moment chez ces deux espèces (Fu *et al.*, 2002).

Des études de perte de fonction des gènes *Nkx2.2* et *Olig2* indiquent un rôle des facteurs de transcription qu'ils codent dans le développement oligodendrogliol. Dans la moelle épinière des souris dont le gène *Nkx2.2* est invalidé, des oligodendrocytes différenciés apparaissent en nombre très réduit et de manière retardée, suggérant que la protéine Nkx2.2 est requise pour la différenciation et/ou la maturation des oligodendrocytes mais pas pour leur détermination (Qi *et al.*, 2001). Les conséquences de l'inactivation de la fonction du gène *Olig2* (associée à celle du gène *Olig1*, ou non) montrent en revanche qu'elle est essentielle à la spécification des motoneurones et des oligodendrocytes dans la moelle épinière chez la souris (Lu *et al.*, 2002 ; Takebayashi *et*

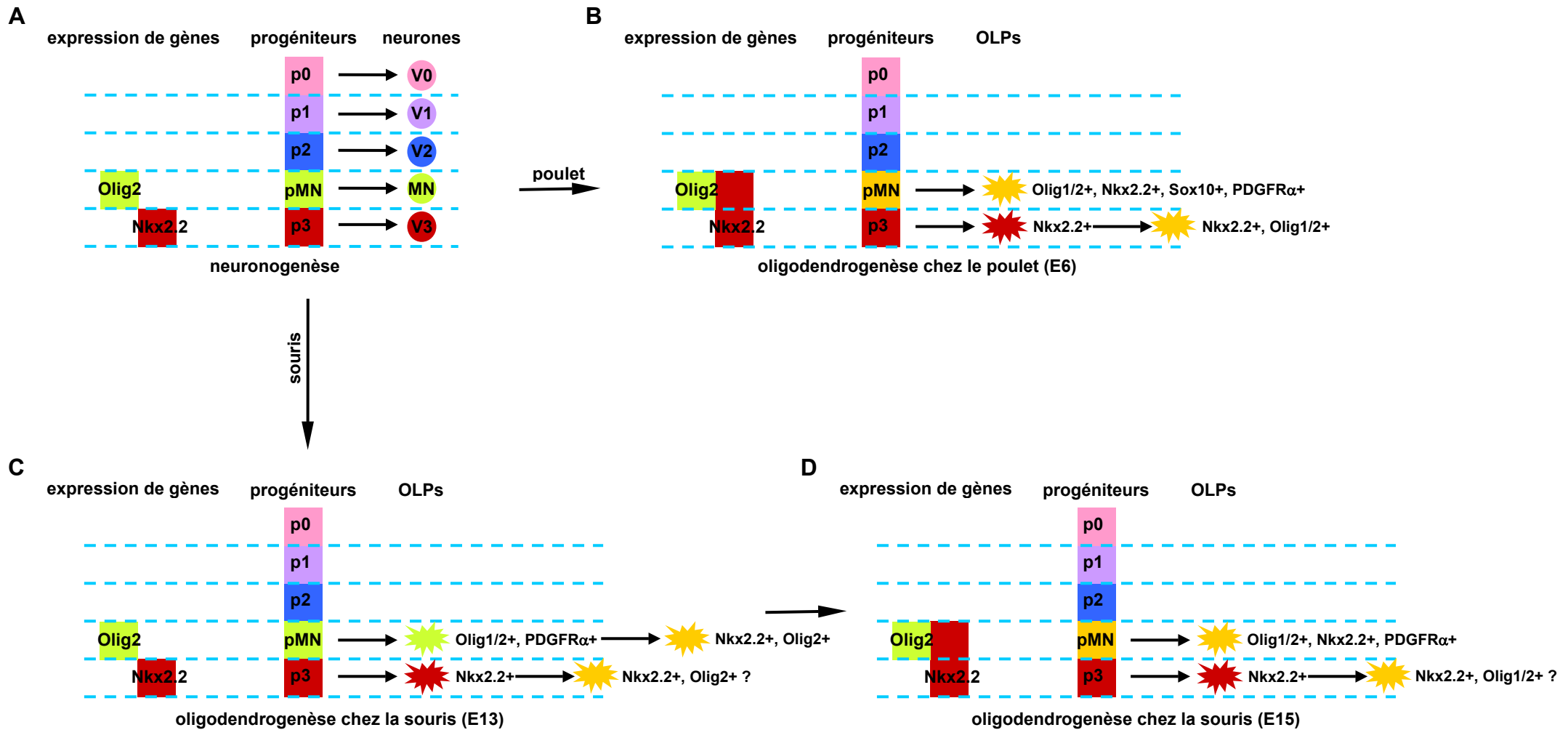


Figure 41 : Modèle hypothétique de l'origine et profil dynamique d'expression génique des progéniteurs oligodendrocytaires dans la moelle épinière embryonnaire (Fu *et al.*, 2002). (A) Au cours de la neuronogenèse, le neuroépithélium ventral peut être divisé en 5 domaines produisant chacun une classe distincte d'interneurones ventraux (V0-V3) ou des motoneurones (MN). A ce stade, les gènes *Olig2* et *Nkx2.2* sont exprimés dans les domaines adjacents pMN et p3, respectivement. (B) Oligodendrogenèse chez le poulet. Les progéniteurs oligodendrocytaires (OLPs) peuvent être générés à partir des domaines pMN et p3. Juste avant l'émergence des OLPs du pMN, l'expression de *Nkx2.2* s'étend dorsalement dans le domaine pMN. Les OLPs provenant du domaine p3 semblent acquérir l'expression de *Olig2* avant la fin de leur différenciation. (C, D) Oligodendrogenèse chez la souris. Au début de l'oligodendrogenèse, l'expression de *Nkx2.2* n'est pas étendue dorsalement et les OLPs *Olig2*⁺ acquièrent l'expression de *Nkx2.2* après la migration. Aux stades plus tardifs de l'oligodendrogenèse, l'expression de *Nkx2.2* est activée dans le domaine pMN, comme dans la moelle épinière du poulet. Les OLPs *Nkx2.2*⁺ dérivant du domaine p3 pourraient également acquérir l'expression de *Olig2* après la migration.

al., 2002 ; Zhou et Anderson, 2002) ; la même conclusion a été obtenue chez le poisson zèbre (Park *et al.*, 2002). D'autre part, le début de l'expression des gènes de la myéline dans la moelle épinière suit dans le temps et dans l'espace la coexpression de Olig2 et de Nkx2.2 dans les cellules oligodendrocytaires, chez la souris comme le poulet. De plus, la réduction de l'expression de l'un ou de l'autre de ces facteurs *in vitro* entraîne une diminution de l'expression de ces gènes de myéline et de la différenciation oligodendrocytaire et ces effets sont plus marqués dans le cas de l'inhibition simultanée de l'expression de Nkx2.2 et Olig2, indiquant un effet coopératif de ces deux facteurs plus tard au cours du développement oligodendroglial (Fu *et al.*, 2002).

Des expériences de gain de fonction réalisées dans la moelle épinière de poulet indiquent que l'expression forcée de Olig2, qui est capable d'induire la formation de motoneurones ectopiques (Novitch *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 2001), n'est pas suffisante pour le développement des oligodendrocytes sauf lorsque le transgène est exprimé dans la région Nkx2.2 positive (Zhou *et al.*, 2001). Confirmant cette donnée, la coexpression de Nkx2.2 et de Olig2 entraîne la formation prématurée et ectopique d'oligodendrocytes, ce qui n'est pas le cas de l'expression de Nkx2.2 seul (Sun *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 2001). Par ailleurs, la protéine SHH qui est nécessaire et suffisante pour la spécification des oligodendrocytes (Orentas *et al.*, 1999 ; Soula *et al.*, 2001) et l'expression des facteurs Nkx2.2 (Ericson *et al.*, 1997) et Olig2 (Lu *et al.*, 2000), l'est également pour induire leur coexpression dans le neuroépithélium ventral, au moment de la détermination oligodendrogliale dans la moelle épinière de poulet (Agius *et al.*, 2004). Ainsi, l'expression simultanée de Olig2 et de Nkx2.2 serait suffisante pour la formation des précurseurs oligodendrocytaires et des oligodendrocytes différenciés chez le poulet.

Etant donné que les activités de SHH et de Olig2 sont requises continuellement pour la spécification des motoneurones puis des oligodendrocytes, il existe probablement d'autres facteurs contrôlant la transition entre la production des motoneurones et celle des oligodendrocytes.

Par exemple, l'expression de Ngn2, qui collabore avec Olig2 pour la genèse des motoneurones (Novitch *et al.*, 2001) et celle de Ngn1, s'éteignent dans le neuroépithélium ventral à la fin de cet événement, ce qui est essentiel pour la formation des oligodendrocytes (figure 42 ; Zhou *et al.*, 2001). De plus, l'expression forcée de Olig2 n'est capable en elle-même d'induire le développement de précurseurs oligodendrocytaires que lorsque l'expression de Ngn1 et Ngn2 est inhibée ou quand Nkx2.2, qui réprime l'expression de Ngn1 et Ngn2, est présent (Zhou *et al.*, 2001). Cependant, comme

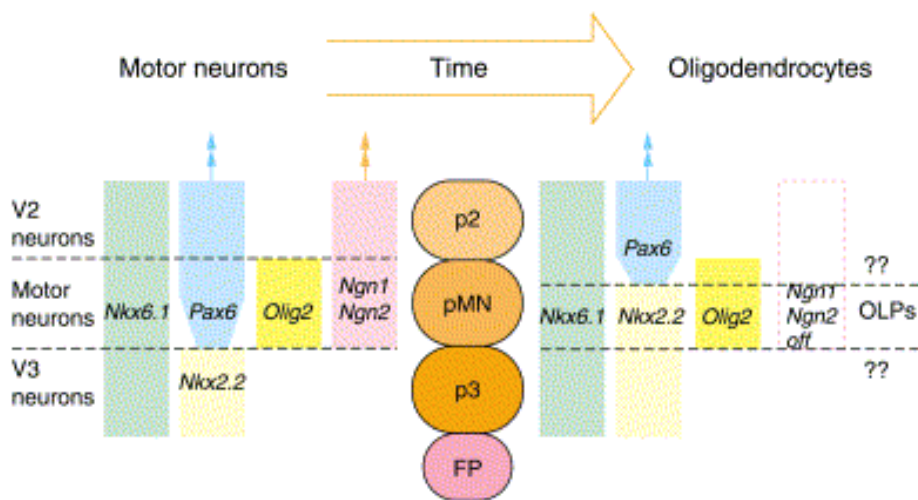


Figure 42 : La transition neuronogénèse-oligodendrogenèse dans la moelle épinière de poulet (Kessar *et al.*, 2001). Tôt au cours du développement (E3-E5), les motoneurones sont générés à partir du domaine pMN sous l'influence de Olig2 qui agit en coopération avec Ngn1 et Ngn2. Plus tard (E6-E7), l'expression de Ngn1 et Ngn2 s'éteint dans cette région du neuroépithélium. Par la suite, le domaine d'expression de Nkx2.2 s'étend dorsalement dans une partie du domaine Olig2 positif, provoquant un changement dans l'activité de Olig2 dans la région de chevauchement, qui génère alors des progéniteurs oligodendrocytaires (OLPs).

l'extinction de l'expression des Ngns se produit avant la coexpression de Olig2 et de Nkx2.2 dans le neuroépithélium ventral, le facteur responsable de l'initiation de ce processus et donc potentiellement impliqué dans la spécification des oligodendrocytes reste à découvrir.

Par ailleurs, un travail tout récent indique que chez les souris déficientes pour la fonction du facteur de transcription Sox9 dans le SNC, la spécification des oligodendrocytes est sévèrement inhibée alors que le nombre de motoneurones est significativement accru dans la moelle épinière (Stolt *et al.*, 2003). Parallèlement, le nombre d'astrocytes de la substance grise est considérablement réduit et celui des interneurones V2, augmenté (Stolt *et al.*, 2003). Considérant l'origine commune des motoneurones et d'une population d'oligodendrocytes, d'une part, et celle des interneurones V2 et d'au moins une fraction d'astrocytes de la substance grise (Zhou et Anderson, 2002 ; Pringle *et al.*, 2003), d'autre part, ces résultats suggèrent fortement que Sox9 est impliqué dans la régulation de la transition entre la neuronogenèse et la gliogenèse dans au moins deux domaines neuroépithéliaux de la moelle épinière en développement (figure 43 ; Stolt *et al.*, 2003). A l'appui de cette possibilité, l'expression ectopique de Sox9 dans des neurones en culture aboutit à l'expression de marqueurs oligodendrocytaires et astrocytaires (Stolt *et al.*, 2003). D'un autre côté, Olig2 est requis pour l'oligodendrogenèse et la double mutation des gènes *Olig1* et *Olig2* aboutit au développement d'astrocytes à partir du domaine du neuroépithélium qui aurait, normalement, généré d'abord des motoneurones, puis des oligodendrocytes (figure 44A ; Takebayashi *et al.*, 2002 ; Zhou et Anderson, 2002). Selon l'ensemble de ces données, il est tentant d'imaginer que la combinaison des facteurs Sox9 et Olig2 est essentielle à la spécification des oligodendrocytes, Sox9 conférant l'identité gliale et Olig2, l'identité du sous-type glial (figure 44B ; Stolt *et al.*, 2003).

III. Objectif de l'étude

Bien qu'il soit quasi-unanimement admis que la région dorsale de la moelle épinière ne génère pas d'oligodendrocytes en situation normale, ce territoire du SNC contient en fait des cellules compétentes à adopter le destin oligodendrogial. Rappelons ici que des greffes de segments de chorde ou de *floor plate* contre la région dorsale de la moelle épinière embryonnaire aboutissent à l'émergence de foyers bilatéraux de précurseurs oligodendrocytaires dans le neuroépithélium dorsal *in vivo* (Orentas et Miller, 1996 ; Poncet *et al.*, 1996). En outre, la protéine SHH qui est nécessaire et suffisante pour

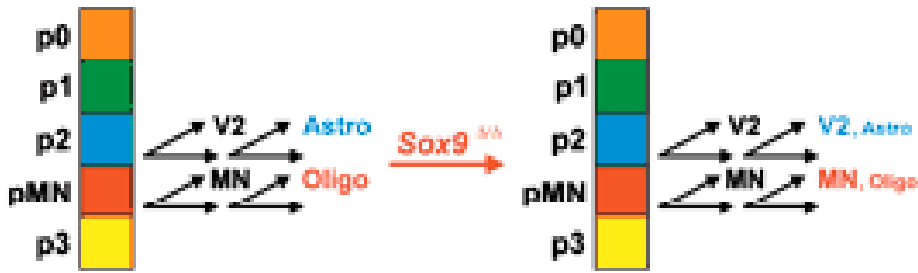


Figure 43 : Schéma illustrant la fonction de Sox9 dans les domaines p2 (qui génère les interneurons V2 et au moins une fraction d'astrocytes) et pMN (produisant les motoneurons puis une population d'oligodendrocytes) de la moelle épinière embryonnaire (Stolt *et al.*, 2003). Au lieu de passer de la neuronogenèse (interneurons V2 et motoneurons) à la gliogenèse (astrocytes et oligodendrocytes), les 2 domaines continuent à produire principalement des neurones du sous-type approprié, en absence de la fonction de Sox9.

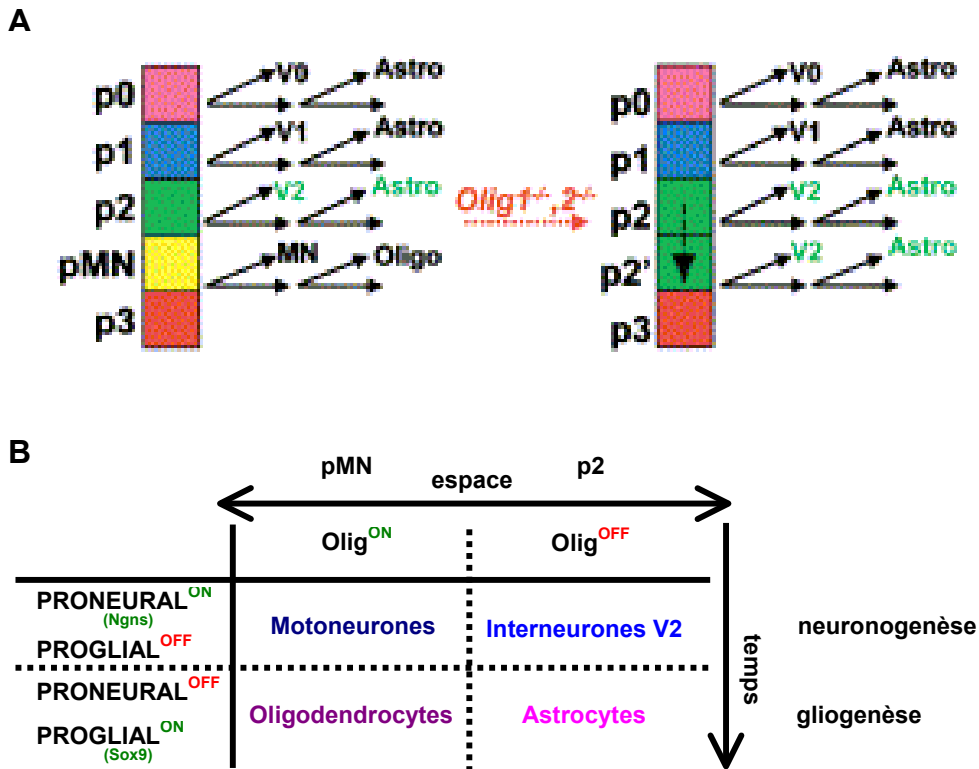


Figure 44 : Les facteurs de transcription Olig contrôlent l'identité des neurones et des cellules gliales dérivant du même domaine de progéniteurs (d'après Zhou et Anderson, 2002). A. Schéma illustrant la fonction de Olig1 et de Olig2 dans la moelle épinière embryonnaire. B. L'expression régulée dans le temps et dans l'espace des facteurs Olig, de protéines proneurales et de protéines progliales pourrait constituer un code conférant aux cellules neuroépithéliales une identité neuronale particulière (motoneurons ou interneurons V2) ou gliale bien précise (astrocytes ou oligodendrocytes).

l'oligodendrogenèse ventrale (Orentas *et al.*, 1999 ; Soula *et al.*, 2001), est également capable d'induire le développement d'oligodendrocytes dans des cultures d'explants de tube neural dorsal (Orentas et Miller, 1996 ; Poncet *et al.*, 1996 ; Orentas *et al.*, 1999). L'absence d'oligodendrogenèse dorsale pourrait alors s'expliquer par un manque de signaux inducteurs et/ou par l'existence de facteurs inhibiteurs de ce processus en région dorsale.

Parmi les molécules susceptibles de réguler négativement le développement des oligodendrocytes, plusieurs membres de la famille des BMPs sont exprimés dans et autour de la partie dorsale de la moelle épinière embryonnaire où ils sont requis pour la spécification des interneurons les plus dorsaux (pour revue, voir Lee et Jessell, 1999 ; voir aussi page 38 et suivantes). De plus, les BMPs ont des effets opposés à ceux de la protéine SHH dans la genèse des neurones de la moelle épinière et participent avec SHH au positionnement correct, le long de l'axe dorso-ventral, des différents groupes de précurseurs des populations neuronales intermédiaires et ventrales (voir pages 43 et 44).

Par ailleurs et surtout, de nombreuses études réalisées chez les rongeurs montrent que les BMPs sont capables d'orienter le destin de progéniteurs neuraux *in vitro*. En particulier, elles inhibent le développement des oligodendrocytes et stimulent celui des astrocytes dans des cultures de progéniteurs neuraux multipotents *-i. e.* pouvant générer les trois classes cellulaires majeures du SNC- issus de différentes régions du cerveau, à différents stades du développement (Gross *et al.*, 1996 ; Mabie *et al.*, 1999 ; Zhu *et al.*, 1999a, 1999b ; Mehler *et al.*, 2000). De manière similaire, le traitement *in vitro* de progéniteurs gliaux bipotents du cerveau de rat nouveau-né, appelés cellules O-2A, par les BMPs supprime leur différenciation constitutive selon la voie oligodendrocytaire et active leur différenciation en astrocytes (Mabie *et al.*, 1997). Ces données ont été très récemment confirmées *in vivo*. En effet, l'analyse de souris transgéniques surexprimant BMP4 dans le système nerveux indique une diminution de la densité des oligodendrocytes, avec une augmentation concomitante de celle des astrocytes, dans plusieurs régions du cerveau (Gomes *et al.*, 2003). D'autre part, SHH exerce plusieurs effets opposés à ceux des BMPs sur le développement des progéniteurs neuraux du cerveau en culture ; notamment, cette protéine stimule leur différenciation en oligodendrocytes (Zhu *et al.*, 1999b). Elle inhibe, de plus, les effets suppresseur du développement oligodendrogial et inducteur de la différenciation astrogliale des BMPs dans ces cultures (Zhu *et al.*, 1999b).

L'ensemble de ces données nous a conduits à tester si les BMPs pouvaient contribuer à la restriction ventrale de la spécification des oligodendrocytes en réprimant ce processus dorsalement, dans la moelle épinière de l'embryon de poulet.

Dans un premier temps, nous avons recherché un effet inhibiteur des BMPs sur le développement des oligodendrocytes dans la région ventrale de la moelle épinière *in vitro*, puis *in vivo*. Les résultats obtenus nous ont amenés à étudier les conséquences d'une réduction de la signalisation BMP dans la moelle épinière sur la spécification des oligodendrocytes *in vivo*. Nous avons ensuite examiné si les BMPs étaient capables d'antagoniser l'effet de la protéine SHH sur l'induction du développement des oligodendrocytes *in vitro*. Enfin, nous avons analysé l'effet des BMPs *in vitro*, en présence de SHH ou non, et *in vivo* sur l'expression de facteurs de transcription localisés dans et autour du domaine oligodendrogénique et impliqués dans le développement des oligodendrocytes.

RESULTATS

A. EFFETS DES PROTEINES BMPs SUR LE DEVELOPPEMENT DES OLIGODENDROCYTES

I. Analyses *in vitro*

1. Cultures de plaque neurale médiane (E1,5)

Avant l'initiation de ces travaux de thèse, l'étude des potentialités oligodendrogéniques des différentes régions de la plaque neurale de poulet avait été réalisée au laboratoire. Cette analyse a montré que seule la région médiane de la plaque neurale contenant la *floor plate* pouvait générer des oligodendrocytes, détectés à l'aide des anticorps O4 et OL1 (Poncet *et al.*, 1996). Des résultats similaires ont été obtenus dans l'équipe de W. D. Richardson qui a analysé la production d'oligodendrocytes dans les différents territoires de la plaque neurale chez la caille et le poulet avec d'autres marqueurs (Pringle *et al.*, 1996). La plaque neurale médiane constitue donc un modèle permettant de tester des signaux capables de réprimer le développement des oligodendrocytes *in vitro*.

Notre première démarche a consisté à rechercher un éventuel effet inhibiteur de la protéine BMP4 sur l'oligodendrogenèse dans la plaque neurale médiane, chez l'embryon de poulet. Pour cela, la partie médiane de la plaque neurale caudale, qui s'étend du dernier somite formé au nœud de Hensen, est prélevée sur des embryons de stade HH 10 (E1,5) (figure 74). L'explant comprenant la *floor plate* est divisé transversalement en deux ou trois fragments de sorte que les explants obtenus présentent la même organisation cellulaire selon le futur axe dorso-ventral. Ces derniers sont mis en culture en présence de différentes concentrations de protéine BMP4 recombinante humaine ou en absence de la protéine, sur un gel de collagène. Les cellules du lignage oligodendrocytaire sont mises en évidence par immunohistochimie à l'aide des anticorps O4 et OL1 au bout de 7 et 11 jours de culture, respectivement.

Les explants de plaque neurale médiane cultivés en absence de protéine BMP4 développent de nombreuses cellules du lignage oligodendrocytaire (figure 45A et C), comme précédemment décrit (Poncet *et al.*, 1996 ; Pringle *et al.*, 1996). Ainsi, on dénombre de 750 à 3200 cellules O4⁺ par culture (figure 45E). Une culture témoin a été analysée au moyen de l'anticorps OL1, qui reconnaît des oligodendrocytes plus différenciés, dans laquelle on compte environ 150 cellules positives (figure 45F).

En présence de protéine BMP4, le nombre de cellules du lignage oligodendrocytaire, détectées par les marqueurs précoce (O4) et tardif (OL1), est très

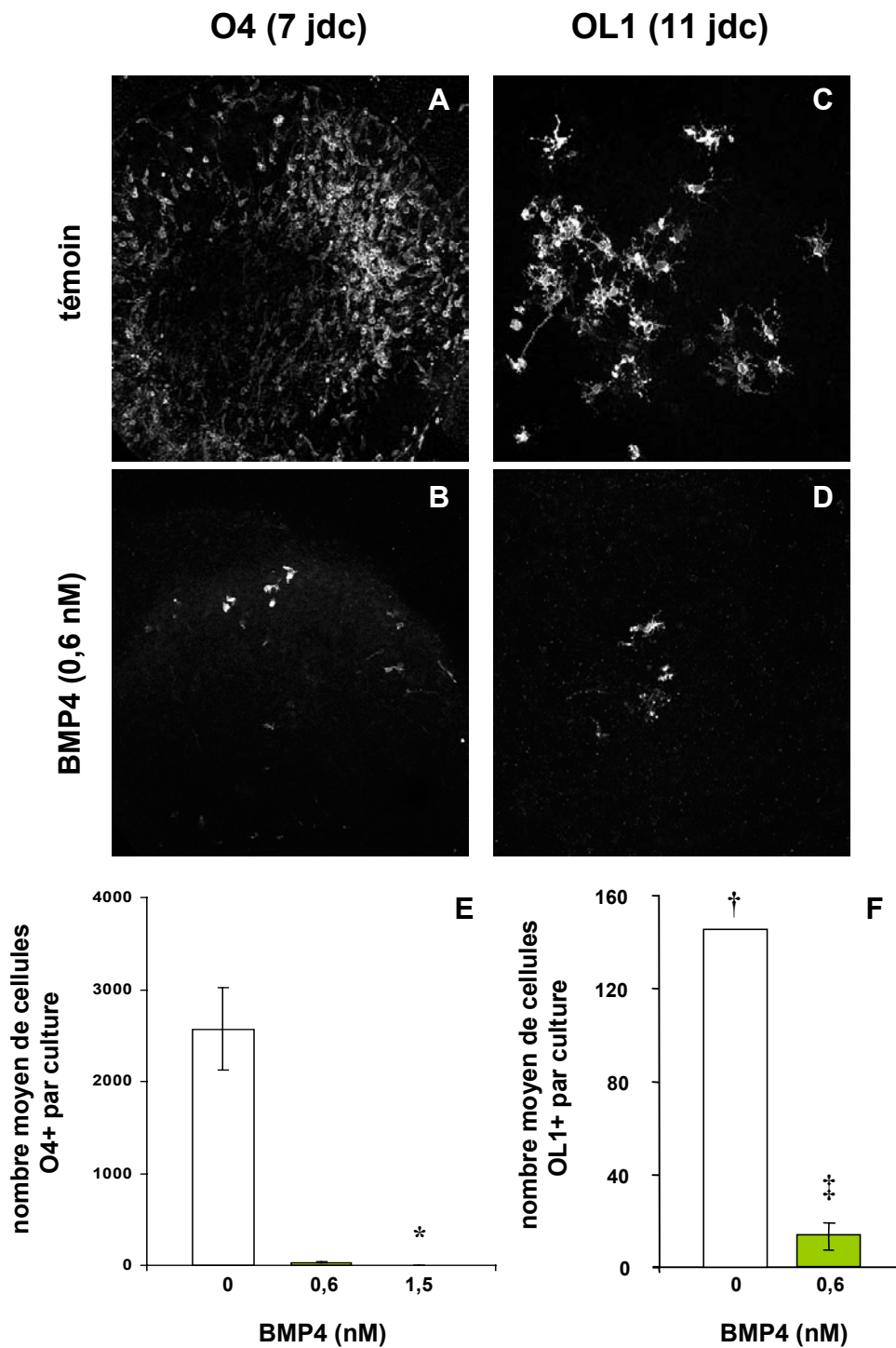


Figure 45 : Effet de la protéine BMP4 sur l'oligodendrogenèse dans les cultures d'explants de plaque neurale médiane de stade HH 10 (E1,5). A, B : Immunofluorescence de l'antigène O4 après 7 jours de culture (jdc) en absence (A) et en présence (B) de traitement. C, D : Détection des oligodendrocytes différenciés à l'aide de l'anticorps OL1 après 11 jdc dans les explants non traités (C) et traités (D). Les cultures témoins produisent de nombreuses cellules oligodendrocytaires (A, C). Sous l'effet de BMP4, les explants génèrent très peu de cellules positives (B, D). E, F : Quantification de l'effet inhibiteur de BMP4. E : Représentation graphique du nombre moyen de cellules O4+ par culture (n = 5 sauf * où n = 6 cultures effectuées lors de 3 expériences indépendantes) en fonction de la concentration de BMP4, après 7 jours *in vitro*. F : Histogramme montrant le nombre moyen d'oligodendrocytes différenciés (OL1+) par culture, en absence et en présence de BMP4 à la concentration de 0,6 nM, après 11 jours *in vitro*. † Une seule culture témoin a pu être analysée ; ‡ n = 3 cultures réalisées au cours d'une expérience unique. Les barres d'erreur représentent l'écart standard à la moyenne ou esm.

fortement diminué (figure 45B et D). Cette inhibition de l'oligodendrogenèse dépend de la dose de BMP4 administrée (figures 45E et 47). Elle est déjà quasi totale à la concentration de 0,6 nM puisqu'on ne compte plus que 30 cellules O4⁺ par culture en moyenne (figures 45E et 47). A cette dose, le nombre de cellules OL1⁺ est divisé par 10 par rapport au témoin (figure 45F). Lorsque la protéine BMP4 est appliquée à la concentration de 1,5 nM, l'inhibition est totale. En effet, les explants ne présentent quasiment pas d'immunoréactivité et l'on compte moins de 3 cellules O4⁺ par culture (figures 45E et 47).

Ces premiers résultats montrent que **la protéine BMP4 est capable d'exercer un effet inhibiteur sur le développement des oligodendrocytes dans la plaque neurale médiane de stade HH 10 (E1,5)** contenant la *floor plate*, de manière dose-dépendante.

Afin de compléter ces informations, l'effet de BMP4 a également été examiné sur le développement d'autres types cellulaires neuraux ventraux. Parmi ceux-ci, les motoneurones se développent dans des cultures de plaque neurale médiane de stade HH 10 (E1,5) (Yamada *et al.*, 1993).

Des explants de plaque neurale médiane ont été traités par la protéine BMP4, selon le protocole de l'expérience précédente. Après 2 jours de culture, les explants ont été soumis à une immunodétection à l'aide d'un anticorps qui reconnaît le facteur de transcription Islet-1, nécessaire à la différenciation des motoneurones (Pfaff *et al.*, 1996) et spécifique de cette population cellulaire dans la région ventrale de l'ébauche neurale (Ericson *et al.*, 1992). Les cultures effectuées en présence de BMP4 à la concentration de 0,6 nM ont également été marquées par un anticorps anti-HNF-3 β afin de détecter les noyaux des cellules de *floor plate*.

Les cultures témoins présentent un nombre important de motoneurones et de cellules de *floor plate* (figure 46A). Le nombre moyen de noyaux Islet-1⁺ est d'environ 800 par culture (figure 46C).

En présence de BMP4 et pour toutes les doses testées, la quantité de motoneurones est considérablement diminuée dans les explants de plaque neurale médiane (figure 46B et C). Ici, encore, l'inhibition du développement des motoneurones dépend de la concentration de la protéine BMP4 utilisée (figures 46C et 47). A la concentration de 0,6 nM, le nombre moyen de cellules Islet-1⁺ est réduit à 55 par culture (figure 46C) et la densité de cellules de *floor plate* est comparable à celle appréciée dans les explants témoins (figure 46B). A la dose maximale testée (1,5 nM), seulement une trentaine de motoneurones se développent par culture (figure 46C).

Figure 46

Islet-1/HNF-3 β (2 jdc)

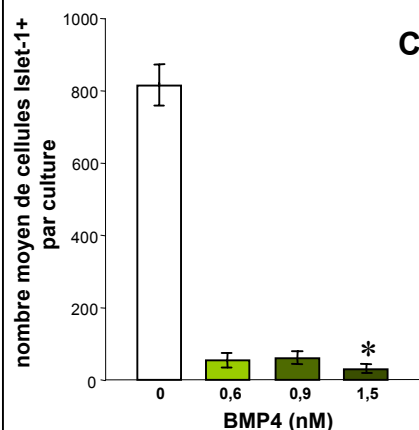
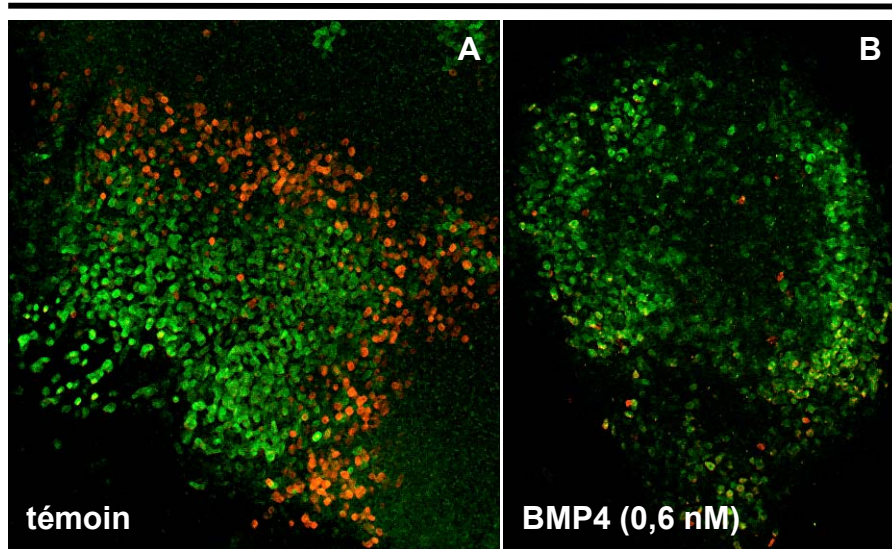


Figure 47

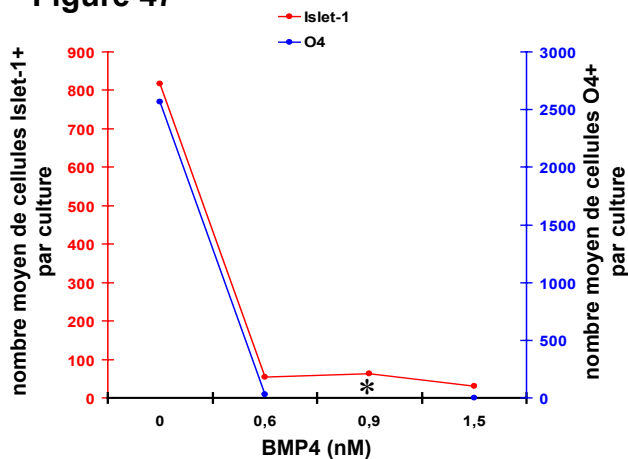


Figure 46 : Effet de la protéine BMP4 sur le développement des motoneurones et des cellules de *floor plate* dans les cultures d'explants de plaque neurale médiane de stade HH 10 (E1,5). A, B : Double immunodétection des motoneurones avec un anticorps anti-Islet-1 (rhodamine, rouge) et des cellules de *floor plate* avec un anticorps anti-HNF-3 β (fluorescéine, vert) après 2 jours de culture (jdc). A : Les explants témoins présentent des noyaux Islet-1+ et des noyaux HNF3 β + en nombre important. B : En présence de 0,6 nM de BMP4, les explants contiennent un faible nombre de noyaux Islet-1+ et une densité de noyaux HNF3 β + similaire à celle du témoin. C : Quantification de l'effet inhibiteur de BMP4 sur le développement des motoneurones : représentation graphique du nombre moyen de noyaux Islet-1+ par culture (n = 2 sauf * où n = 3) en fonction de la concentration de BMP4, après 2 jours *in vitro*. Les résultats proviennent d'une seule expérience. Les barres d'erreur représentent l'écart standard à la moyenne ou esm.

Figure 47 : Dose-réponses de l'effet inhibiteur de la protéine BMP4 sur le développement des oligodendrocytes et des motoneurones dans les cultures d'explants de plaque neurale médiane de stade HH 10 (E1,5). Représentations graphiques du nombre moyen de noyaux Islet-1+ par culture (n = au moins 2 ; une expérience unique) après 2 jours *in vitro* (courbe rouge) et du nombre moyen de cellules O4+ par culture (n = au moins 5 ; 3 expériences indépendantes) après 7 jours *in vitro* (courbe bleue), en fonction de la concentration de BMP4. * Le nombre moyen de cellules O4+ par culture pour la concentration de 0,9 nM de BMP4 n'a pas été déterminé.

Ces expériences indiquent que **BMP4 empêche la genèse des motoneurones**, de manière dose-dépendante, **dans la plaque neurale médiane de stade HH 10 (E1,5)**. Le traitement des explants n'affecte pas le développement des cellules de *floor plate*, indiquant que l'inhibition de la genèse des oligodendrocytes et des motoneurones n'est pas un effet secondaire dû à la perte des cellules de *floor plate*.

A la dose de 0,6 nM, la protéine BMP4 abolit la production de la plupart des oligodendrocytes et des motoneurones. Nous avons donc choisi de poursuivre nos travaux en utilisant cette concentration.

Les BMPs, également appelées protéines dorsalisantes, sont exprimées dans la région dorsale du tube neural où elles participent à la genèse des différents types cellulaires dorsaux (Liem *et al.*, 1997). Ces protéines augmentent le niveau d'expression de l'ARNm du facteur de transcription Pax3, marqueur de cellules neurales dorsales, dans des explants de plaque neurale médiane (Liem *et al.*, 1995). Il nous est donc apparu intéressant d'examiner si l'inhibition du développement des deux types cellulaires ventraux (oligodendrocytes et motoneurones) que nous observions dans nos cultures pouvait résulter d'une dorsalisation des tissus. Des explants de plaque neurale médiane cultivés pendant 2 jours en présence de protéine BMP4 (0,6 nM) ou non, ont été soumis à une hybridation *in situ* avec une sonde ADNc *Pax3*.

Dans les cultures contrôles, les explants de plaque neurale médiane présentent des zones exprimant le messager de Pax3 (figure 48A). En présence de la protéine BMP4, le niveau d'expression de ce transcrit est fortement accru dans les explants (figure 48B).

Ces observations confirment celles de Liem et collaborateurs (Liem *et al.*, 1995) et montrent que l'absence des oligodendrocytes et des motoneurones dans la plaque neurale médiane traitée par la protéine BMP4 s'accompagne d'une dorsalisation du tissu neural au stade HH 10 (E1,5) et serait donc vraisemblablement la conséquence d'une réorientation de l'identité des cellules ainsi traitées, réorientation encore possible à ce stade précoce du développement de la future moelle épinière (E1,5).

2. Cultures de tissu neural ventral (E3,5 à E4,5)

Au laboratoire, parallèlement à la réalisation de ces premières expériences, le stade de détermination des précurseurs des oligodendrocytes a été défini dans le tube neural chez le poulet. Des fragments de neuroépithélium ventral ont été isolés à différents stades du développement embryonnaire afin d'étudier leur capacité intrinsèque à générer des

ARNm Pax3 (2 jdc)

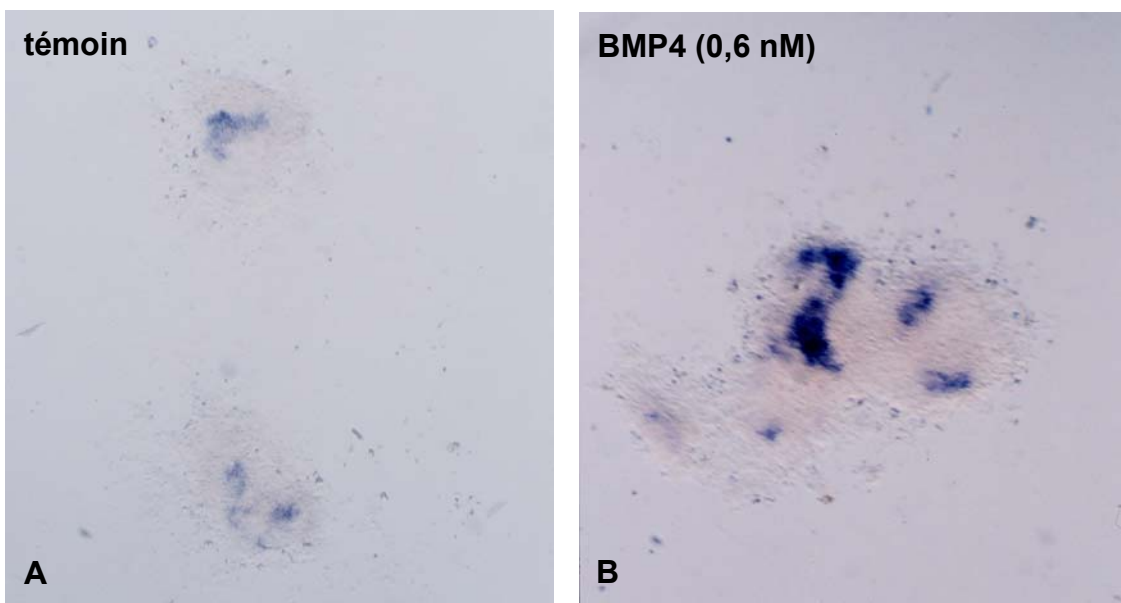


Figure 48 : Effet de la protéine BMP4 (0,6 nM) sur l'expression de l'ARNm du facteur de transcription Pax3 dans les cultures d'explants de plaque neurale médiane de stade HH 10 (E1,5). A, B : Détection de l'expression du transcrite de Pax3 par hybridation *in situ* après 2 jours de culture (jdc) en absence (A) et en présence (B) de traitement. Les explants contrôles expriment le messenger de Pax3 (A). Les explants traités présentent un niveau d'expression accru du messenger de Pax3 (B).

oligodendrocytes en culture. Dans ces conditions, les cellules neuroépithéliales ne sont plus soumises à l'influence inductrice et inhibitrice potentielle des tissus environnants et se différencient selon leur potentialités propres, acquises *in vivo* avant leur isolation. Il résulte de cette étude que le neuroépithélium ventral devient capable de développer des cellules O4⁺ de manière autonome à partir de 5,5 jours de développement (stade HH 28) (Soula *et al.*, 2001). La détermination des cellules neuroépithéliales selon la voie de différenciation oligodendrocytaire est donc un événement embryonnaire relativement tardif et bien postérieur au stade que nous avons précédemment étudié. Il était donc essentiel de savoir si les BMPs, encore exprimées dans le tube neural dorsal à E5 (Nifuji *et al.*, 1997), étaient capables d'affecter le développement des oligodendrocytes juste avant la détermination de leurs cellules précurseurs.

Nous avons utilisé deux approches différentes pour répondre à cette question. L'effet de la protéine BMP4 sur l'oligodendrogenèse a été étudié d'une part, dans des explants de plaque neurale médiane isolés à E1,5 (stade HH 10) et développés artificiellement pendant 3 jours *in vitro* (le traitement par la protéine BMP4 est donc effectué à un stade équivalant à E4,5) et d'autre part, dans du tissu neural ventral directement prélevé entre E3,5 et E4,5 (stades HH 22 à 25). L'étude des potentialités oligodendrogéniques de la moelle épinière de poulet au cours du développement, menée au laboratoire, a montré qu'à ces stades, la région ventrale du tube neural produisait des oligodendrocytes massivement *in vitro* (Trousse *et al.*, 1995). Les mêmes données ont été obtenues dans d'autres équipes, chez le poulet (Ono *et al.*, 1995), la souris (Timsit *et al.*, 1995) et le rat (Warf *et al.*, 1991).

En ce qui concerne la première approche, les tissus sont préparés comme pour les expériences réalisées à E1,5 (stade HH 10) excepté que la protéine BMP4 (0,6 nM) est ajoutée après 3 jours de culture. Les explants se développent 4 jours supplémentaires afin d'atteindre 7 jours *in vitro*, moment auquel les cellules oligodendrocytaires expriment l'antigène O4. Dans le second type d'expériences, la région du tube neural qui s'étend du niveau cervical au niveau lombaire est prélevée sur des embryons de stades HH 22 à 25 (E3,5 à E4,5). La région dorsale du tube neural est écartée et la région ventrale est découpée en explants, lesquels sont cultivés en présence de différentes concentrations de protéine BMP4 pendant 7 jours. La production des cellules oligodendrocytaires est analysée dans nos deux types d'explants (plaque neurale médiane et tube neural ventral) par immunodétection avec l'anticorps O4.

Les explants témoins de plaque neurale médiane génèrent des cellules O4⁺ comme dans les expériences initiales (figure 49A). On compte un nombre moyen de 120 cellules O4⁺ par culture (figure 49E). L'ajout de protéine BMP4 (0,6 nM) à un stade correspondant à E4,5 dans ces cultures entraîne une réduction considérable du nombre de cellules oligodendrocytaires (figure 49C). Les explants ainsi traités produisent environ 6 cellules O4⁺ par culture, en moyenne, soit 20 fois moins que les explants contrôles (figure 49E).

De nombreux oligodendrocytes se développent également dans les explants de tube neural ventral (figure 49B). Le nombre moyen de cellules O4⁺ est d'environ 650 par culture (figure 49F). Ici encore, en présence de protéine BMP4, la production des cellules O4⁺ est diminuée de manière dose-dépendante et ce, dès la concentration de 0,15 nM (figure 50). A la dose de 0,6 nM de protéine BMP4, la densité de cellules immunoréactives est très nettement réduite par rapport aux cultures témoins (figure 49D) et l'on dénombre approximativement 200 cellules oligodendrocytaires par culture (figure 49F).

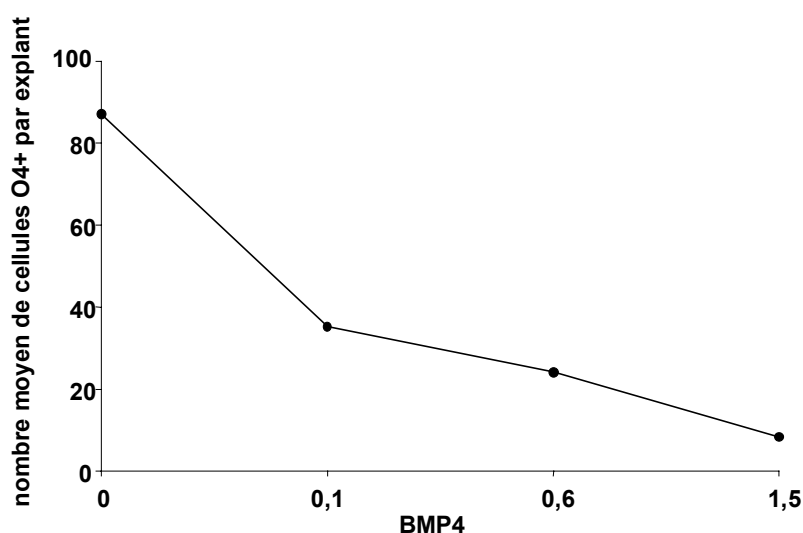


Figure 50 : Dose-réponse de l'effet inhibiteur de la protéine BMP4 sur le développement des oligodendrocytes dans les cultures d'explants de tube neural ventral de stade HH 25 (E4,5). Représentation graphique du nombre moyen de cellules O4⁺ par explant ($n \cong 30$) après 7 jours *in vitro*, en fonction de la concentration de BMP4. Ces résultats sont issus d'une expérience unique regroupant 2 cultures d'une quinzaine d'explants par point.

L'ensemble de ces résultats montre que **BMP4 est capable d'inhiber le développement des oligodendrocytes juste avant l'initiation de la détermination du lignage**. Les cellules neurales ventrales sont donc encore sensibles à l'effet de cette protéine à un stade relativement tardif du développement de la moelle épinière.

plaque neurale médiane
E4,5

tube neural ventral
E3,5-4,5

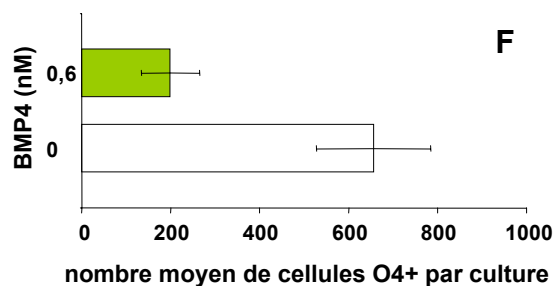
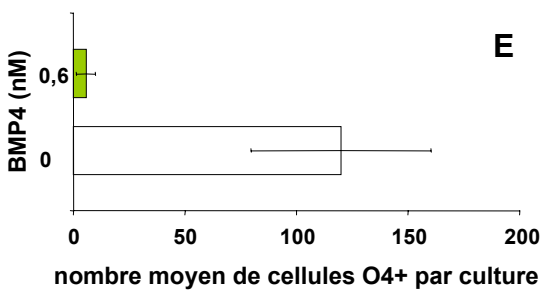
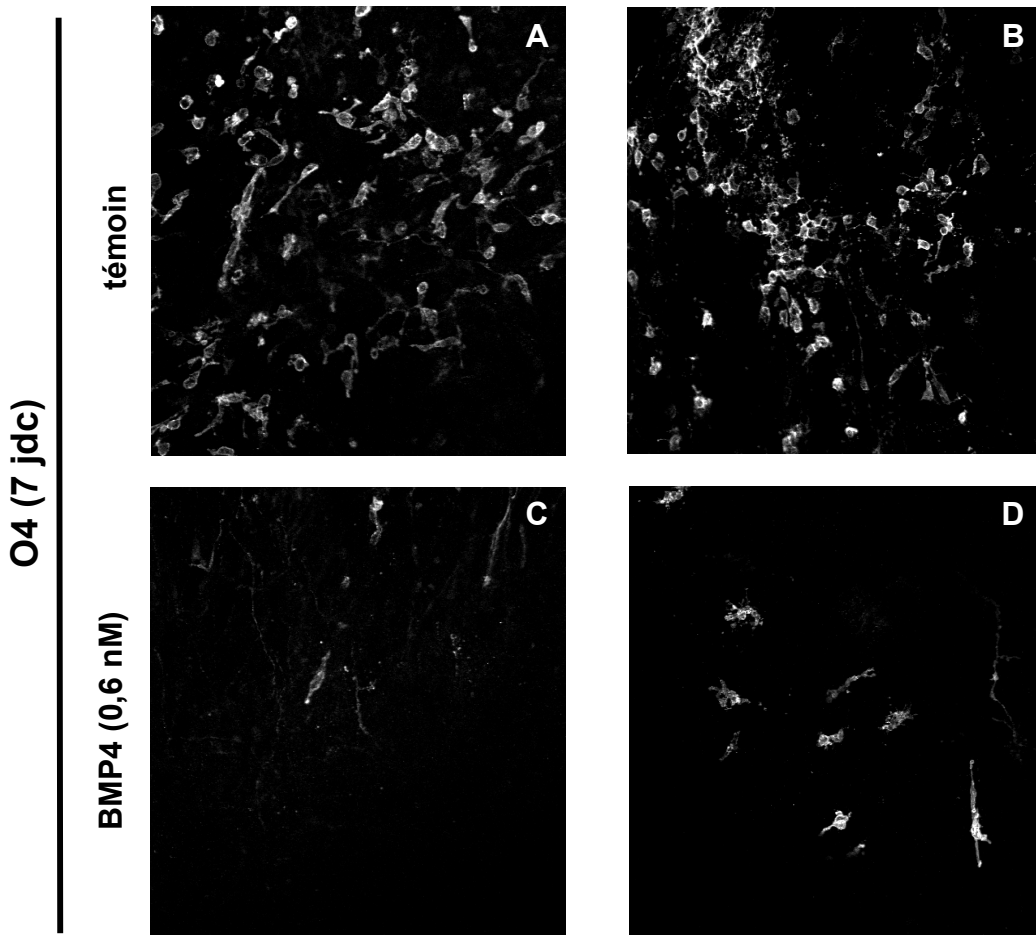


Figure 49 : Effet de la protéine BMP4 (0,6 nM) sur le développement des oligodendrocytes dans les cultures d'explants de plaque neurale médiane « tardifs » (E4,5) et de tube neural ventral de stades HH 21 à 26 (E3,5 à E4,5). Les explants de plaque neurale médiane sont prélevés au stade HH 10 (E1,5) et cultivés pendant 3 jours avant l'administration de BMP4. Le traitement est donc effectué à un stade équivalent à E4,5. A, B, C, D : Immunofluorescence de l'antigène O4 après 7 jours de culture (jdc) dans les explants contrôles (A, B) et traités pendant 4 (C) ou 7 jours (D). En absence de BMP4, les explants produisent de nombreuses cellules oligodendrocytaires (A, B). Sous l'effet de BMP4, les cultures développent peu de ces cellules (C, D). E, F : Quantification de l'effet inhibiteur de BMP4 : Les histogrammes montrent le nombre moyen de cellules O4+ par culture (n = au moins 3 ; 2 expériences distinctes) en absence et en présence de BMP4, après 7 jours *in vitro*. Les barres d'erreur représentent l'écart standard à la moyenne ou esm.

Parallèlement à la détection des oligodendrocytes, la différenciation de motoneurones a été évaluée par l'expression de la choline acétyltransférase (ChAT), révélée par immunohistochimie, dans les cultures de tube neural ventral, après 7 jours *in vitro*. Cette enzyme cytoplasmique nécessaire à la biosynthèse de l'acétylcholine, le neurotransmetteur des motoneurones, est exprimée spécifiquement dans ces cellules dans la moelle épinière, dès le stade HH 22 (E3,5) (Yamada *et al.*, 1993). Les explants cultivés en présence de 0,6 nM de BMP4 (n = 4 cultures) contiennent une densité de cellules ChAT⁺ similaire à celle observée dans les cultures contrôles (n = 4) (figure 51). Ce résultat indique qu'à une dose suffisante pour réduire le développement des oligodendrocytes, la protéine **BMP4 n'affecte pas significativement celui des motoneurones à ce stade.**

Dans le but d'étudier l'effet des BMPs sur le développement des oligodendrocytes *in vivo*, des cellules produisant la protéine BMP2 nous ont été aimablement fournies par le Dr Delphine Duprez. Ce sont des fibroblastes de caille de la lignée Q2bn, transfectés de façon stable avec la région codante de la protéine BMP2 humaine (Duprez *et al.*, 1996). Ces cellules seront appelées Q2bn-BMP2 et les cellules contrôles, transfectées avec la même construction mais en orientation antisens (Duprez *et al.*, 1996), Q2bn contrôles. Nous avons au préalable testé l'activité fonctionnelle de ces cellules dans notre système de culture.

Pour ce faire, des agrégats de Q2bn-BMP2 et de Q2bn contrôles ont été associés à des explants de plaque neurale médiane préalablement cultivés pendant 3 jours et à des explants de tube neural ventral, comme pour les expériences précédentes. Après une incubation pendant 4 jours supplémentaires dans le cas des explants de plaque neurale médiane et pendant 7 jours en ce qui concerne ceux de tube neural ventral, les cocultures sont soumises à une double immunodétection. Les cellules oligodendrocytaires sont identifiées à l'aide de l'anticorps O4 et les fibroblastes Q2bn, localisés grâce à un anticorps dirigé contre l'antigène périnucléaire QCPN, spécifique des cellules de caille (Selleck et Bronner-Fraser, 1995).

Lorsqu'ils sont cultivés avec des cellules Q2bn contrôles, les deux types d'explants génèrent de nombreux oligodendrocytes (figure 52A et C). Le nombre moyen de cellules O4⁺ par culture est d'environ 800 dans la plaque neurale médiane (figure 52E) et d'environ 900 dans le tube neural ventral (figure 52F).

A l'inverse, lorsque les explants sont entourés d'agrégats de cellules Q2bn-BMP2, la production des oligodendrocytes est comparativement faible (figure 52B et D). Les

ChAT (7 jdc)

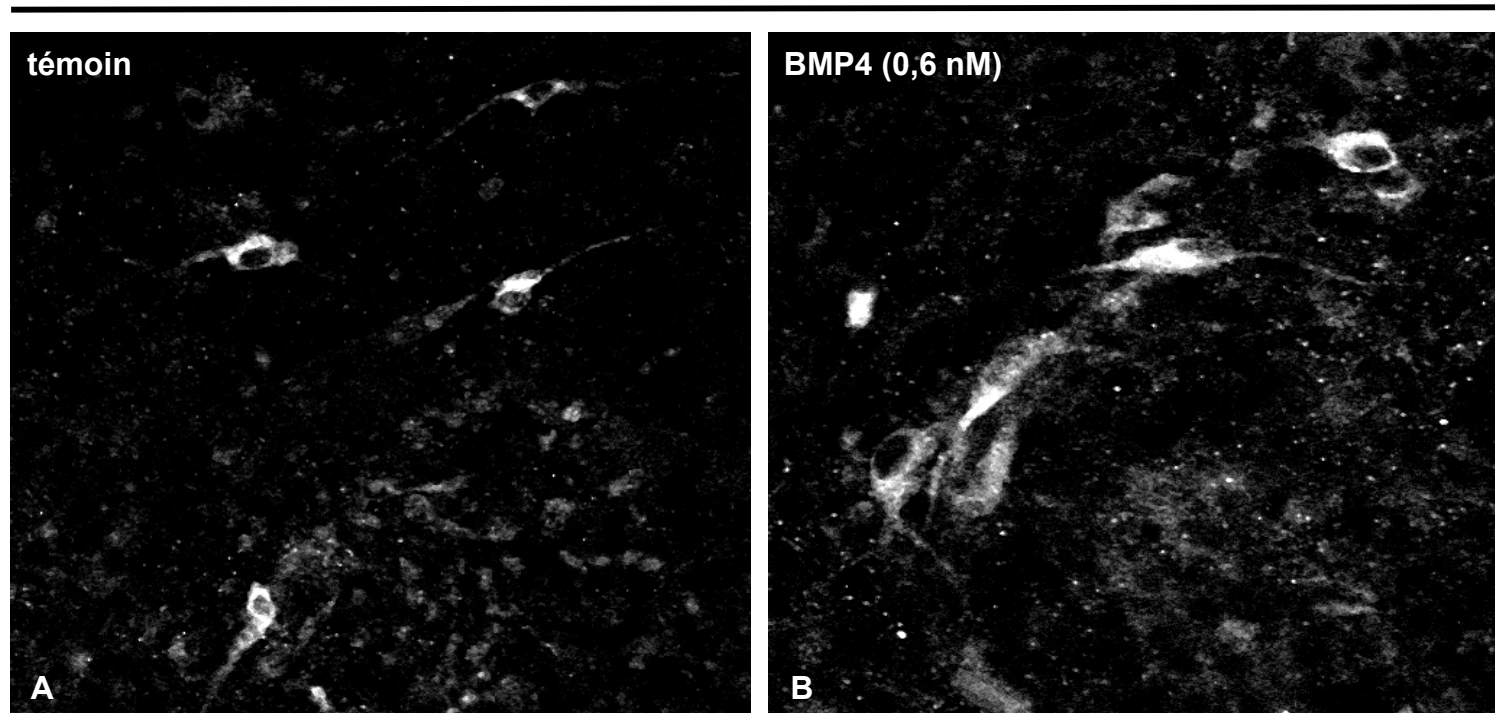


Figure 51 : Effet de la protéine BMP4 (0,6 nM) sur le développement des motoneurones dans les cultures d'explants de tube neural ventral de stades HH 22 à 25 (E3,5 à E4,5). A, B : Détection des motoneurones à l'aide d'un anticorps anti-ChAT, après 7 jours de culture (jdc), dans les explants contrôles (A) et traités (B). Les cultures présentent une densité similaire de cellules ChAT+ qu'elles soient traitées par BMP4 (B) ou non (A).

plaque neurale médiane

tube neural ventral

QCPN/O4 (7 jdc)

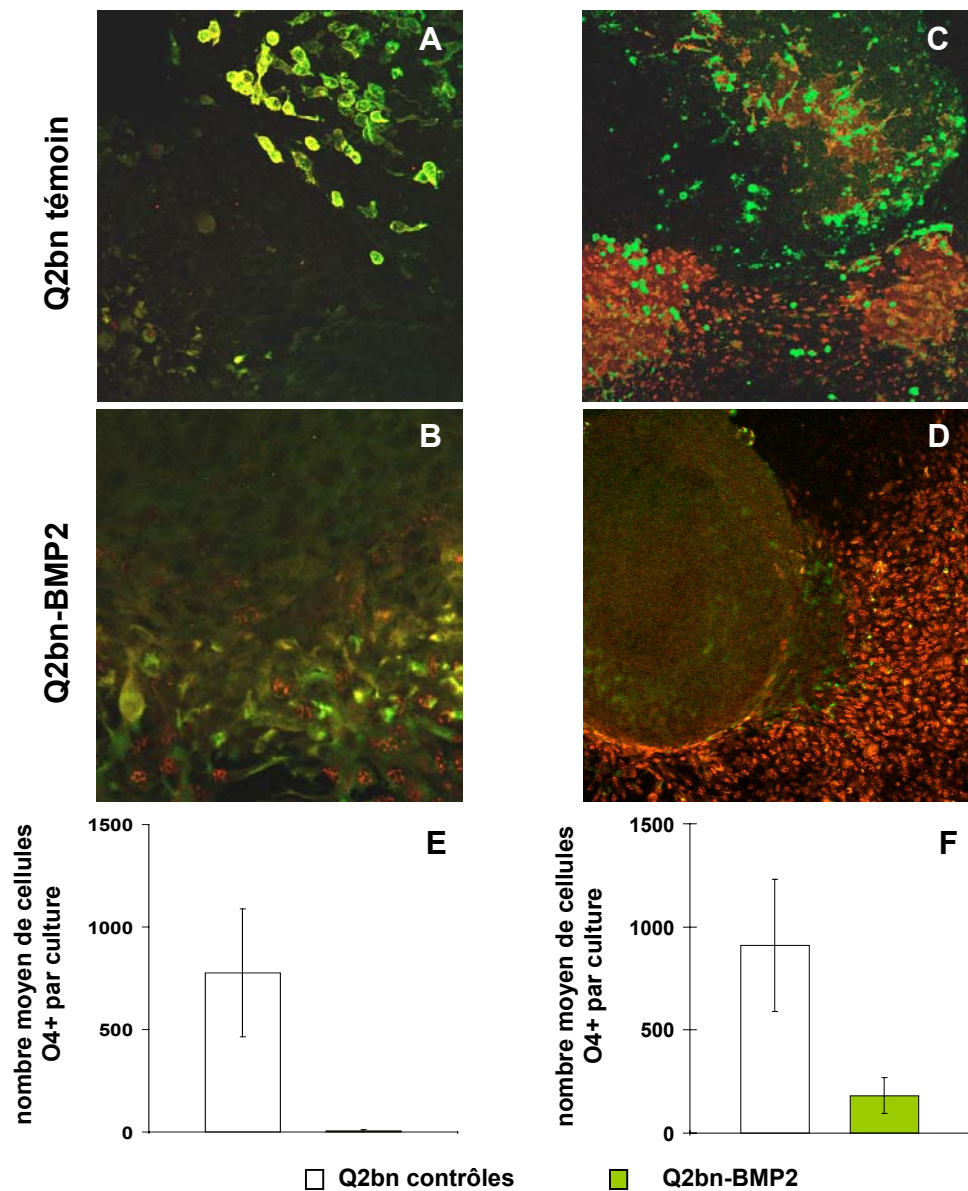


Figure 52 : Effet de la protéine BMP2 sur le développement des oligodendrocytes dans les cocultures d'explants de plaque neurale médiane « tardifs » (E4,5) ou de tube neural ventral de stades HH 22 à 25 (E3,5 à E4,5) et de cellules produisant BMP2. A, B : Cultures d'explants de plaque neurale médiane prélevés au stade HH 10 (E1,5) et associés à des agrégats de cellules produisant BMP2 (B) ou de cellules contrôles (A) après 3 jours de maturation *in vitro*. Le traitement est donc effectué à un stade équivalent à E4,5. C, D : Cocultures d'explants de tube neural ventral et d'agrégats de cellules produisant BMP2 (D) ou de cellules contrôles (C). A, B, C, D : Double immunodétection des cellules oligodendrocytaires avec l'anticorps O4 (fluorescéine, vert) et des cellules Q2bn avec l'anticorps QCPN (rhodamine, rouge) après 7 jours de culture (jdc) dans les cultures contrôles (A, C) et traitées (B, D). Notez que l'anticorps O4 marque le cytoplasme des fibroblastes Q2bn (A, B). En présence de cellules ne produisant pas BMP2, les explants de plaque neurale médiane (A) et de tube neural ventral (C) produisent un nombre important de cellules oligodendrocytaires. Les deux types d'explants cocultivés avec des cellules sécrétant BMP2 ne présentent pas d'immunoréactivité O4 (B, D). E, F : Histogramme représentant le nombre moyen de cellules O4+ par culture (n = 5) d'explants de plaque neurale médiane prélevés au stade HH 10 (E1,5) et associés à des agrégats de cellules exprimant BMP2 ou de cellules contrôles à un stade équivalent à E4,5, après un total de 7 jours de culture. F : Histogramme montrant le nombre moyen de cellules O4+ par coculture (n = 4) d'explants de tube neural ventral et d'agrégats de fibroblastes sécrétant BMP2 ou non, après 7 jours *in vitro*. Les résultats sont issus de 2 expériences indépendantes. Les barres d'erreur représentent l'écart standard à la moyenne ou esm.

explants renferment en moyenne 7 et 180 cellules positives par culture de plaque neurale médiane et de tube neural ventral, respectivement (figure 52E et F).

Ces résultats de coculture montrent que **les cellules produisant BMP2 entraînent une inhibition de l'oligodendrogenèse**, au moins aussi importante qu'en présence de protéine BMP4, dans notre modèle d'étude.

Nous avons aussi déTECTÉ la présence des motoneurones à l'aide de l'anticorps dirigé contre la ChAT dans une expérience de coculture de cellules Q2bn et d'explants de tube neural ventral et nous obtenons le même résultat qu'en présence de protéine BMP4. La production de la protéine BMP2 ne modifie pas la densité de cellules ChAT⁺ observée dans les cocultures avec les cellules Q2bn contrôles (n = 2) (non montré). En particulier, ces cellules se développent même à proximité des cellules exprimant BMP2 (non montré).

Ainsi, tout comme le traitement par la protéine BMP4, **la présence des cellules exprimant BMP2 reste sans effet sur le développement des motoneurones entre E3,5 et E4,5** alors qu'elle aboutit à l'inhibition de l'oligodendrogenèse.

Dans certaines conditions, les BMPs sont capables d'orienter les précurseurs neuraux en culture dans la voie de différenciation astrocytaire (Gross *et al.*, 1996 ; Mabie *et al.*, 1997, 1999 ; Zhu *et al.*, 1999a, 1999b, 2000 ; Gregori *et al.*, 2002). Afin de savoir si l'inhibition de l'oligodendrogenèse était accompagnée d'une stimulation du développement des astrocytes, nous avons observé l'expression de la GFAP, protéine des filaments intermédiaires spécifiques de ces cellules, dans nos explants de plaque neurale médiane maturés pendant 3 jours *in vitro* puis associés à des cellules Q2bn. Ces associations ont été maintenues en culture pendant 9 jours de manière à atteindre 12 jours de culture, moment auquel la GFAP qui s'exprime tardivement (E12 dans la moelle épinière chez le poulet) peut être détectée par immunohistochimie. Les résultats sont issus de 2 expériences distinctes.

Dans les cultures réalisées en présence de Q2bn contrôles, de nombreuses cellules GFAP⁺ sont observées au pourtour des explants (figure 53A). La densité et l'intensité du marquage observé et la morphologie des cellules ainsi identifiées sont similaires dans les explants cultivés en présence de cellules exprimant la protéine BMP2 (figure 53B). Des comptages des cellules GFAP⁺ ont été effectués dans au moins 5 champs distincts pour chaque culture et ne montrent pas de différence entre les tissus contrôle et traité. En effet, le nombre moyen d'astrocytes par champ est de 27 ± 3 dans les cocultures avec les Q2bn contrôles (n = 4) et de 26 ± 7 dans les associations avec les Q2bn-BMP2 (n = 4).

QCPN/GFAP (12 jdc)

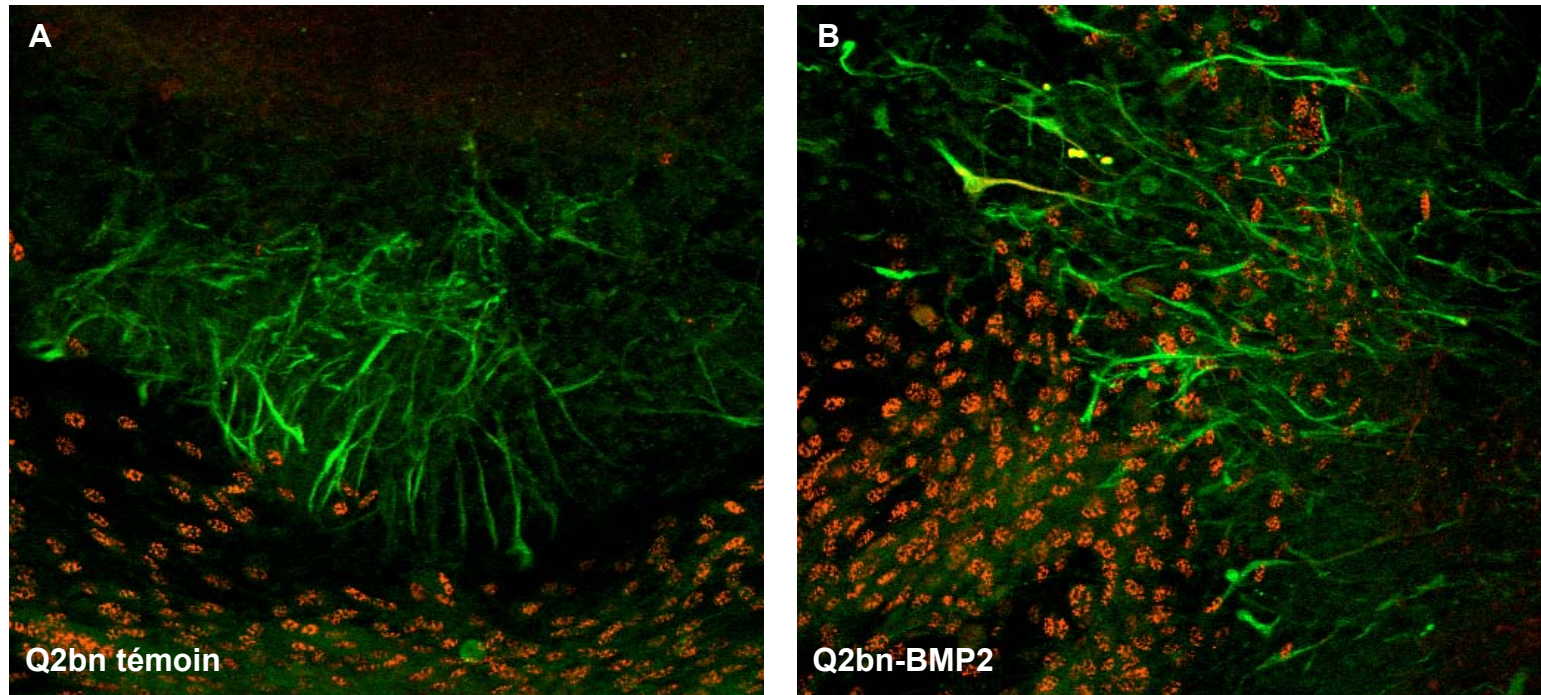


Figure 53 : Effet de la protéine BMP2 sur le développement des astrocytes dans les cocultures de cellules produisant BMP2 et d'explants de plaque neurale médiane « tardifs » (E4,5). Les explants de plaque neurale médiane sont prélevés au stade HH 10 (E1,5) et cultivés seuls pendant 3 jours avant l'association avec des agrégats de cellules sécrétant BMP2 ou de cellules contrôles. Le traitement est donc effectué à un stade équivalent à E4,5. A, B : Double immunofluorescence des antigènes GFAP (fluorescéine, vert) et QCPN (rhodamine, rouge) après 12 jours de culture (jdc) dans les explants cocultivés pendant 9 jours avec les cellules exprimant BMP2 (B) et les cellules contrôles (A). Des cellules GFAP+ se développent au pourtour des explants cultivés en présence de fibroblastes contrôles (A) et de fibroblastes qui produisent BMP2 (B), avec une densité similaire.

Ce résultat indique que, dans notre système, **l'inhibition de l'oligodendrogenèse médiée par les protéines BMPs ne s'accompagne pas d'une stimulation de la différenciation astrocytaire.**

En résumé, l'ensemble des analyses réalisées en culture montre que **les protéines BMPs répriment invariablement la formation des oligodendrocytes** dans la moelle épinière de poulet en développement, **jusqu'à un stade proche de la détermination de ce lignage.**

Les expériences de coculture avec les cellules Q2bn-BMP2 nous ont permis de nous assurer que ces cellules reproduisent les effets de la protéine BMP4 dans notre modèle d'étude. Nous les avons donc utilisées dans les analyses *in vivo* décrites dans la section suivante.

II. Analyses *in vivo* à E3

Il était ensuite fondamental d'examiner l'effet des BMPs sur l'oligodendrogenèse *in vivo*. Il fallait premièrement savoir si les BMPs étaient capables d'inhiber l'oligodendrogenèse *in situ*, le tube neural subissant l'influence des tissus environnants et en particulier, l'influence inductrice des tissus mésodermiques axiaux. Nous souhaitons également préciser les modalités de cette inhibition. En effet, les expériences de culture précédemment décrites ne permettent pas de définir le moment auquel les BMPs interviennent lors de la formation des oligodendrocytes. L'inhibition observée pourrait refléter le blocage de la différenciation oligodendrocytaire ou d'un événement plus précoce dans la progression du lignage. Les protéines BMPs pourraient aussi agir en inhibant la prolifération de cellules oligodendrocytaires.

Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons choisi de greffer des cellules Q2bn-BMP2 à proximité de la région d'origine des précurseurs oligodendrocytaires, *in ovo*, avant leur détermination. Ces expériences sont réalisées sur des embryons de 3 jours (E3/stades HH 18 à 20), ce stade de développement étant le plus tardif qui permette d'obtenir un taux de survie acceptable après ce type de microchirurgie. Les embryons opérés sont remis en incubation et se développent jusqu'à E6,5/7,5 (stades HH 30 à 33), soit environ 24 à 48 heures après le début de l'expression de l'antigène O4 dans le tube neural. A ce stade, la région de la greffe comprenant le tube neural, la chorde sous-jacente et les somites des deux côtés, est prélevée et fixée. Des coupes transversales de cette zone sont ensuite réalisées et soumises à une double immunodétection visant à révéler les cellules oligodendrocytaires avec l'anticorps O4 et à localiser les cellules greffées à l'aide

de l'anticorps QCPN. Pour certaines expériences, les cellules Q2bn ont été préalablement marquées au DiI, un colorant membranaire fluorescent. Dans ces cas, seule une immunodétection de l'antigène O4 est effectuée sur les coupes réalisées au niveau de la région greffée.

Dans un premier temps, nous avons cherché à introduire des cellules Q2bn-BMP2 dans la lumière du tube neural troncal par greffe ou par microinjection. Ces tentatives n'ont pas donné de résultats satisfaisants. En particulier, les cellules Q2bn-BMP2 ne restaient pas en contact avec le neuroépithélium. Nous avons donc réalisé des greffes d'agrégats cellulaires contre la paroi latérale du tube neural.

1. Greffe de cellules produisant BMP2 entre le tube neural ventral et les somites

Des agrégats de fibroblastes Q2bn-BMP2 ont été introduits dans une incision réalisée, d'un côté, entre le tube neural thoraco-lombaire et les somites, puis poussés le plus ventralement possible (figure 75). Sur 31 embryons ainsi manipulés, 16 ont survécu et ont été analysés, parmi lesquels 2 ont été écartés en raison d'une immunohistochimie inexploitable. Les résultats décrits ci-après concernent donc 14 embryons.

Des coupes transversales de tube neural réalisées en amont ou en aval du greffon nous ont servi de témoin direct (figure 54A, B et C). Elles présentent un patron d'oligodendrogenèse normal, similaire au patron antérieurement décrit dans la moelle épinière de poulet aux mêmes stades (Ono *et al.*, 1995 ; Poncet *et al.*, 1996 ; Soula *et al.*, 2001). Deux foyers bilatéraux de précurseurs O4⁺ sont présents dans la partie la plus ventrale du neuroépithélium, quelques cellules O4⁺ situées dans le quart ventral de la zone du manteau s'étendent à partir des foyers neuroépithéliaux et de nombreuses cellules O4⁺, apparemment radiaires, sont détectées dans les parties ventrale et latérale de la zone marginale de la moelle épinière en formation (figure 54B et C).

En revanche, au niveau de la région greffée, visualisée grâce à l'expression de l'antigène QCPN (figures 54D, E et 55D) ou du marquage au DiI (figure 55A), le développement du lignage oligodendrocytaire est très nettement inhibé chez 10 embryons sur 14, lesquels présentent tous les cellules Q2bn-BMP2 contre le tube neural ventral.

Coupes transversales du tube neural
à distance du greffon de Q2bn-BMP2 au sein du greffon de Q2bn-BMP2

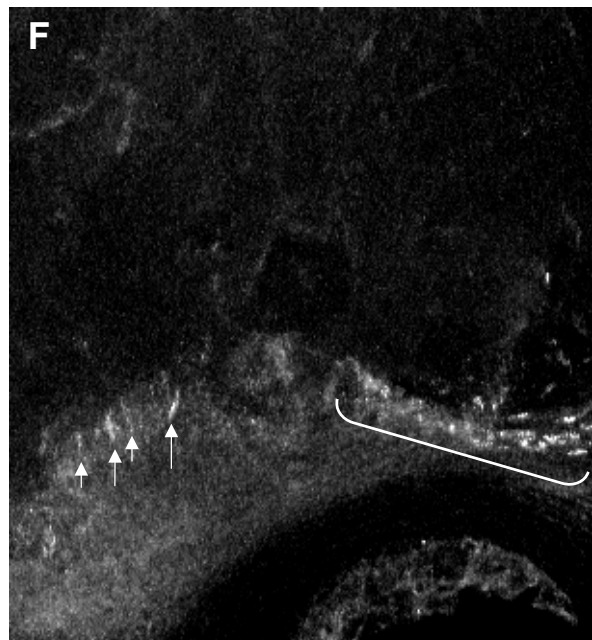
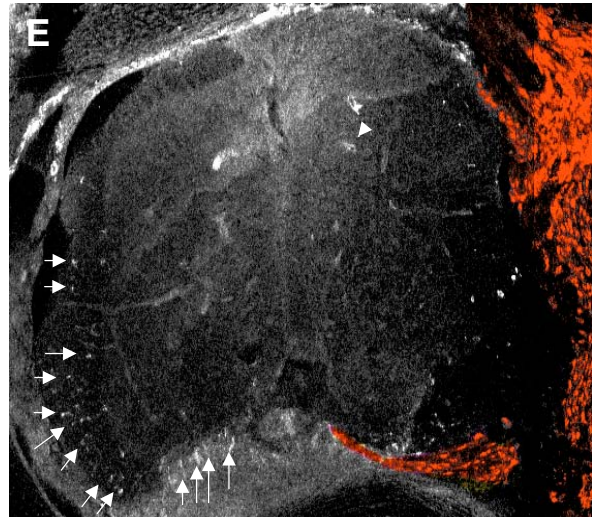
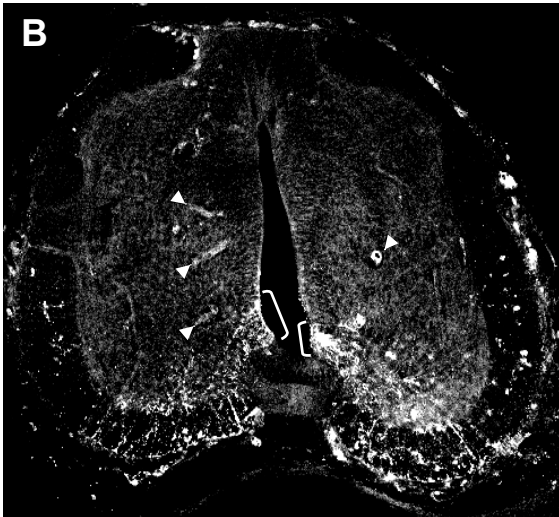
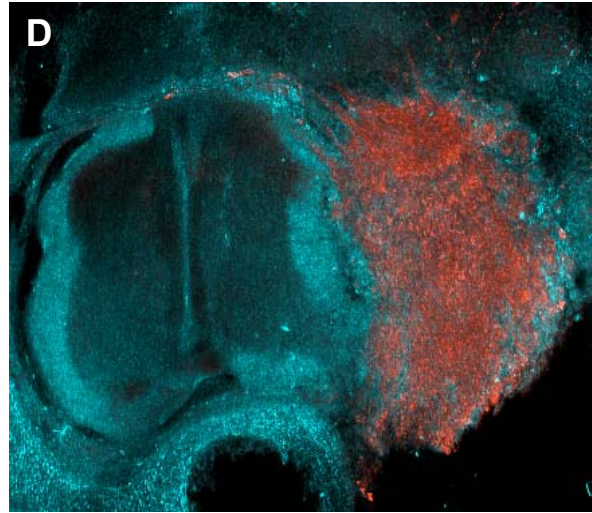
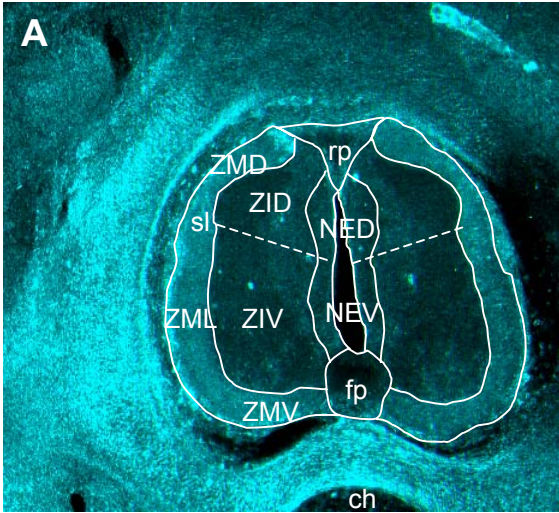


Figure 54 : Effet de la protéine BMP2 sur l'oligodendrogenèse *in vivo*. Coupes transversales du tube neural au stade HH 30-33 (E6,5/7,5), en amont ou en aval du greffon (A, B, C) et au niveau du greffon (D, E, F), chez un embryon de poulet ayant reçu une greffe d'agrégats de cellules produisant BMP2 entre le tube neural et les somites, *in ovo*, au stade HH 18-20 (E3). A, D : Superposition d'images en fond noir (fausse couleur bleue) et en immunofluorescence pour l'antigène QCPN (rhodamine, rouge). En A, les lignes blanches délimitent les différentes régions du tube neural. Cette coupe a été réalisée à distance du greffon et ne présente pas de cellules Q2bn-BMP2. Sur une section faite au sein du greffon (D), une importante masse de cellules Q2bn-BMP2 flanque le tube neural en position latéro-ventrale. B, E : Images, agrandies et en double immunofluorescence pour les antigènes O4 et QCPN, des coupes montrées en A et D, respectivement. Hors de la zone du greffon (B), O4 est exprimé dans deux foyers bilatéraux de précurseurs oligodendrocytaires localisés dans la partie la plus ventrale du neuroépithélium (crochets), dans quelques cellules situées dans le quart ventral de la zone du manteau ou zone intermédiaire et dans de nombreuses cellules de la zone marginale ventrale et latérale de la moelle épinière en formation. Au niveau du greffon (E), les seules figures O4+ détectables sont localisées dans la zone marginale ventrale et latérale du côté opposé au greffon (flèches) et représentent des prolongements cytoplasmiques provenant d'oligodendrocytes en cours de différenciation dont les corps cellulaires sont probablement situés en amont et/ou en aval de la coupe. C, F : Forts grossissements des images B et E, respectivement, montrant la moitié ventrale du neuroépithélium. A distance du greffon (C), les cellules O4+ forment deux foyers neuroépithéliaux symétriques (crochets), de part et d'autre de la lumière du tube neural, et juste au dessus de la *floor plate* (fp). Au niveau du greffon (F), toutes les régions du tube neural ventral, et en particulier le neuroépithélium, sont dépourvues d'immunoréactivité O4 excepté la zone marginale ventrale contralatérale qui contient des prolongements cytoplasmiques O4+ (flèches). L'accolade en F montre des cellules Q2bn-BMP2 (QCPN+) localisées sous la partie ventrale du tube neural. Noter que l'anticorps O4 marque les vaisseaux sanguins dans le tube neural (têtes de flèches en B, C et E). ch : chorde ; fp : *floor plate* ; NED : neuroépithélium dorsal ; NEV : neuroépithélium ventral ; rp : *roof plate* ; sl : *sulcus limitans* ; ZID : zone intermédiaire dorsale ; ZIV : zone intermédiaire ventrale ; ZMD : zone marginale dorsale ; ZML : zone marginale latérale ; ZMV : zone marginale ventrale.

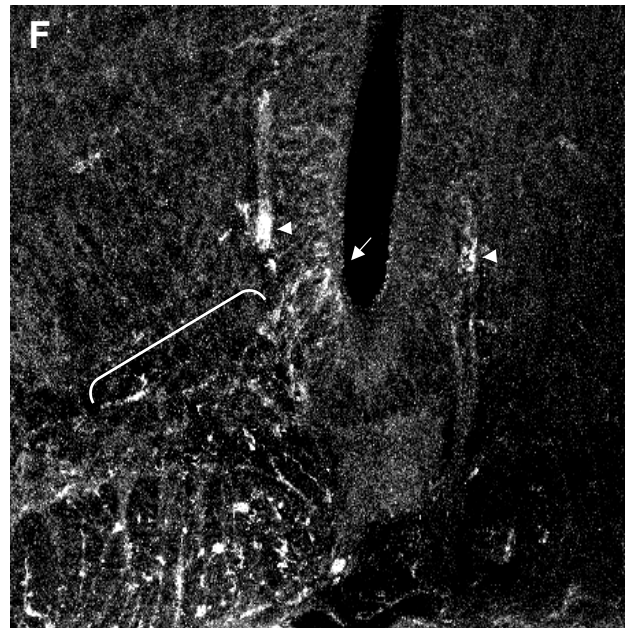
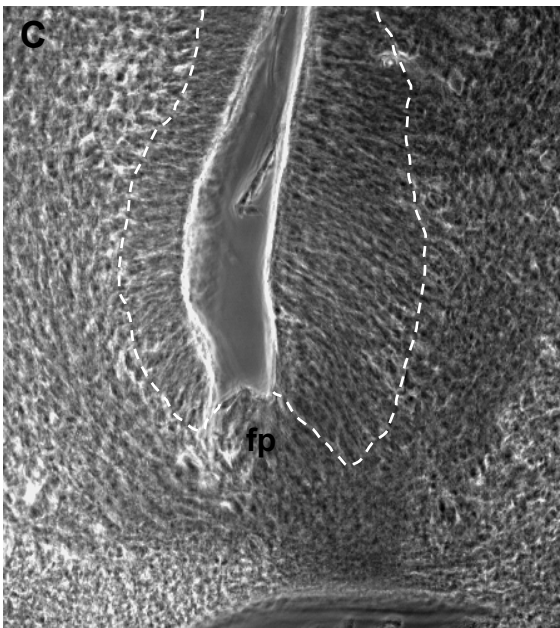
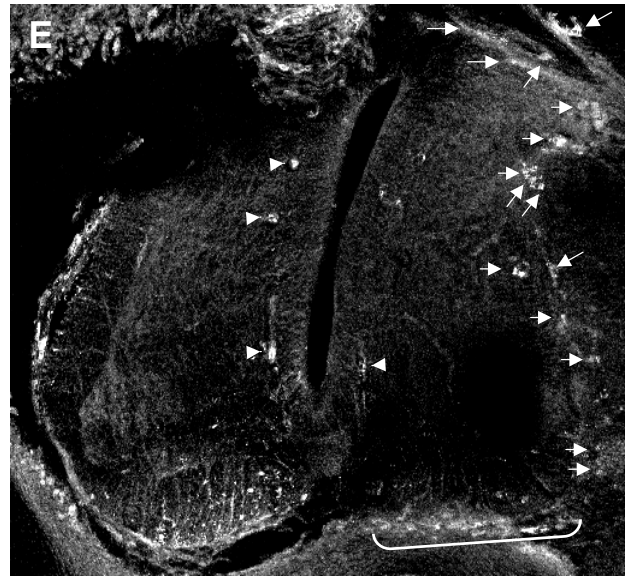
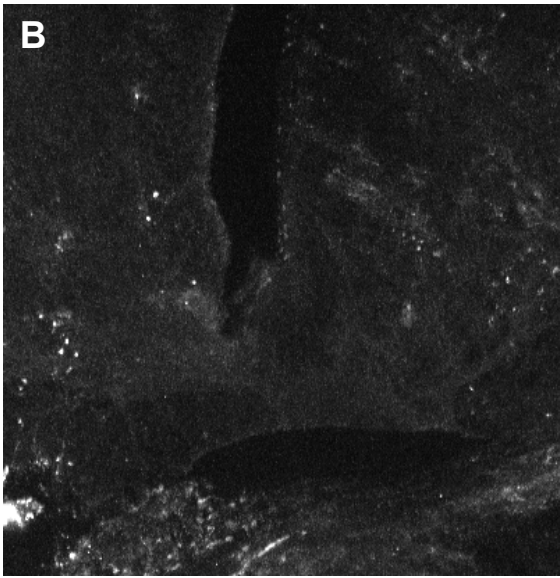
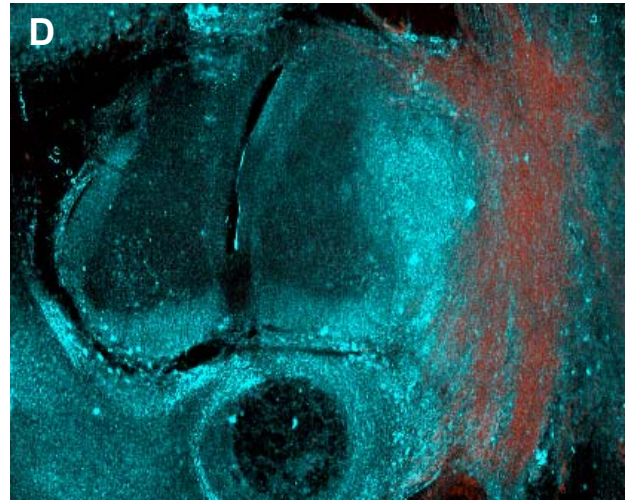
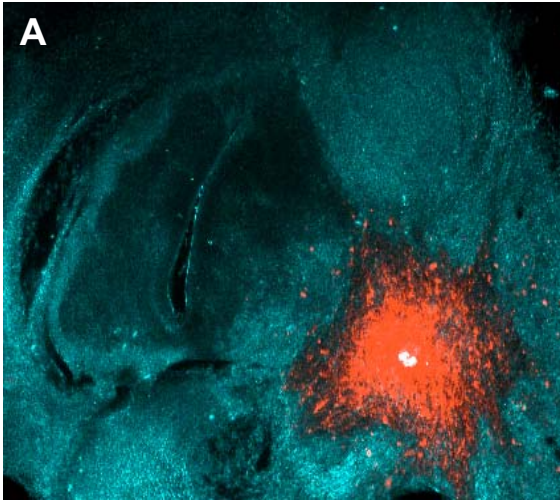


Figure 55 : Effet de la protéine BMP2 sur l'oligodendrogenèse *in vivo*. Coupes transversales du tube neural au stade HH 30-33 (E6,5/7,5), au niveau du greffon, chez 2 embryons de poulet ayant reçu une greffe d'agrégats de cellules produisant BMP2 entre le tube neural et les somites, *in ovo*, au stade HH 18-20 (E3). A : Superposition d'images en fond noir (fausse couleur bleue) et en fluorescence pour le Di-I (rouge), avec lequel les cellules produisant BMP2 ont été marquées avant la greffe. Le greffon, formé d'une masse cellulaire compacte, jouxte la partie ventrale du tube neural. B : Image, fortement grossie et en immunofluorescence pour l'antigène O4, de la coupe montrée en A. Toutes les régions du tube neural ventral, et en particulier le neuroépithélium, sont dépourvues de cellules O4+. C : Vue en contraste de phase de l'image B. Le neuroépithélium ventral, dont les limites sont indiquées en pointillés, est élargi dans la direction latérale du côté du greffon. D : Superposition d'images en fond noir (fausse couleur bleue) et en immunofluorescence pour l'antigène QCPN (rhodamine, rouge). Le greffon, moins compact qu'en A, flanque le tube neural sur toute sa hauteur selon l'axe dorso-ventral. E, F : Images, agrandies et en double immunofluorescence pour les antigènes O4 et QCPN, de la coupe montrée en D. En E, quelques cellules exprimant BMP2 (QCPN+) bordent le côté (flèches) et la partie ventrale droite du tube neural (accolade). La moitié du tube neural adjacente au greffon est dépourvue d'immunoréactivité O4 (E, F). Du côté opposé au greffon, le patron d'expression de O4 apparaît normal ; un foyer de précurseurs oligodendrocytaires est présent dans la partie la plus ventrale du neuroépithélium (flèche en F), ainsi que des cellules O4+ dans les zones intermédiaire (accolade en F) et marginale ventrales (E, F). Noter que l'anticorps O4 marque les vaisseaux sanguins dans le tube neural (têtes de flèches en E et F). fp : *floor plate*.

Dans les cas les plus sévères (6/10), l'inhibition observée est totale. En effet, les foyers ventriculaires de précurseurs oligodendrocytaires sont entièrement absents sur toutes les coupes contenant les cellules greffées (figures 54E, F et 55B). Parmi ces coupes, certaines sont entièrement dépourvues d'immunoréactivité O4 (figure 55B). Dans les autres, quelques cellules O4⁺ sont visibles mais seulement dans les régions latérale et ventrale de la zone marginale, du côté opposé au greffon (figure 54E). Ces cellules oligodendrocytaires proviennent vraisemblablement du neuroépithélium des régions antérieure et postérieure au greffon. En effet, les oligodendrocytes en développement sont capables de migrer dans toutes les directions de la moelle épinière, et en particulier sur des distances de quelques centaines de micromètres selon l'axe longitudinal (Cameron-Curry et Le Douarin, 1995 ; Poncet *et al.*, 1996 ; Pringle *et al.*, 1998).

Il est intéressant de noter que la présence des cellules produisant BMP2 ne modifie pas la morphologie générale du tube neural (figures 54 et 55). Cependant, dans certains des cas sévères décrits ci-dessus (3/6), l'absence bilatérale de précurseurs oligodendrocytaires dans le neuroépithélium s'accompagne d'un élargissement médio-latéral de cette couche cellulaire germinative mais uniquement du côté du greffon (figure 55C), suggérant un effet possible de la protéine BMP2 sur la prolifération des précurseurs neuraux et/ou sur leur survie. Cet élargissement obtenu seulement du côté du greffon suggère en outre que l'effet éventuel de BMP2 sur la survie et/ou la prolifération des cellules neuroépithéliales nécessite de fortes concentrations de la protéine et qu'il est à découpler du phénomène d'inhibition du développement des oligodendrocytes qui est bilatéral, d'autant plus que cette observation n'accompagne pas tous les cas d'inhibition observés.

Chez les 4 autres embryons pour lesquels les cellules greffées sont situées contre le tube neural ventral (4/10), la répression du développement des oligodendrocytes est partielle (figure 55E et F). Aucune cellule O4⁺ n'est détectée dans le neuroépithélium, la zone du manteau et la zone marginale du tube neural du côté de la greffe alors qu'elles sont présentes du côté controlatéral dans les 3 couches (figure 55E et F), indiquant un effet plus limité. La sévérité de l'inhibition de l'oligodendrogenèse semble donc directement liée à la taille et à la position précise du greffon, suggérant que l'effet des BMPs pourrait également être dose-dépendant *in vivo*.

Les 4 autres embryons analysés (4/14) présentent les cellules greffées à distance du tube neural ventral –i. e. contre la région latéro-dorsale du tube neural pour 2 d'entre eux et contre le tube neural dorsal pour les 2 autres. Ces cas n'ont pas retenu notre attention car le patron d'oligodendrogenèse apparaît semblable au patron normal.

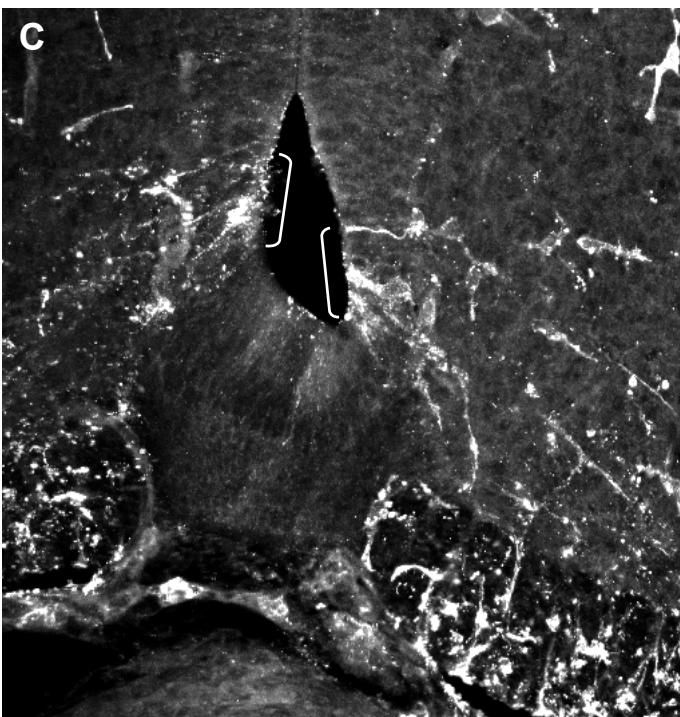
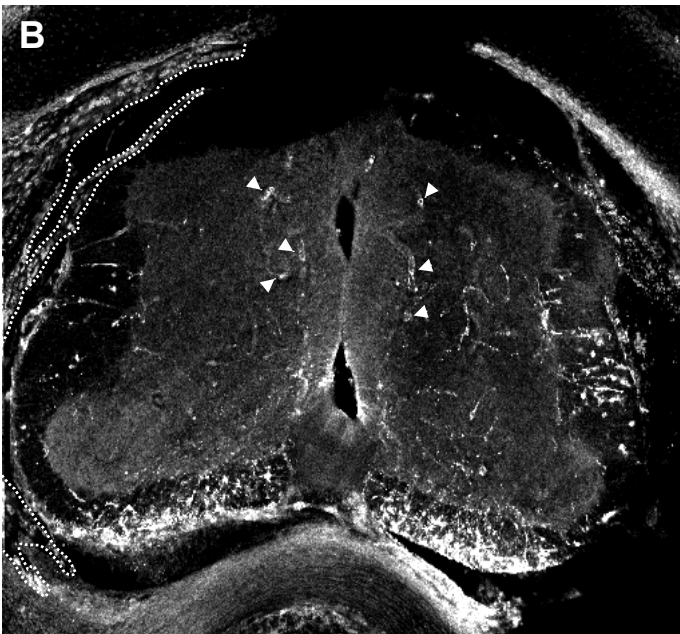
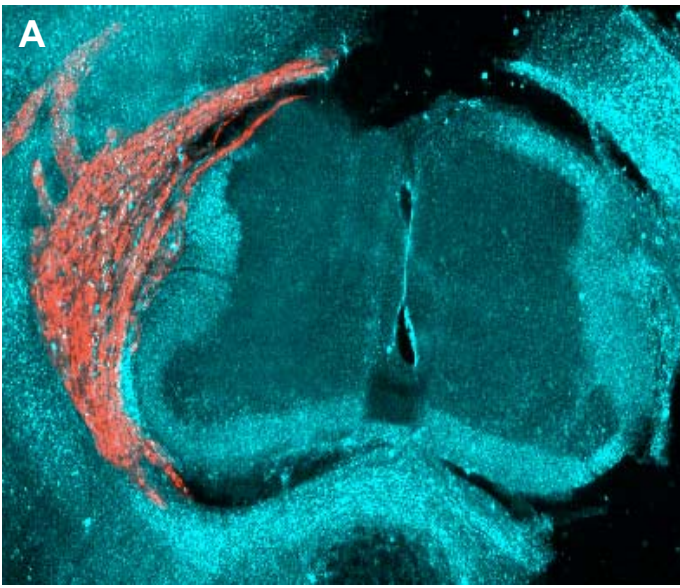


Figure 56 : Effet des cellules Q2bn contrôles sur l'oligodendrogenèse *in vivo*.

Coupe transversale du tube neural au stade HH 30-33 (E6,5/7,5), au niveau du greffon, chez un embryon de poulet ayant reçu une greffe d'agrégats de cellules Q2bn contrôles entre le tube neural et les somites, *in ovo*, au stade HH 18-20 (E3). A : Superposition d'images en fond noir (fausse couleur bleue) et en immunofluorescence pour l'antigène QCPN (rhodamine, rouge). Le greffon flanque le tube neural sur toute sa hauteur selon l'axe dorso-ventral. B, C : Vues, légèrement agrandie (B) ou à fort grossissement (C) et en double immunofluorescence pour les antigènes O4 et QCPN, de la coupe montrée en A. En B, la ligne en pointillés délimite les cellules QCPN+ appartenant au greffon et les têtes de flèches indiquent les vaisseaux sanguins marqués par l'anticorps O4. Le patron d'oligodendrogenèse est normal et identique des 2 côtés du tube neural, en dépit de la présence du greffon : O4 est exprimé dans deux foyers bilatéraux de précurseurs oligodendrocytaires localisés dans la partie la plus ventrale du neuroépithélium (crochets en C), dans quelques cellules s'étendant à partir de ces foyers et situées dans le quart ventral de la zone du manteau ou zone intermédiaire et dans de nombreuses cellules de la zone marginale ventrale et latérale de la moelle épinière en développement.

Coupes transversales du tube neural

à distance du greffon de Q2bn-BMP2

au sein du greffon de Q2bn-BMP2

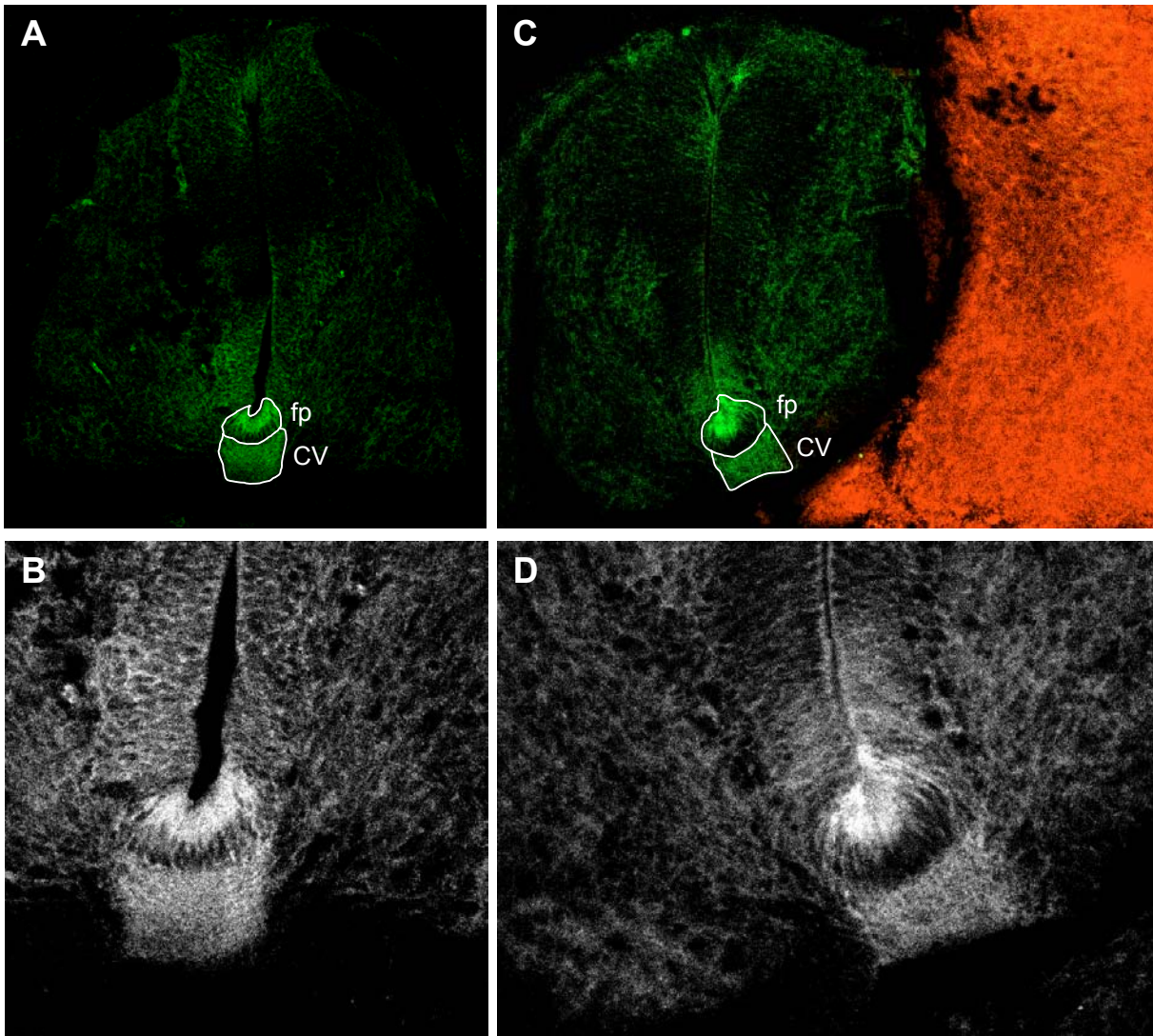


Figure 57 : Effet de la protéine BMP2 sur l'expression du morphogène SHH *in vivo*. Coupes transversales du tube neural au stade HH 30-33 (E6,5/7,5), en amont ou en aval du greffon (A, B) et au niveau du greffon (C, D), chez un embryon de poulet ayant reçu une greffe d'agrégats de cellules produisant BMP2 entre le tube neural et les somites, *in ovo*, au stade HH 18-20 (E3). A, C : Double fluorescence du Di-I, avec lequel les cellules Q2bn-BMP2 ont été marquées avant la greffe (rouge) et de l'anticorps 5E1 après immunodétection de la protéine SHH (fluorescéine, vert). En A, la coupe a été réalisée à distance du greffon et ne présente pas de cellules Q2bn-BMP2. Sur une coupe faite au sein du greffon (C), une importante masse de cellules Q2bn-BMP2 flanque le tube neural en position latéro-ventrale. B, D : Forts grossissements des images A et C, respectivement, montrant le tiers ventral du neuroépithélium. Hors de la zone du greffon (B), SHH est exprimée au pôle apical des cellules de la *floor plate* (fp, délimitée en A) et dans la commissure ventrale sous-jacente (CV, indiquée en A). Au niveau du greffon (D), SHH est présente et localisée dans les mêmes structures que dans la coupe témoin, avec une intensité de marquage similaire. CV : commissure ventrale ; fp : *floor plate*.

Afin de vérifier l'absence d'effet des cellules Q2bn elles-mêmes, des greffes de cellules Q2bn contrôles ont aussi été analysées. Sur 13 embryons opérés, 8 ont survécu et 5 ont pu être exploités. Dans tous les cas, la distribution des cellules O4⁺ est comparable à celle observée chez des embryons non manipulés, malgré la présence d'une masse importante de cellules Q2bn contre le tube neural ventral (figure 56A, B et C). Le neuroépithélium n'est pas élargi latéralement du côté du greffon contrairement aux observations faites chez certains embryons ayant reçu une greffe de cellules Q2bn-BMP2. Ceci indique que l'introduction des fibroblastes Q2bn entre le tube neural et les somites ne modifie pas l'oligodrogenèse, ni l'aspect du neuroépithélium.

En résumé, dans tous les cas où les cellules Q2bn-BMP2 sont en position ventrale par rapport au tube neural, l'oligodrogenèse est complètement inhibée du côté ipsilatéral ou des deux côtés, en fonction de la taille du greffon.

L'expression de l'antigène O4 dans le neuroépithélium est un marqueur de détermination des précurseurs des oligodendrocytes puisqu'elle commence au moment même de l'initiation de cet événement (Soula *et al.*, 2001). Le fait que les cellules neuroépithéliales n'expriment pas O4 en présence de BMP2 suggère que **les BMPs empêchent leur détermination dans la voie oligodendrocytaire**. Ceci peut être un effet sur la régulation de la spécification du lignage ou une conséquence d'un effet plus précoce de ces protéines sur les cellules neuroépithéliales. Quoi qu'il en soit, nos résultats indiquent que la suppression de l'oligodrogenèse causée par les BMPs ne résulte pas de l'inhibition de la prolifération ou de la différenciation de précurseurs déjà déterminés.

Le signal médié par le morphogène SHH est nécessaire et suffisant pour la spécification des oligodendrocytes (Orentas *et al.*, 1999 ; Soula *et al.*, 2001). Cependant, des greffes ventrales de cellules exprimant la protéine BMP7 au niveau du cerveau postérieur entraînent une importante réduction de l'expression de l'ARN messager de SHH dans la *floor plate* (Arkell et Beddington, 1997). Nous avons alors cherché à savoir si l'effet de BMP2 sur le développement des oligodendrocytes passait par l'inhibition de l'expression de SHH. Pour ce faire, Eric Agius a réitéré les expériences de greffes de cellules Q2bn-BMP2 afin d'analyser l'expression de la protéine SHH par immunodétection avec l'anticorps 5E1 (Ericson *et al.*, 1996).

Sur des coupes contrôles, réalisées hors de la greffe, la protéine SHH est exprimée dans la partie apicale des cellules de la *floor plate* et dans la commissure ventrale sous-jacente (figure 57A et B), comme précédemment décrit (Orentas *et al.*, 1999).

Dans les 3 cas de greffe analysés, la distribution et l'intensité du marquage de la protéine SHH ne sont pas modifiées par la présence des cellules produisant BMP2 (figure 57C et D) indiquant, que **la répression de l'oligodendrogenèse ne passe pas par la régulation de l'expression de SHH.**

Les protéines BMPs sont capables d'orienter la différenciation de précurseurs neuraux vers la voie astrocytaire en culture chez les rongeurs (Gross *et al.*, 1996 ; Mabie *et al.*, 1997, 1999 ; Zhu *et al.*, 1999a, 1999b, 2000 ; Gregori *et al.*, 2002). Il était donc intéressant de savoir si en présence de Q2bn-BMP2, les cellules neuroépithéliales, normalement destinées à former des précurseurs oligodendrocytaires, ne donnaient pas naissance à des cellules du lignage astrocytaire.

Eric Agius a alors réalisé l'immunodétection du transporteur du glutamate et de l'aspartate GLAST, sur des coupes transversales de tube neural d'embryons ayant reçu une greffe de fibroblastes Q2bn-BMP2. GLAST est un marqueur membranaire précoce des cellules du lignage astrocytaire. Il est, en effet, exprimé par les cellules de la glie radiale - dont au moins une sous-population correspond à des précurseurs astrocytaires- ainsi que par les astrocytes, durant le développement de la moelle épinière, chez la souris (Shibata *et al.*, 1997). Cette protéine ne s'exprime pas de manière homogène le long de l'axe dorso-ventral et est, en particulier, plus fortement représentée dans la partie intermédiaire du neuroépithélium, à E13 chez la souris (Shibata *et al.*, 1997), stade correspondant à E7,5 chez le poulet. Ce domaine exprime également le récepteur 3 au FGF (FGFR3) à ce stade du développement, chez la souris et le poulet, marqueur putatif des précurseurs astrocytaires puis des astrocytes, plus tard au cours du développement (Pringle *et al.*, 2003). Ensemble, ces observations suggèrent que dans la moelle épinière, les précurseurs astrocytaires sont caractérisés par un fort niveau d'expression de GLAST.

Hors de la zone greffée, la localisation immunohistochimique de GLAST dans le tube neural est similaire à celle décrite chez la souris à un stade de développement équivalent (Shibata *et al.*, 1997). Le marquage est plus intense dans les deux tiers ventraux du tube neural et intéresse en particulier, la commissure ventrale, la *floor plate* sus-jacente, le neuroépithélium dont la partie la plus ventrale est plus faiblement colorée et les prolongements radiaires qui traversent la zone du manteau et la zone marginale (figure 58C).

Coupes transversales du tube neural

à distance du greffon de Q2bn-BMP2

au sein du greffon de Q2bn-BMP2

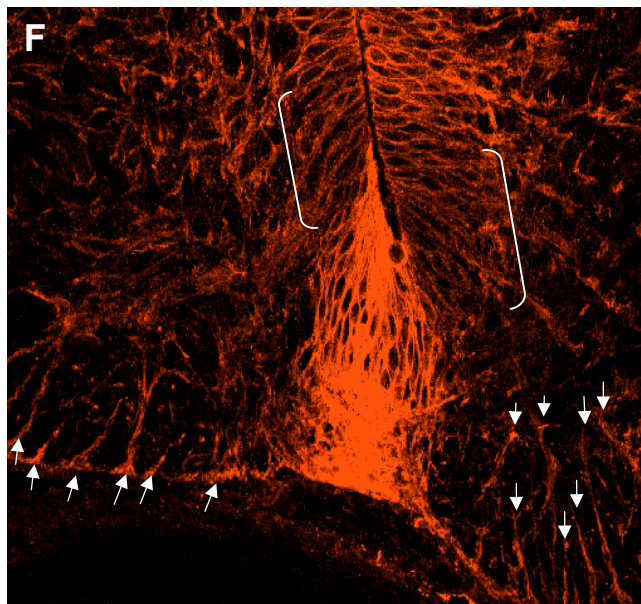
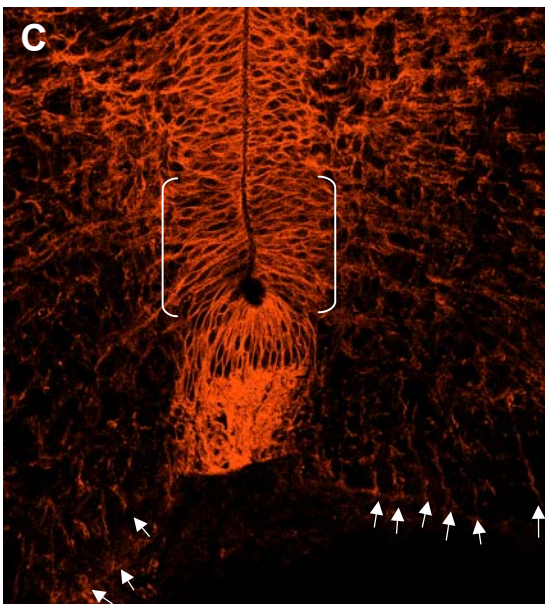
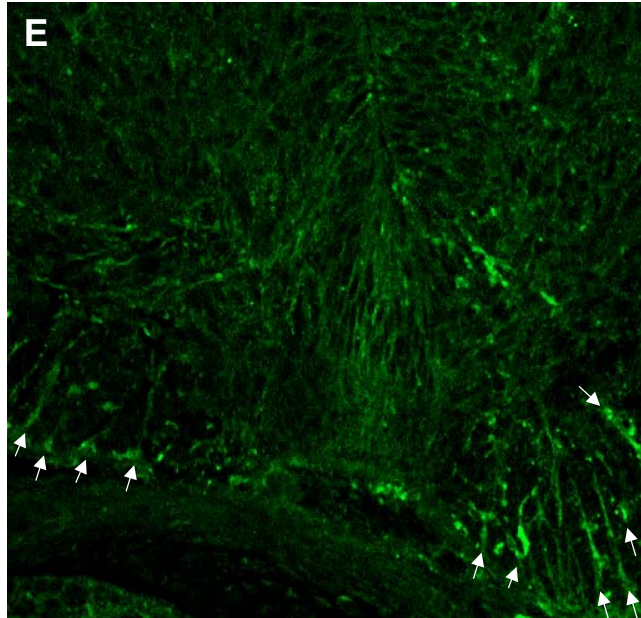
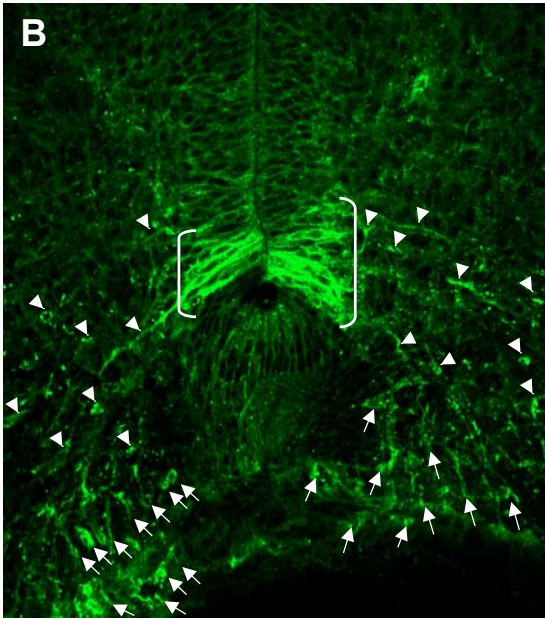
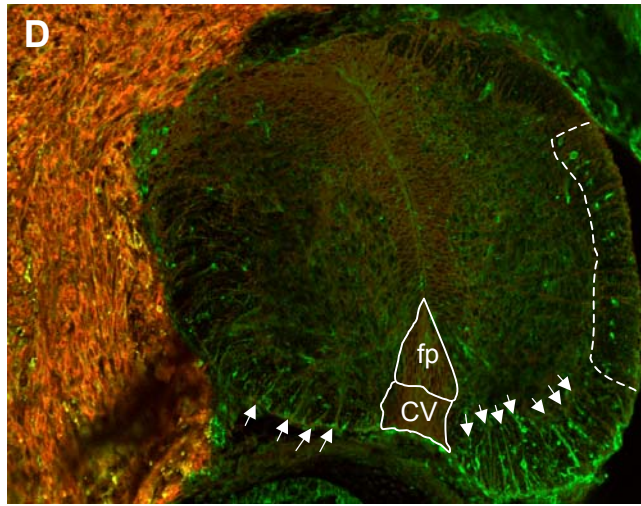
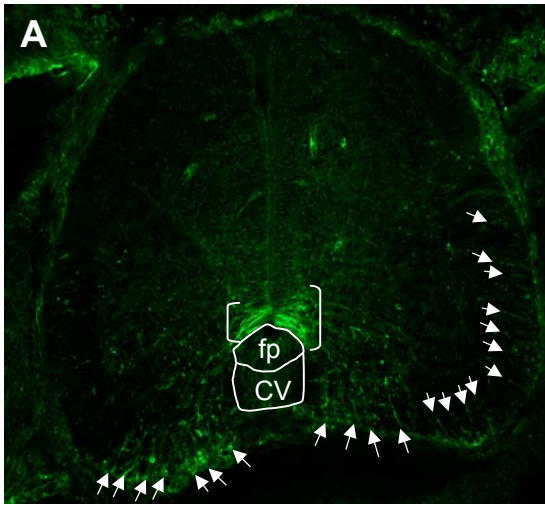


Figure 58 : Effet de la protéine BMP2 sur le développement des cellules du lignage astrocytaire *in vivo*. Coupes transversales du tube neural au stade HH 30-33 (E6,5/7,5), en amont ou en aval du greffon (A, B, C) et au niveau du greffon (D, E, F), chez un embryon de poulet ayant reçu une greffe d'agrégats de cellules produisant BMP2 entre le tube neural et les somites, *in ovo*, au stade HH 18-20 (E3). A, D : Double fluorescence du Di-I (rouge), avec lequel les cellules Q2bn-BMP2 ont été marquées avant la greffe, et de l'antigène O4 après immunodétection (fluorescéine, vert). En A, la coupe a été réalisée à distance du greffon et ne présente pas de cellules Q2bn-BMP2. Sur une coupe faite au sein du greffon (D), une importante masse de cellules Q2bn-BMP2 flanque le tube neural sur toute sa hauteur selon l'axe dorso-ventral. B, E : Forts grossissements des images A et D, respectivement, montrant la moitié ventrale du neuroépithélium. Hors de la zone du greffon (A, B), le patron d'oligodendrogenèse est conforme à celui décrit chez des embryons non manipulés ou ayant reçu une greffe de cellules Q2bn contrôles. O4 est exprimé, des 2 côtés du tube neural, dans la partie la plus ventrale du neuroépithélium (crochets en A et B), jouxtant la *floor plate* (fp, délimitée en A), dans des cellules de la zone du manteau bordant ces foyers neuroépithéliaux O4+ (têtes de flèches en B) et dans des cellules de la zone marginale ventrale et latérale (flèches en A et B). Au niveau du greffon (D, E), le neuroépithélium est dépourvu de précurseurs O4+. Quelques prolongements cytoplasmiques O4+, provenant vraisemblablement de corps cellulaires situés en amont et/ou en aval de la coupe, sont détectables dans la zone marginale ventrale des 2 côtés du tube neural (flèches en D et E) et dans la zone marginale latérale, du côté opposé au greffon (délimitée par les pointillés en D). C, F : Vues B et E, respectivement, contrecolorées avec un anticorps anti-GLAST. Dans la partie ventrale du tube neural, à distance du greffon (C), l'antigène GLAST est intensément exprimé dans la commissure ventrale (CV, délimitée en A), au niveau de la membrane plasmique des cellules de la *floor plate* (fp, désignée en A) et des cellules neuroépithéliales (mais plus faiblement dans la partie adjacente à la *floor plate*, entre crochets en C, que dans les régions plus dorsales). GLAST est également exprimé dans des fibres radiaires du tube neural (flèches en C). Au niveau du greffon (F), la distribution et l'intensité de la fluorescence de GLAST n'est pas modifiée par rapport à celles observée sur la coupe témoin, en C. En particulier, la région du neuroépithélium ventral dépourvue d'immunoréactivité O4 (E) exprime GLAST à un niveau similaire à celui détecté dans la coupe témoin (comparer les régions entre crochets en C et F). CV : commissure ventrale ; fp : *floor plate*.

En ce qui concerne les coupes réalisées au sein du greffon (figure 58D, E et F), lesquelles montrent une absence d'immunoréactivité O4 dans le neuroépithélium et très peu de cellules O4⁺ dans la zone marginale controlatérale (figure 58E), la distribution de GLAST est similaire à celle observée dans les coupes contrôles. En particulier, l'expression de GLAST n'est pas renforcée dans la région du neuroépithélium qui génère normalement les précurseurs des oligodendrocytes (figure 58F). Ce résultat suggère que **les précurseurs neuroépithéliaux soumis à l'influence de la protéine BMP2 n'adoptent pas le destin astrocytaire**, confirmant ainsi les résultats obtenus *in vitro*.

L'ensemble des résultats des greffes de cellules Q2bn (répertorié dans le tableau 2 p. 107) **confirme, *in vivo*, l'effet suppresseur de l'oligodrogenèse des BMPs** et indique que **ces protéines agissent** au niveau des cellules neuroépithéliales donc **avant ou au moment de la détermination du lignage**. Les résultats montrent également que **cet effet n'est pas dû à une répression de l'expression de SHH**, la protéine inductrice des précurseurs oligodendrocytaires et que, par ailleurs, **les précurseurs neuroépithéliaux ne semblent pas réorientés vers la voie astrocytaire**.

Il était à ce stade de ce travail nécessaire de savoir si les BMPs endogènes étaient capables d'exercer la même influence et donc si elles pouvaient participer à la localisation ventrale de l'oligodrogenèse. Pour ce faire nous avons réalisé des expériences visant à abolir le signal BMP produit par le tube neural dorsal et son environnement, avant la détermination des oligodendrocytes.

Les protéines BMPs sont exprimées dans la partie dorsale du tube neural et l'ectoderme sus-jacent dès E2 et au moins jusqu'à E5 (Nifuji *et al.*, 1997) où elles participent à l'élaboration des neurones dorsaux (pour revue voir Lee et Jessel, 1999). Une première approche permettant de s'affranchir du signal médié par les BMPs a consisté à retirer chirurgicalement la partie dorsale du tube neural et l'ectoderme qui le recouvre.

2. Ablation de la partie dorsale du tube neural

Comme pour les expériences *in vivo* décrites ci-dessus, les embryons sont opérés à E3 (stades HH 18 à 20). Au maximum, le quart le plus dorsal de la hauteur totale du tube neural, recouvert par l'ectoderme, est retiré, sur une longueur de 4 à 6 somites et au niveau lombaire (figure 76). Les individus sont ensuite remis en incubation jusqu'à E6,5/7,5 (stades HH 30 à 33). A ce stade, l'ectoderme du dos de l'embryon ne se reforme pas au dessus du tube neural opéré et ce dernier reste ouvert au niveau de l'excision ; l'embryon

présente donc une *spina bifida* visible extérieurement. Sur 25 embryons, 17 ont survécu et 7 ont été analysés selon la méthode présentée précédemment.

Sur les coupes transversales réalisées en amont ou en aval de la région excisée (figure 59), le patron d'oligodendrogenèse est similaire au patron normal, décrit ci-dessus (p. 76) chez des embryons non manipulés (Ono *et al.*, 1995 ; Poncet *et al.*, 1996 ; Soula *et al.*, 2001).

En revanche, au niveau des coupes effectuées au cœur de la *spina bifida* induite par l'extirpation de la région dorsale du tube neural, le patron d'oligodendrogenèse est fortement perturbé, dans tous les cas étudiés (7/7).

Premièrement, les foyers O4⁺ endogènes sont étendus dorsalement dans la moitié ventrale du neuroépithélium. Ils sont formés d'environ 10 cellules neuroépithéliales O4⁺ en moyenne (8 à 10 cellules dans la plupart des cas avec des coupes montrant de 6 à 15 cellules), toujours adjacentes (figure 60C), alors que dans les coupes contrôles, ils contiennent une moyenne de 4 cellules contiguës ou non. Le domaine neuroépithélial O4⁺ a donc une limite dorsale décalée de 6 diamètres cellulaires en moyenne par rapport à celle d'un foyer O4⁺ normal.

Deuxièmement, on observe des cellules O4⁺ en position ectopique, dispersées, à distance de ces foyers étendus, dans des régions plus dorsales du neuroépithélium (figures 60C, D, 61E et F), cellules jamais détectées dans les conditions naturelles. Ces cellules O4⁺ ectopiques restent localisées dans la moitié ventrale du neuroépithélium dans la plupart des cas (figure 60C et D). Cependant dans quelques situations, on peut en trouver dorsalement au *sulcus limitans* qui sépare morphologiquement la région ventrale de la région dorsale du tube neural (figure 61F). Certaines des cellules neuroépithéliales O4⁺ sont accompagnées de cellules O4⁺ situées dans la zone sous-ventriculaire et semblent quitter le neuroépithélium (figures 60C, D, 61E et F), suggérant la production locale d'oligodendrocytes à partir de précurseurs ectopiques.



Figure 59 : Patron d'oligodendrogenèse au stade HH 30-33 (E6,5/7,5). Immunodétection des cellules oligodendrocytaires avec l'anticorps O4 sur une coupe transversale du tube neural réalisée en amont ou en aval de l'excision, chez un embryon de poulet dont la partie dorsale du tube neural a été extirpée, *in ovo*, au stade HH 18-20 (E3). L'encart montre les différentes régions du tube neural sur cette coupe. O4 est exprimé dans 2 foyers bilatéraux du neuroépithélium ventral (NEV), limités ventralement par la *floor plate* (fp) et s'étendant au maximum sur 6 diamètres cellulaires dans la direction dorsale (crochets). Dans la zone intermédiaire ventrale (ZIV), des cellules O4+ en migration semblent provenir des foyers neuroépithéliaux et dans la zone marginale ventrale (ZMV) et latérale (ZML), des cellules O4+ apparaissent organisées selon un patron radiaire. Les flèches indiquent des vaisseaux sanguins du tube neural marqués par l'anticorps O4. CV : commissure ventrale ; fp : *floor plate* ; NED : neuroépithélium dorsal ; NEV : neuroépithélium ventral ; rp : *roof plate* ; sl : *sulcus limitans* ; ZID : zone intermédiaire dorsale ; ZIV : zone intermédiaire ventrale ; ZMD : zone marginale dorsale ; ZML : zone marginale latérale ; ZMV : zone marginale ventrale.

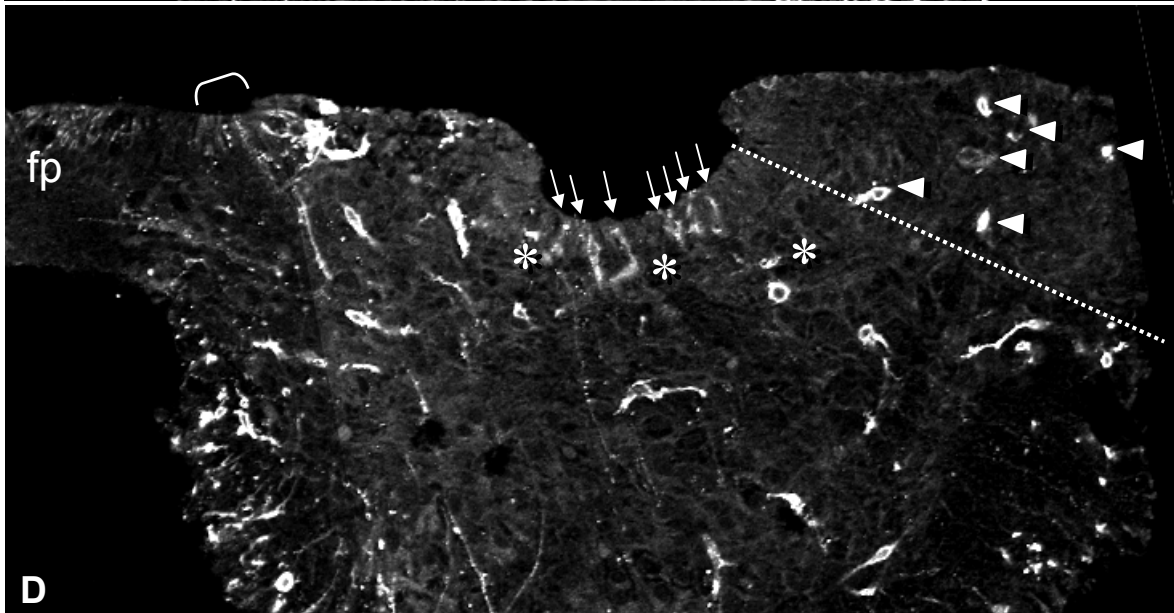
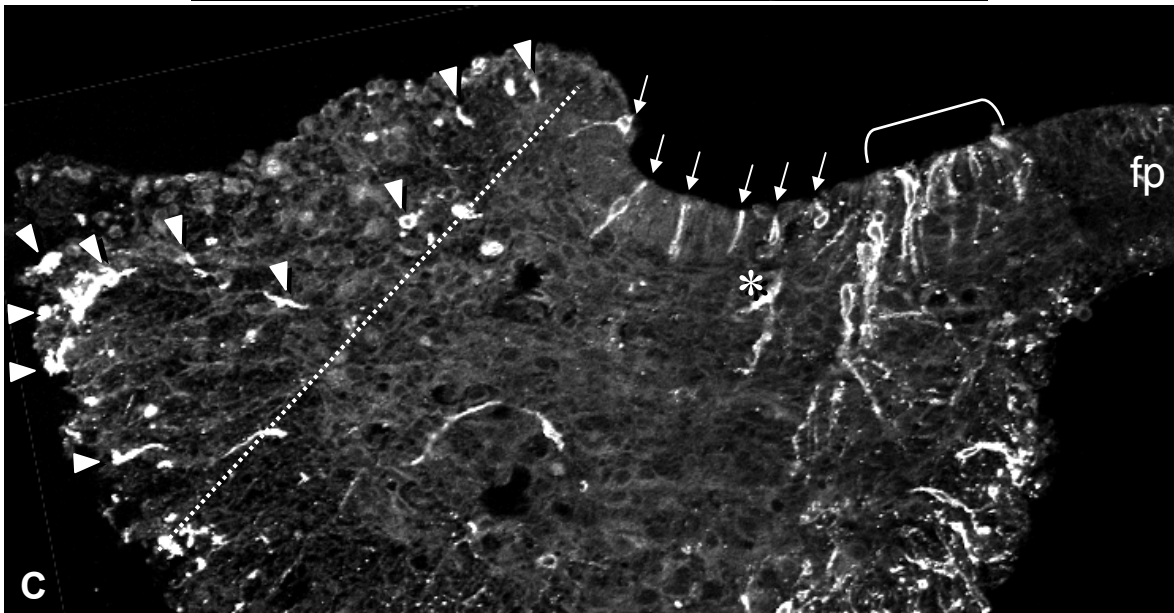
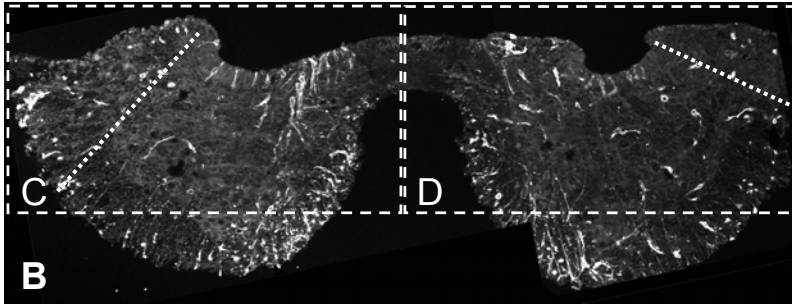
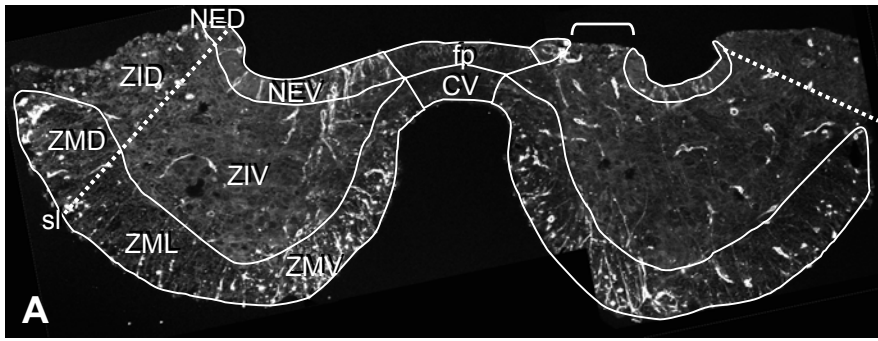


Figure 60 : Effet de l'ablation de la partie dorsale du tube neural *in vivo*. Immunodétection des cellules oligodendrocytaires avec l'anticorps O4 sur une coupe transversale du tube neural, au niveau de l'excision, au stade HH 30-33 (E6,5/7,5), chez un embryon de poulet dont la partie dorsale du tube neural a été extirpée, *in ovo*, au stade HH 18-20 (E3). A : Vue de l'ensemble de la coupe montrant la conformation du tube neural qui demeure ouvert dorsalement (coupe réalisée au sein de la *spina bifida*) et les différentes zones de ce dernier. Le *sulcus limitans* (sl, pointillés) sépare morphologiquement la partie ventrale et ce qu'il reste de la partie dorsale du tube neural (une petite portion de chacune des 3 couches, NED, ZID et ZMD, à gauche et une partie de la zone intermédiaire, ZID, à droite). Noter que dans la moitié droite de la coupe, le neuroépithélium ventral (NEV) est interrompu (crochet). B : Même image qu'en A, à plus petite échelle, indiquant en encadré, les régions agrandies en C et D. C, D : Forts grossissements des moitiés gauche (C) et droite (D) de la coupe. Les crochets montrent les foyers de précurseurs oligodendrocytaires dans le neuroépithélium, limités ventralement par la *floor plate* (fp) comme en situation normale. Dans la partie gauche du tube neural (C), le foyer endogène est étendu dans la direction dorsale. Dans la partie droite correspondante (D), ce foyer contient un nombre normal de précurseurs O4+ mais le neuroépithélium ventral (NEV) est interrompu à cet endroit (voir crochet en A). En outre, O4 est exprimé dans des cellules dispersées, localisées à distance des foyers jouxtant la *floor plate* (fp) et comprises dans la moitié ventrale du neuroépithélium (flèches en C et D). Certaines de ces cellules ectopiques sont accompagnées de cellules O4+ situées dans la zone sous-ventriculaire (astérisques en C et D), c'est à dire dans la zone intermédiaire immédiatement adjacente au neuroépithélium. Le reste de la zone intermédiaire ventrale (ZIV) contient des cellules O4+ en migration qui semblent provenir des foyers neuroépithéliaux et la zone marginale ventrale (ZMV) et latérale (ZML), des cellules O4+ organisées de façon radiaire, selon le patron d'expression de O4 chez des embryons non manipulés ou à distance de la région opérée. Cependant, des cellules O4+ sont également présentes dans les zones intermédiaire (ZID) et marginale dorsales (ZMD), normalement encore dépourvues de telles cellules à ce stade (têtes de flèches en C et D). CV : commissure ventrale ; fp : *floor plate* ; NED : neuroépithélium dorsal ; NEV : neuroépithélium ventral ; sl : *sulcus limitans* ; ZID : zone intermédiaire dorsale ; ZIV : zone intermédiaire ventrale ; ZMD : zone marginale dorsale ; ZML : zone marginale latérale ; ZMV : zone marginale ventrale.

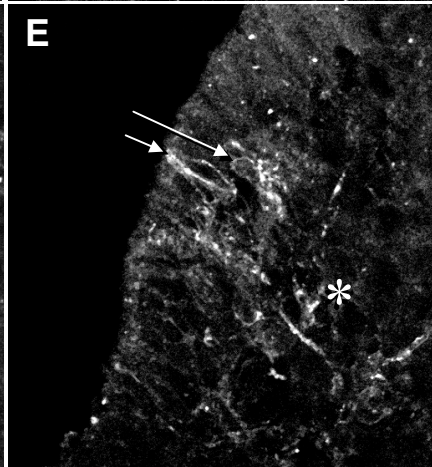
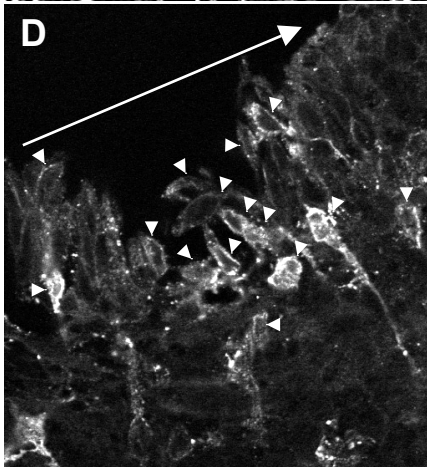
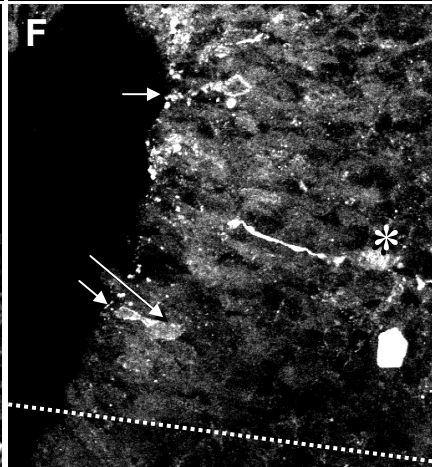
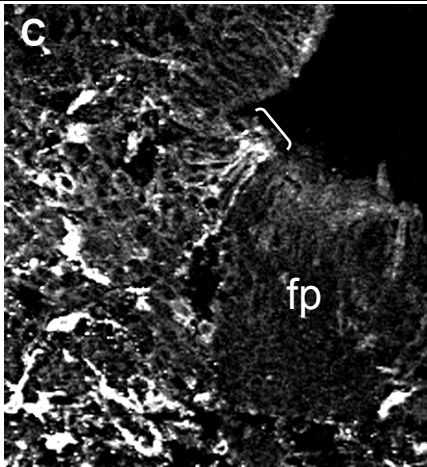
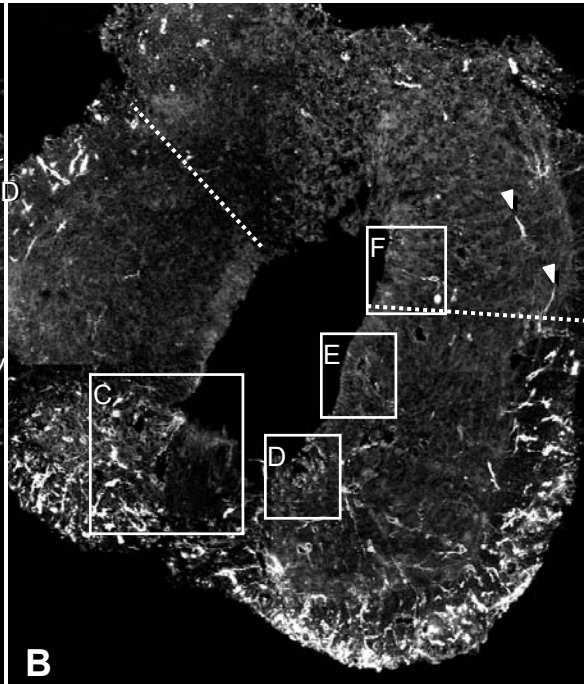
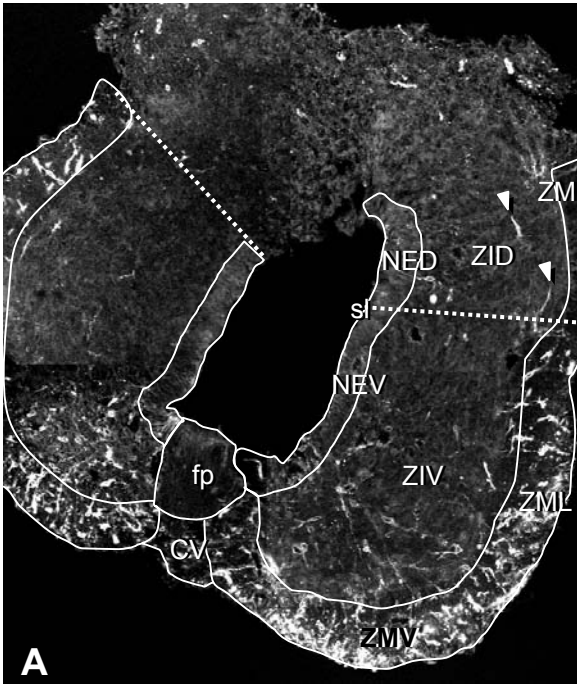


Figure 61 : Effet de l'ablation de la partie dorsale du tube neural *in vivo*. Immunodétection des cellules oligodendrocytaires avec l'anticorps O4 sur une coupe transversale du tube neural, au niveau de l'excision, au stade HH 30-33 (E6,5/7,5), chez un embryon de poulet dont la partie dorsale du tube neural a été extirpée, *in ovo*, au stade HH 18-20 (E3). A : Vue de l'ensemble de la coupe montrant la conformation du tube neural, fermé dorsalement (coupe réalisée au début ou à la fin de la région excisée, en amont ou en aval de la *spina bifida*), et les différentes zones de ce dernier. Le *sulcus limitans* (sl, pointillés) sépare morphologiquement la partie ventrale et ce qu'il reste de la partie dorsale du tube neural (une portion de chacune des 3 couches, NED, ZID et ZMD, à droite et une partie de la zone intermédiaire, ZID, à gauche). B : Même image qu'en A indiquant en encadré, les régions agrandies en C, D, E et F. C, D : Forts grossissements des foyers oligodendrogéniques endogènes (cadres C et D représentés en B), limités ventralement par la *floor plate* (fp) comme en situation normale. Dans la partie gauche du tube neural (C), le foyer contient un nombre normal de précurseurs O4+ (crochet). Dans la partie droite correspondante (D), le foyer contient un nombre de précurseurs O4+ (têtes de flèches) plus important qu'un foyer normal et semble étendu dans la direction dorsale (flèche). Cependant, les précurseurs O4+ ne sont pas contigus et organisés parallèlement les uns aux autres. Ceci résulte vraisemblablement d'un étirement de la section lors des manipulations (noter la désorganisation du neuroépithélium qui a perdu son aspect pseudostratifié à cet endroit). E, F : Forts grossissements des zones E et F, indiquées en B. Dans le neuroépithélium ventral, à distance des foyers de précurseurs oligodendrocytaires endogènes (E), et dans le neuroépithélium dorsal (dorsalement au *sulcus limitans*, F), des cellules O4+ ectopiques se sont formées (flèches en E et F). Ces cellules ectopiques sont parfois accompagnées de cellules O4+ situées dans la zone sous-ventriculaire (astérisques en E et F), c'est à dire dans la zone intermédiaire immédiatement adjacente au neuroépithélium. La distribution des cellules O4+ dans les zones intermédiaire ventrale (ZIV), marginale ventrale (ZMV) et latérale (ZML), est similaire à celle décrite chez des embryons non manipulés ou à distance de la région opérée. Cependant, la densité de ces cellules semble plus importante dans la zone marginale (ventrale et latérale) du côté droit que du côté gauche du tube neural opéré (voir A et B) et plus importante que chez des embryons témoins. Deux prolongements cytoplasmiques O4+ sont également visibles dans la zone intermédiaire dorsale droite (ZID), normalement encore dépourvue d'oligodendrocytes à ce stade (têtes de flèches en A et B). CV : commissure ventrale ; fp : *floor plate* ; NED : neuroépithélium dorsal ; NEV : neuroépithélium ventral ; sl : *sulcus limitans* ; ZID : zone intermédiaire dorsale ; ZIV : zone intermédiaire ventrale ; ZMD : zone marginale dorsale ; ZML : zone marginale latérale ; ZMV : zone marginale ventrale.

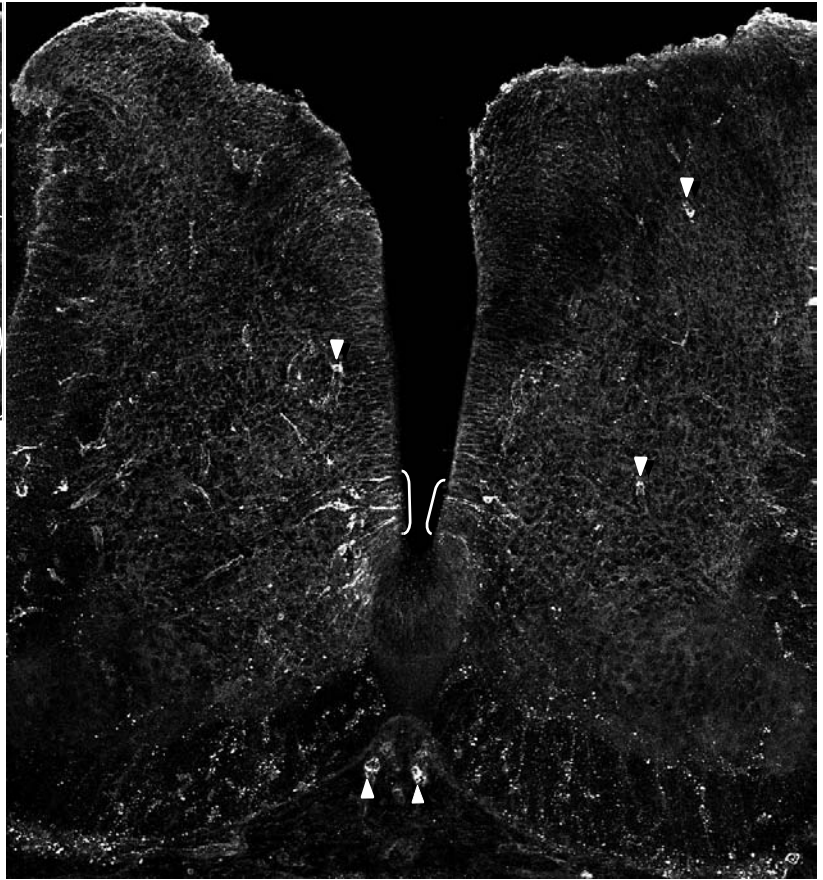
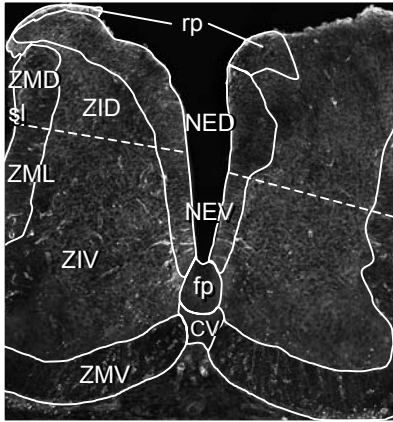
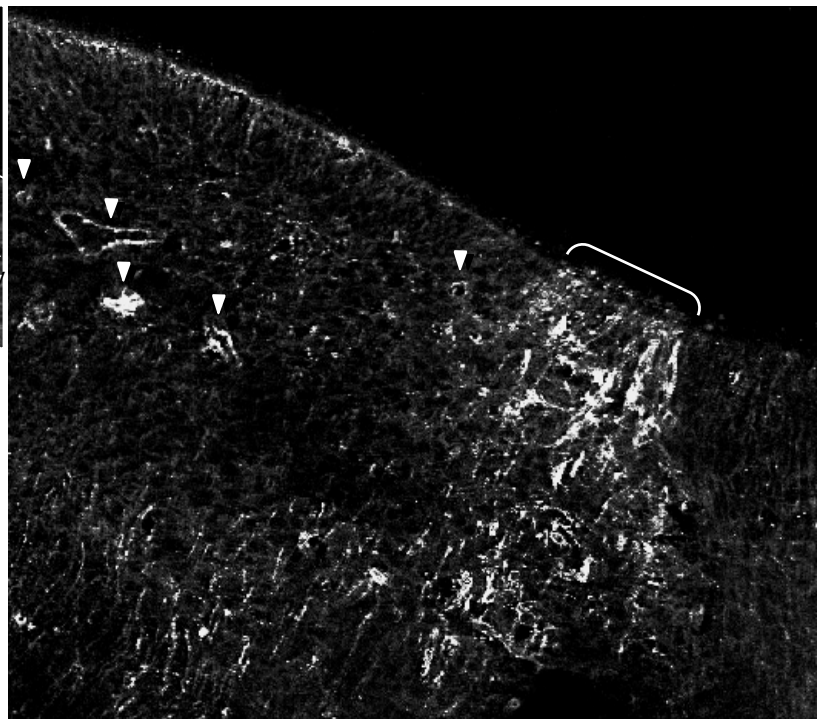
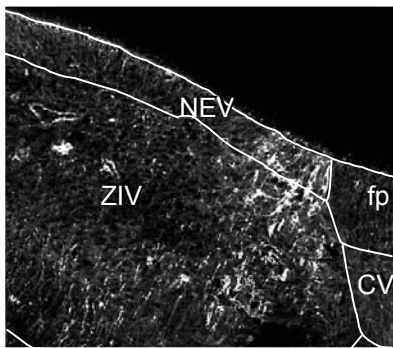
A**B**

Figure 62 : Effet d'une *spina bifida* artificielle sur l'oligodendrogenèse *in vivo*. Immunodétection des cellules oligodendrocytaires avec l'anticorps O4 sur 2 coupes transversales du tube neural, au niveau de la *spina bifida*, au stade HH 30-33 (E6,5/7,5), chez 2 embryons de poulet dont la *roof plate* a été incisée, *in ovo*, au stade HH 18-20 (E3). A : Vues d'une coupe réalisée en début ou en fin de *spina bifida* chez un embryon : les 2 moitiés du tube neural ouvert dorsalement sont rapprochées. L'image réduite à gauche montre les différentes zones du tube neural. B : Images de la partie ventrale de la moitié gauche du tube neural sur une coupe réalisée au cœur de la *spina bifida* chez un autre embryon. La vue à échelle réduite à gauche indique les régions du tube neural. Le patron d'oligodendrogenèse est normal chez ces embryons malgré la conformation adoptée par le tube neural. Les seules cellules O4+ détectées dans le neuroépithélium sont groupées en foyers localisés contre la *floor plate* (fp) et d'extension normale (crochets en A et B). La zone intermédiaire ventrale (ZIV) contient des cellules O4+ en migration qui semblent provenir des foyers neuroépithéliaux (A, B) et la zone marginale ventrale (ZMV) et latérale (ZML), des cellules O4+ organisées de façon radiaire (A), selon le patron d'expression de O4 chez des embryons non manipulés. En A, les cellules O4+ hors du neuroépithélium sont peu visibles en raison d'une immunodétection de mauvaise qualité (marquage punctiforme). Les zones intermédiaire (ZID) et marginale dorsales (ZMD), sont dépourvues de cellules O4+. Noter le marquage des vaisseaux sanguins du tube neural par O4 (têtes de flèches en A et B). CV : commissure ventrale ; fp : *floor plate* ; NED : neuroépithélium dorsal ; NEV : neuroépithélium ventral ; sl : *sulcus limitans* ; rp : *roof plate* ; ZID : zone intermédiaire dorsale ; ZIV : zone intermédiaire ventrale ; ZMD : zone marginale dorsale ; ZML : zone marginale latérale ; ZMV : zone marginale ventrale.

Troisièmement, lorsque l'extension dorsale des foyers O4⁺ est très importante et accompagnée de l'apparition de nombreuses cellules O4⁺ ectopiques dans le neuroépithélium, la densité des oligodendrocytes en cours de maturation dans la zone marginale latérale et ventrale est nettement accrue par rapport à celle observée dans des moelles épinières contrôle (comparer les zones marginales droite et gauche de la moelle épinière figure 61A et B). En outre, dans certains cas, les zones intermédiaire et marginale dorsales contiennent des cellules O4⁺, cellules non encore présentes dans ces régions à ce stade en situation normale (figures 60C, D, 61A et B).

Ces modifications du patron d'oligodendrogenèse concernent l'ensemble de la moelle épinière pour la plupart des embryons opérés (5/7) (figure 60) et un seul côté, pour 2 d'entre eux (2/7) (figure 61), où l'ablation a été essentiellement unilatérale.

Pour s'assurer que la *spina bifida* en elle-même n'est pas suffisante pour affecter l'oligodendrogenèse, le tube neural d'embryons de 3 jours de développement a été ouvert dorsalement, *in ovo*, par simple incision de la *roof plate* sur une longue distance s'étendant du niveau brachial au niveau lombaire. Dans ces conditions, la moelle épinière reste ouverte au niveau de l'opération. L'analyse de 2 embryons ainsi manipulés, réalisée à E6,5/7,5 comme précédemment, ne montre aucune différence dans la distribution des cellules O4⁺ par rapport à celle décrite chez des embryons non opérés (figure 62A et B).

L'ablation de la partie dorsale du tube neural entraîne donc **l'extension dorsale des foyers oligodendrogéniques et l'apparition de précurseurs oligodendrocytaires ectopiques, dans le neuroépithélium intermédiaire et dorsal**, parfois accompagnés de cellules O4⁺ localisées dans la zone sous-ventriculaire adjacente. Nos résultats montrent, ainsi la **présence, dans le tube neural dorsal et/ou l'ectoderme sus-jacent, de facteurs responsables de la restriction ventrale du territoire oligodendrogénique**. Ces signaux dorsaux inhibiteurs de l'oligodendrogenèse **agissent au moment de la spécification du lignage** puisque leur abolition augmente le nombre de précurseurs oligodendrocytaires neuroépithéliaux.

Nous avons ensuite cherché à savoir si l'inactivation spécifique du signal BMP endogène pouvait mimer l'effet de l'ablation de la région dorsale du tube neural sur l'oligodendrogenèse.

3. Greffe de cellules produisant Noggin entre le tube neural dorsal et les somites

Nous avons utilisé des cellules de la lignée CHO transfectées de façon stable avec un vecteur d'expression portant la région codante de la protéine Noggin (Lamb *et al.*, 1993), un antagoniste naturel de certaines BMPs. Ces cellules seront appelées CHO-Noggin. Afin de tenter d'inhiber, au moins en partie et spécifiquement, le signal BMP dans le tube neural avant la détermination des précurseurs oligodendrocytaires, des agrégats de cellules CHO-Noggin ont été greffés contre le tube neural, sur une longueur de 1 à 4 somites, *in ovo*, selon une procédure similaire à celle employée lors des greffes de fibroblastes produisant la protéine BMP2 (figure 75). Les agrégats cellulaires, préalablement marqués au DiI, sont introduits dans une incision réalisée, d'un côté, entre le tube neural thoraco-lombaire et les somites, chez des embryons de 3 jours de développement (stades HH 18 à 20). A la différence des greffes de cellules produisant la protéine BMP2, les amas de cellules sécrétant Noggin sont placés le plus dorsalement possible, les protéines BMPs étant exprimées dans la partie dorsale du tube neural et dans l'ectoderme qui le recouvre.

Comme pour les autres expériences menées *in ovo*, les embryons greffés se développent jusqu'à E6,5-7,5 (stades HH 30 à 33), stade auquel la région d'intérêt est prélevée et fixée. Des coupes transversales de ces échantillons sont ensuite réalisées et soumises à une immunodétection avec l'anticorps O4 afin d'analyser les effets du blocage de la signalisation BMP sur l'oligodendrogenèse. Sur 36 embryons opérés, 19 ont survécu et ont été analysés, parmi lesquels 12 ont donné des résultats exploitables. Les témoins de ces expériences consistent en des coupes de moelle épinière d'embryons non manipulés ou des coupes réalisées en amont et en aval du greffon.

Sur les coupes témoins, le patron d'oligodendrogenèse est normal (figure 63A) (Ono *et al.*, 1995 ; Poncet *et al.*, 1996 ; Soula *et al.*, 2001) et tel que nous l'avons déjà décrit (*cf.* p. 76).

Pour 5 des 12 individus greffés, le patron d'oligodendrogenèse n'apparaît pas modifié sur les coupes effectuées au niveau du greffon par rapport à ce qu'on l'on observe sur des coupes témoins (non montré). Chez ces embryons, issus de trois expériences indépendantes, le greffon, fluorescent, était pourtant retrouvé contre la paroi externe du tube neural sur toute sa hauteur selon l'axe dorso-ventral.

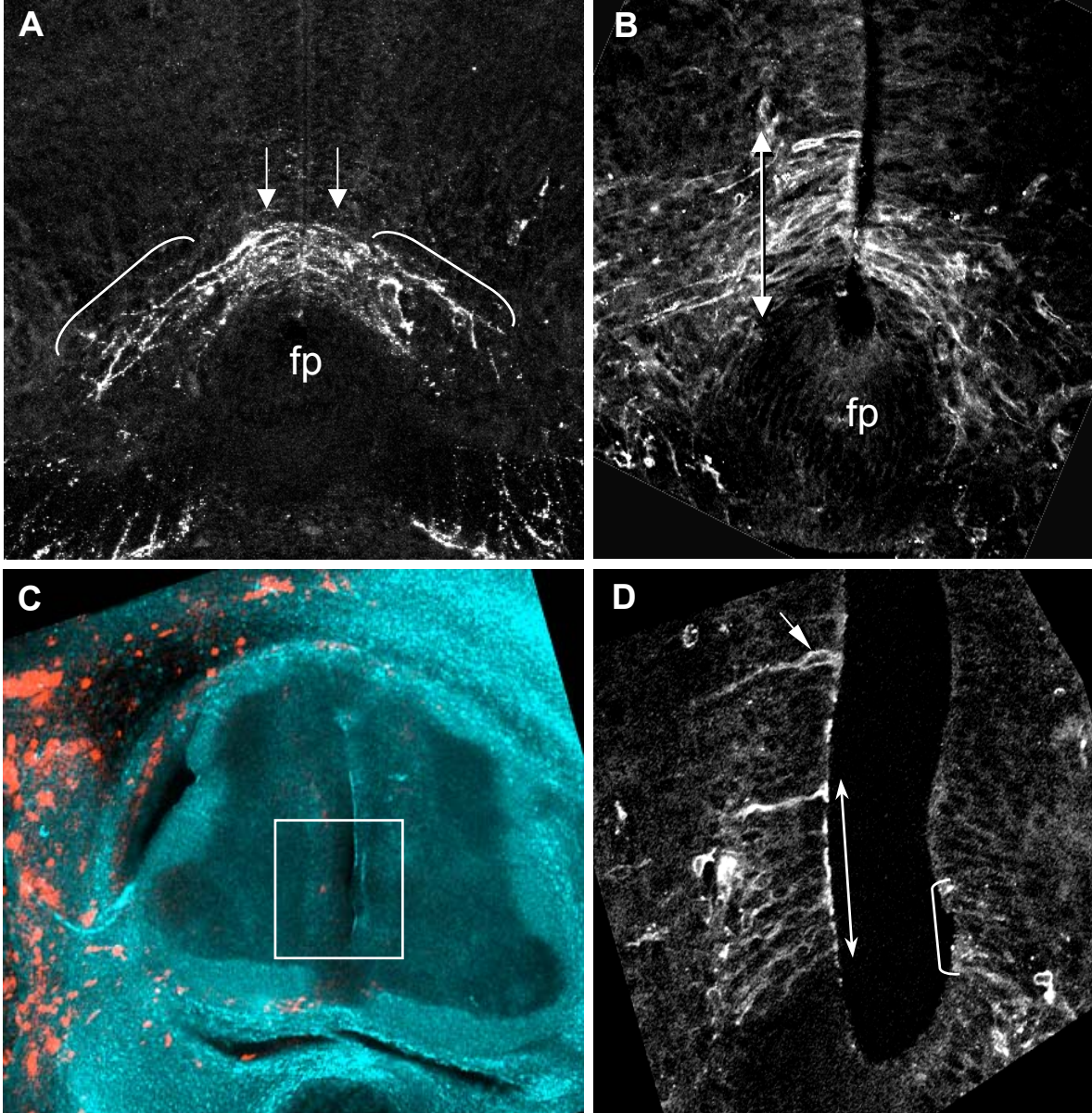


Figure 63 : Effet de l'inactivation du signal BMP par la protéine Noggin sur l'oligodrogenèse *in vivo*. Coupes transversales du tube neural au stade HH 30-33 (E6,5/7,5), en amont ou en aval du greffon (A) et au sein du greffon (B, C, D), chez 2 embryons de poulet ayant reçu une greffe d'agrégats de cellules produisant Noggin entre le tube neural et les somites, *in ovo*, au stade HH 18-20 (E3). Immunodétection des cellules oligodendrocytaires avec l'anticorps O4 sur des coupes transversales du tube neural au stade HH 30-33. A, B : Vues, en immunofluorescence pour l'antigène O4, de la moitié ventrale du neuroépithélium chez un embryon. Hors de la zone du greffon (A), O4 est exprimé dans deux foyers bilatéraux de précurseurs oligodendrocytaires localisés dans la partie la plus ventrale du neuroépithélium, contre la *floor plate* (fp) et s'étendant sur 6 diamètres cellulaires dans la direction dorsale (flèches). O4 marque également quelques cellules en migration situées dans le quart ventral de la zone du manteau ou zone intermédiaire (crochets) et de nombreuses cellules de la zone marginale ventrale (visibles dans les coins inférieurs droit et gauche de l'image) et latérale (non visibles sur cette image) de la moelle épinière en développement. Au niveau du greffon qui flanque le côté gauche de tube neural (B), le foyer neuroépithélial O4+ ipsilatéral est étendu dorsalement (double flèche) et sa hauteur est environ du double de celle du foyer controlatéral. Ce foyer modifié est accompagné de cellules O4+ en migration, localisées dans la zone du manteau, sur toute son étendue. C, D : Coupe réalisée au niveau du greffon, chez un autre embryon. C : Superposition d'images en fond noir (fausse couleur bleue) et en fluorescence pour le Di-I (rouge), avec lequel les cellules CHO-Noggin ont été marquées avant la greffe. Les cellules greffées bordent le tube neural, du côté gauche, sur toute sa hauteur selon l'axe dorso-ventral. D : Vue agrandie et en immunofluorescence pour l'antigène O4 du cadre en C. Du côté opposé au greffon, le foyer oligodendrogénique est formé de 4 cellules O4+ (crochet). Du côté du greffon, le foyer O4+ s'étend sur 8 diamètres cellulaires selon l'axe dorso-ventral (double flèche) et une cellule O4+ ectopique apparaît à 6 corps cellulaires du foyer modifié (flèche). fp : *floor plate*.

Les 7 autres embryons présentent une expansion dorsale du foyer endogène de cellules neuroépithéliales O4⁺ du côté du greffon, dont la taille correspond environ au double de celle d'un foyer normal, dans la plupart des cas (figure 63B et D). De plus, le foyer oligodendrogénique modifié est bordé par des cellules O4⁺ localisées dans la zone du manteau de la moelle épinière, sur toute sa hauteur selon l'axe dorso-ventral (figure 63B et D), indiquant une production accrue d'oligodendrocytes du côté affecté. Enfin, parmi ces 7 cas, 4 montrent la présence de quelques cellules neuroépithéliales O4⁺ ectopiques, situées à plusieurs corps cellulaires de distance, dorsalement au foyer O4⁺ étendu (figure 63D).

Dans tous les cas examinés, nous n'avons pas observé de cellules O4⁺ ectopiques au delà du *sulcus limitans*.

En résumé, l'expression de la protéine Noggin au voisinage du tube neural, avant la détermination des oligodendrocytes, conduit à l'expansion dorsale des foyers O4⁺ et, dans certains cas, à l'apparition de précurseurs O4⁺ ectopiques dans des régions plus dorsales du neuroépithélium. Cependant, 5 embryons sur 12 ont un patron d'oligodendrogenèse inchangé malgré la présence d'un greffon de cellules exprimant Noggin contre le tube neural, suggérant que l'apport de cette protéine au niveau des cellules cibles n'était pas suffisant. Quoi qu'il en soit, nos résultats indiquent que les cellules neuroépithéliales restent sensibles aux signaux de l'environnement jusqu'au moment de la détermination des précurseurs oligodendrocytaires.

Les résultats de ces expériences de greffe de cellules exprimant la protéine Noggin montrent que **la réduction de l'activité BMP dans la moelle épinière en développement aboutit à la formation de précurseurs oligodendrocytaires surnuméraires, indiquant que les BMPs endogènes font partie des facteurs dorsaux inhibiteurs de l'oligodendrogenèse**, mis en évidence par l'excision de la partie dorsale du tube neural.

L'ensemble des résultats de cette première partie de ma thèse a permis de compléter les données concernant les mécanismes qui gouvernent la mise en place des oligodendrocytes dans le tube neural. Il était bien établi que la genèse de ces cellules, à partir d'une région précise du neuroépithélium ventral, était sous le contrôle positif du morphogène SHH sécrété dans la partie la plus ventrale du tube neural. Les présents travaux ont conduit à **caractériser les protéines BMPs exprimées dans la partie dorsale du tube neural comme inhibitrices de la spécification des oligodendrocytes**. Nous savons maintenant que **les BMPs participent à la régulation de l'émergence du lignage**

oligodendrocytaire dans la moelle épinière en développement, en fixant la limite dorsale de la région productrice des précurseurs oligodendrocytaires.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés au mode d'action des protéines BMPs. Nous souhaitons, d'une part préciser le concept d'antagonisme BMP/SHH et d'autre part, savoir si l'expression des facteurs de transcription localisés dans la zone d'origine des oligodendrocytes était régulée par les BMPs. En d'autres termes, nous voulions comprendre comment les cellules neuroépithéliales interprétaient le signal BMP.

B. ETUDE DU MODE D'ACTION DES BMPs DANS LA REGULATION DE L'OLIGODENDROGENESE

I. Effet de BMP4 sur l'induction des oligodendrocytes par SHH *in vitro*

1. Effet de BMP4 sur le neuroépithélium ventral stimulé par SHH avant la spécification oligodendrocytaire

Des données récentes ont démontré que le signal médié par la protéine SHH était requis pour la spécification des oligodendrocytes (Orentas *et al.*, 1999 ; Soula *et al.*, 2001). La suppression de l'oligodendrogenèse résultant des greffes de cellules exprimant la protéine BMP2 contre le tube neural ventral suggère que les BMPs seraient capables de contrecarrer l'effet inducteur de SHH sécrétée par la *floor plate*. Cet antagonisme s'exerce vraisemblablement en aval de la production de SHH puisque nous avons montré que l'expression de cette protéine n'est pas modifiée en présence du greffon de cellules Q2bn-BMP2. Les BMPs affectent peut-être la diffusion de SHH ou la réception du signal SHH par exemple en altérant la compétence des cellules neuroépithéliales. Il est encore possible que leur voie de signalisation interfère avec celle de SHH. A l'appui de cette dernière hypothèse, les travaux de Liem et collègues indiquent que les BMPs modulent la réponse des cellules neurales à SHH et suggèrent que cet effet s'exerce à une étape précoce de la transduction du signal SHH (Liem *et al.*, 2000). Il est aussi envisageable que les BMPs et SHH agissent de manière opposée sur des cibles transcriptionnelles communes. Afin d'essayer de définir les modalités de l'antagonisme BMP/SHH, nous avons réalisé des expériences de culture d'explants de neuroépithélium ventral, prélevés avant la détermination des oligodendrocytes, en présence de ces deux facteurs.

Les explants de neuroépithélium ventral sont disséqués à partir de coupes transversales de tube neural d'embryons de 4,5-5 jours de développement (stades HH 25 et

26), selon la technique de microdissection mise au point par Cathy Soula au laboratoire (Soula *et al.*, 2001). Ils sont prélevés à distance du *sulcus limitans*, de la *floor plate* et de la zone du manteau de la moelle épinière et sont donc composés de la partie ventrale du domaine exprimant Pax6 et de la quasi totalité du domaine exprimant Nkx2.2 qui jouxte la *floor plate*. Ainsi, chaque explant contient la future région oligodendrogénique isolée de l'influence des tissus environnants. Des expériences précédentes ont montré que le tissu excisé ne contenait jamais de cellules de *floor plate* (Soula *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'observation d'explants de neuroépithélium après quelques jours de culture et marquage par immunofluorescence de divers types cellulaires en microscopie confocale montre que ces explants se referment sur eux-mêmes formant une structure en «rosette» rappelant l'allure pseudostratifiée du neuroépithélium *in vivo* et que les cellules neurales se différencient autour de cette rosette dans toutes les directions.

Les explants de neuroépithélium ventral sont cultivés sur un gel de collagène comme pour les expériences *in vitro* présentées dans la première partie, en présence de 12 nM du fragment N-terminal recombinant de la protéine SHH humaine et en présence ou non, de 0,6 nM de protéine BMP4 recombinante humaine, pendant 2 jours. Des analyses antérieures ont montré que SHH induit le développement des oligodendrocytes de manière dose-dépendante, la concentration optimale étant de 12 nM dans notre système (Soula *et al.*, 2001). L'effet de ce traitement sur l'oligodendrogenèse est analysé après immunodétection de l'antigène O4 dans les cultures réalisées au cours de 6 expériences indépendantes. Dans une expérience, les explants ont été cultivés pendant 7 jours afin d'évaluer le développement des oligodendrocytes différenciés, au moyen de la détection de la protéine protéolipide PLP/DM20 par immunohistochimie avec l'anticorps AA3.

Comme précédemment décrit (Soula *et al.*, 2001), le neuroépithélium ventral cultivé seul ne produit pas un nombre significatif d'oligodendrocytes à ce stade (figure 64A). Plus de 70% des explants sont négatifs *-i. e.* ont généré moins de 10 cellules O4⁺ (figure 64E) et le nombre moyen de cellules O4⁺ est de 8 par explant, pour l'ensemble des explants (figure 64F). La présence de ces rares cellules O4⁺ indique que dans certains cas la détermination des précurseurs oligodendrocytaires a déjà été amorcée ou que quelques explants contiennent des cellules susceptibles de produire la protéine SHH. Il a, en effet, tout récemment été montré que les cellules neuroépithéliales du domaine Nkx2.2 expriment SHH (Charrier *et al.*, 2002). Dans ces explants témoins, on ne détecte pas de cellules exprimant l'isoforme DM20 de la protéine PLP (figure 65A).

O4 (2 jdc)

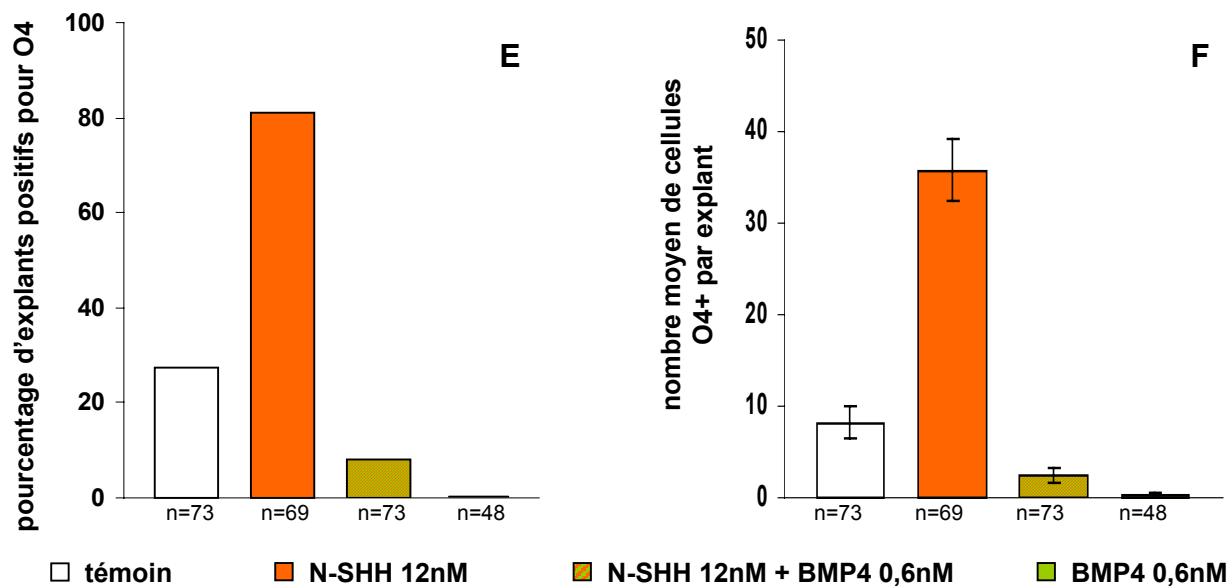
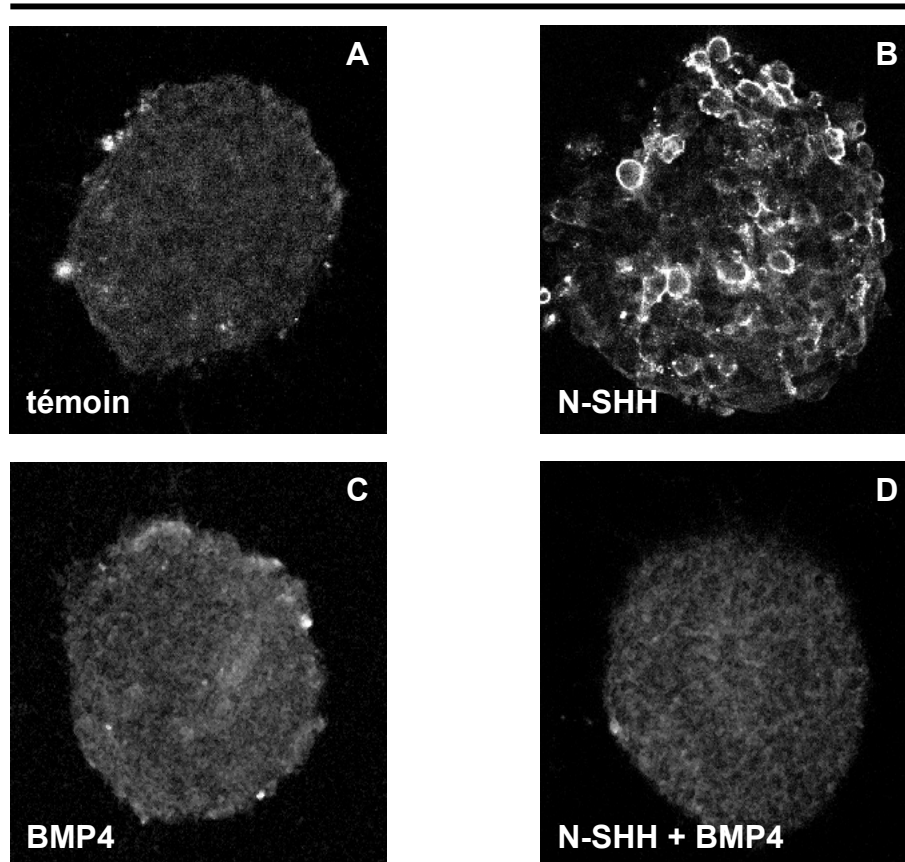


Figure 64 : Effet de la protéine BMP4 (0,6 nM) sur le développement des oligodendrocytes dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 25-26 (E4,5/5). A, B, C, D : Immunofluorescence de l'antigène O4 après 2 jours de culture (jdc) dans les explants contrôles (A), traités par N-SHH seule (B), BMP4 seule (C), ou cotraités par N-SHH et BMP4 (D). En absence de traitement (A), comme sous l'effet de BMP4 (C), les explants ne produisent pas de cellules oligodendrocytaires. Le traitement par 12 nM de N-SHH entraîne le développement de ces cellules (B). En présence simultanée de N-SHH et de BMP4, les cultures sont dépourvues de cellules O4+ (D). E, F : Quantification de l'effet inhibiteur de BMP4. E : Représentation graphique du nombre d'explants positifs, c'est à dire produisant au moins 10 cellules O4+, exprimé en pourcentage du nombre total d'explants (n) dans chaque condition de traitement, après 2 jours de culture. F : L'histogramme montre le nombre moyen de cellules O4+ par explant en fonction de différents traitements, après 2 jours *in vitro*. n : nombre total d'explants cultivés au cours de 6 expériences indépendantes. Les barres d'erreur représentent l'écart standard à la moyenne ou esm.

PLP/DM20 (7 jdc)

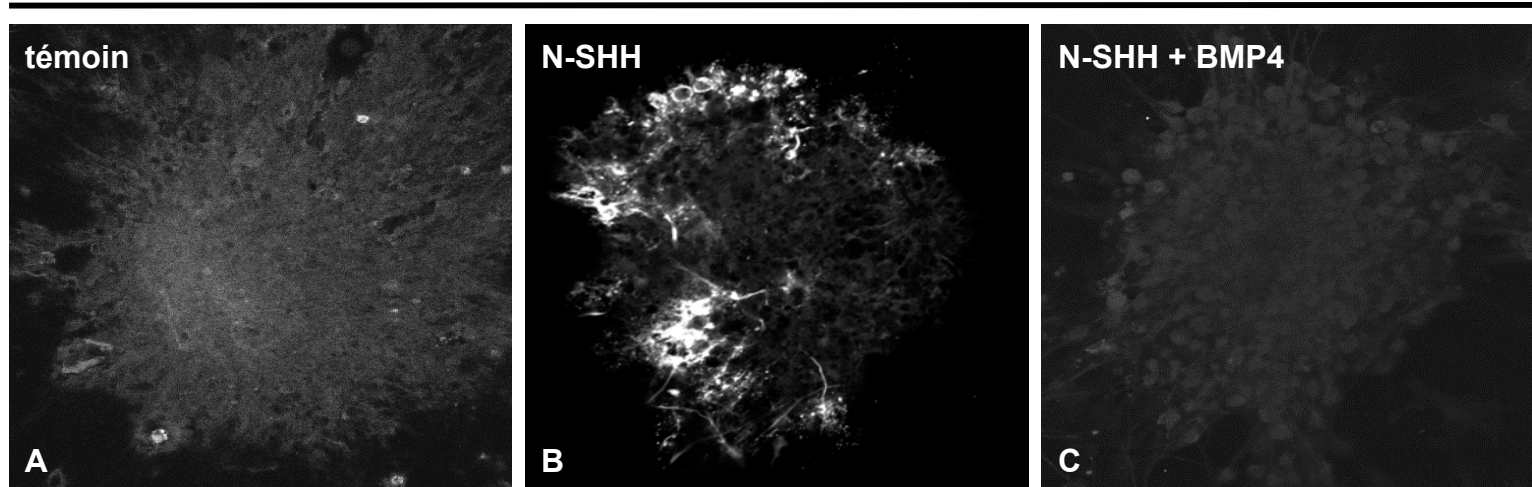


Figure 65 : Effet de la protéine BMP4 (0,6 nM) sur le développement des oligodendrocytes dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 25-26 (E4,5/5). A, B, C : Détection de l'antigène PLP/DM20 à l'aide de l'anticorps AA3, après 7 jours de culture (jdc), dans les explants contrôles (A), traités par 12 nM de N-SHH (B), ou cotraités par 12 nM de N-SHH et 0,6 nM de BMP4 (C). En absence de traitement (A), les explants ne produisent pas d'oligodendrocytes. Sous l'effet de SHH, le développement des oligodendrocytes est stimulé (B). En présence simultanée de SHH et de BMP4, les cultures sont dépourvues de cellules exprimant l'isoforme PLP/DM20 de la protéine protéolipide (C).

Il est intéressant de constater que le traitement des cultures par 0,6 nM de BMP4 réduit pratiquement à zéro cette production résiduelle de cellules O4⁺ (figure 64C, E et F).

Sous l'effet d'un traitement par la protéine SHH à 12 nM, les explants produisent de nombreuses cellules O4⁺ (figure 64B). Plus de 80% d'entre eux sont positifs et l'on compte en moyenne 36 cellules O4⁺ par explant, pour la totalité des explants (figure 64E et F). Dans les cultures fixées après 7 jours, on peut également détecter de nombreuses cellules marquées par l'anticorps AA3, qui présentent la morphologie typique d'oligodendrocytes différenciés (figure 65B).

Lorsque le neuroépithélium ventral est soumis à l'effet de SHH et de BMP4, la production de cellules O4⁺ est très fortement diminuée (figure 64D). 92% des explants cotraités avec 12 nM de SHH et 0,6 nM de BMP4 sont négatifs et le nombre moyen de cellules O4⁺ est d'environ 3 par explant, pour l'ensemble des explants (figure 64E et F). Dans ces cultures, il ne se développe pas non plus d'oligodendrocytes matures comme le montre l'immunodétection avec l'anticorps AA3 (figure 65C).

Les résultats de ces expériences de culture montrent que la protéine BMP4 cause une réduction drastique du nombre de cellules du lignage oligodendrocytaire, détectées par les marqueurs précoce (O4) et tardif (AA3), dans le neuroépithélium ventral stimulé par SHH. Cette diminution concerne à la fois le nombre d'oligodendrocytes dans l'ensemble des cultures et le nombre d'explants capables de développer ces cellules. L'inhibition observée est quasi-totale, même à la dose de SHH qui entraîne une production optimale d'oligodendrocytes.

L'ensemble de ces données confirme ainsi l'idée que **BMP4 est capable d'empêcher l'induction des oligodendrocytes par SHH** et indique que BMP4 agit alors que SHH est disponible dans l'environnement des précurseurs. Elles renforcent, en outre, la notion selon laquelle les BMPs agissent au moment de la détermination des précurseurs oligodendrocytaires. Nous avons ensuite réalisé une expérience afin de savoir si BMP4 pouvait aussi agir sur des oligodendrocytes déterminés.

2. Effet de BMP4 sur le neuroépithélium ventral après la spécification oligodendrocytaire

Des explants de neuroépithélium ventral ont été disséqués de la même façon que pour les expériences précédentes, mais à E6 (stade HH 29), après que la détermination des précurseurs des oligodendrocytes ait été initiée. Ces explants ont été cultivés pendant 2

jours en présence de BMP4 à la concentration de 0,6 nM, puis ont été soumis à une immunodétection avec l'anticorps O4.

Comme il a déjà été montré (Soula *et al.*, 2001), le neuroépithélium ventral de 6 jours de développement génère un nombre important de cellules O4⁺ (figure 66A). En effet, une grande majorité d'explants (88%) produit au moins 10 cellules O4⁺ et le nombre moyen de ces cellules est d'environ 40 par explant, considérant la totalité des explants (figure 66C et D).

En présence de BMP4, le nombre d'explants positifs et le nombre moyen d'oligodendrocytes par explant sont réduits (figure 66B). Environ la moitié des explants traités contiennent un minimum de 10 cellules O4⁺ avec un nombre moyen de 14 figures positives par explant, pour l'ensemble des explants (figure 66C et D).

Les résultats indiquent que **BMP4 inhibe également la formation des oligodendrocytes après que la détermination du lignage ait été amorcée mais**, dans ces conditions, **l'inhibition observée n'est jamais totale**. Ceci suggère que BMP4 reste sans effet sur une partie des cellules du lignage oligodendrocytaire, qui pourraient correspondre aux cellules exprimant déjà O4 au moment du traitement, donc plus avancées dans leur programme de différenciation.

L'ensemble de nos résultats montre que les BMPs bloquent complètement l'oligodendrogenèse dans le tube neural ventral avant que la spécification des oligodendrocytes n'ait débuté, même en présence d'une concentration optimale de la protéine inductrice SHH, mais que ces facteurs n'inhibent pas totalement l'oligodendrogenèse après que la spécification oligodendrocytaire ait été initiée. Ceci confirme que **les BMPs interviennent principalement au moment de la détermination des précurseurs neuroépithéliaux dans la voie oligodendrocytaire**.

II. Effet de BMP4 sur l'expression de facteurs de transcription dans le neuroépithélium ventral

De façon à obtenir des indications sur le mode d'action des BMPs dans l'inhibition de l'oligodendrogenèse, il était intéressant d'étudier l'effet de ces protéines sur l'expression de certains facteurs de transcription du neuroépithélium ventral et en particulier, sur l'expression de ceux présents dans les précurseurs oligodendrocytaires. Ces travaux pouvaient en outre permettre d'identifier les facteurs nécessaires à la détermination de ces

O4 (2 jdc)

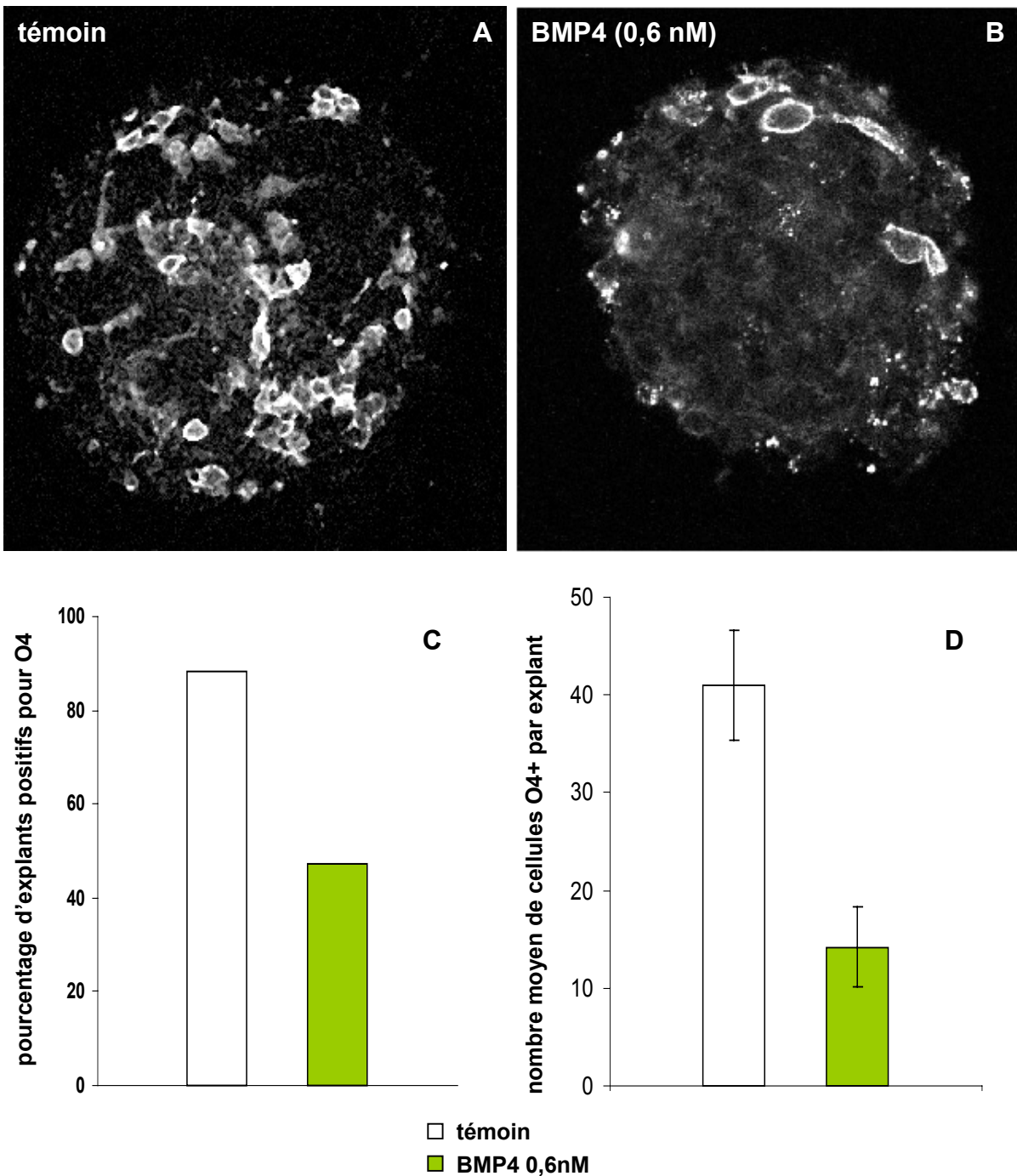


Figure 66 : Effet de la protéine BMP4 (0,6 nM) sur le développement des oligodendrocytes dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 29 (E6). A, B : Immunofluorescence de l'antigène O4 après 2 jours de culture (jdc) dans les explants contrôles (A) et traités par BMP4 (B). En absence de traitement (A), les explants produisent un nombre important de cellules oligodendrocytaires. En présence de BMP4 (B), le nombre de ces cellules est diminué. C, D : Quantification de l'effet inhibiteur de BMP4. C : Représentation graphique du nombre d'explants positifs, c'est à dire contenant au moins 10 cellules O4+, exprimé en pourcentage du nombre total d'explants cultivés seuls (n = 17) ou en présence de 0,6 nM de BMP4 (n = 19), pendant 2 jours. D : L'histogramme représente le nombre moyen de cellules O4+ par explant, en absence (n = 17) et en présence de BMP4 à la concentration de 0,6 nM (n = 19), après 2 jours *in vitro*. Les résultats sont issus de 6 cultures réalisées au cours d'une expérience unique. Les barres d'erreur représentent l'écart standard à la moyenne ou esm.

cellules. Pour ce faire, nous avons réitéré les expériences de culture d'explants de neuroépithélium ventral prélevés avant et après l'initiation de la détermination des oligodendrocytes, en présence de BMP4 et/ou de SHH, (voir p. 91 et 93) et examiné l'expression de Pax6, Nkx2.2 et Olig2.

De manière générale, ces facteurs de transcription sont exprimés dans des cellules organisées en rosettes au cœur des explants de neuroépithélium ventral (cellules neuroépithéliales) ainsi que dans des cellules dispersées autour de ces rosettes, plus à la surface des explants (cellules ayant migré hors du neuroépithélium). Les cellules situées dans les rosettes sont plus faiblement marquées pour l'expression de ces facteurs de transcription que celles qui en dérivent, reflétant ce que l'on observe *in vivo*. Les différents traitements administrés ne semblent pas altérer cette organisation générale des cellules exprimant Pax6, Nkx2.2 ou Olig2 au sein des explants. Nous avons donc compté l'ensemble des noyaux marqués sans tenir compte de leur localisation dans les explants.

1. Effet de BMP4 sur l'expression de Pax6 dans le neuroépithélium ventral *in vitro*

Chez le poulet, les précurseurs oligodendrocytaires sont localisés dans le domaine d'expression de Nkx2.2 mais jamais dans le domaine exprimant Pax6 adjacent (Soula *et al.*, 2001), ce qui pourrait suggérer que Pax6 inhibe la spécification des oligodendrocytes dans cet organisme. Nous avons alors pensé que l'inhibition de l'oligodendrogenèse médiée par les BMPs pouvait résulter d'une induction de l'expression de Pax6. Afin de tester cette possibilité, l'expression de cette protéine a été analysée dans notre système d'induction/répression de la spécification des oligodendrocytes dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral.

a. Avant la détermination des oligodendrocytes

Tous les explants cultivés seuls contiennent de nombreux noyaux cellulaires Pax6⁺ (figure 67A, tableau 1), montrant que le maintien de l'expression de Pax6 ne nécessite pas la présence des tissus environnants. Les cultures présentent en moyenne environ 150 noyaux marqués par explant (figure 67E, tableau 1). Comme décrit précédemment, de rares cellules O4⁺ se développent dans ces cultures témoins (figure 64E et F).

En présence de 12 nM de protéine SHH, la quasi-totalité des explants (83,3%) présente également de nombreux noyaux Pax6⁺ et la quantité moyenne de ces noyaux par explant, explants positifs et négatifs confondus, n'est pas significativement modifiée (figure 67B et E, tableau 1). De nombreux oligodendrocytes se développent dans la plupart

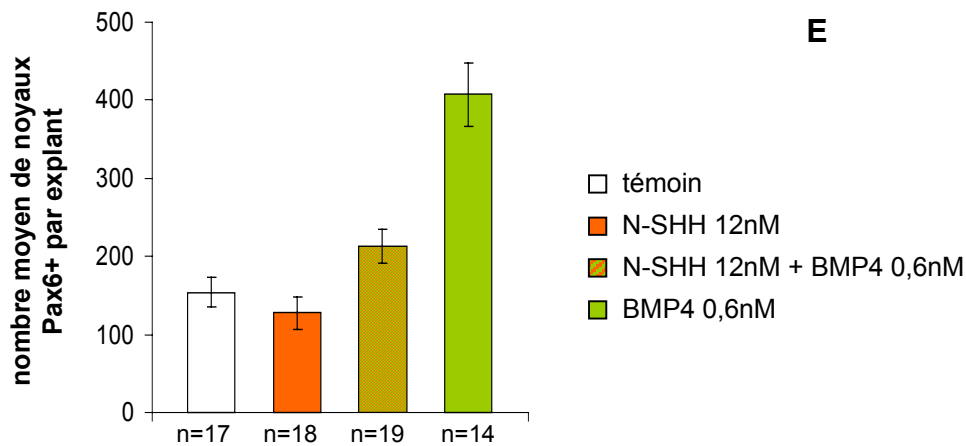
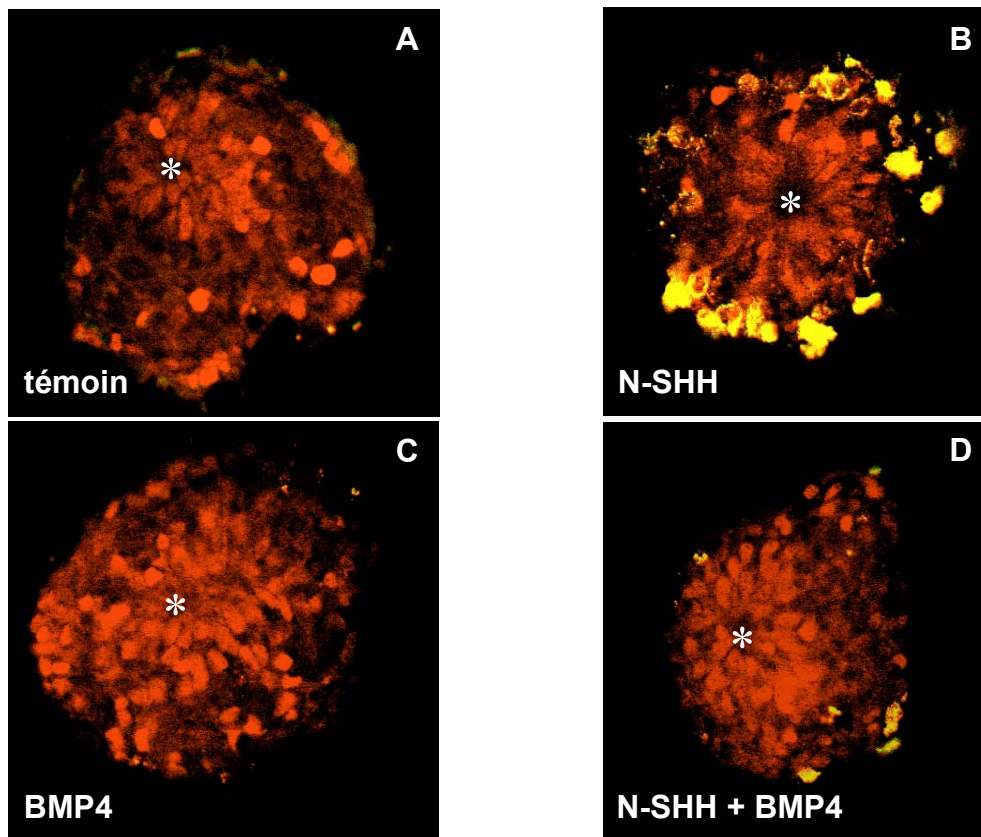


Figure 67 : Effet de la protéine BMP4 (0,6 nM) sur le développement des oligodendrocytes et l'expression de Pax6 dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 25-26 (E4,5/5). A, B, C, D : Double immunofluorescence de l'antigène O4 (fluorescéine, vert) et de la protéine Pax6 (rhodamine, rouge) dans les explants contrôles (A), traités par N-SHH seule (B), traités par BMP4 seule (C) ou cotraités par N-SHH et BMP4 (D), après 2 jours de culture (jdc). Dans toutes les conditions de traitement, les explants présentent de nombreux noyaux cellulaires exprimant Pax6. Ces noyaux sont aussi bien localisés dans le neuroépithélium (rosettes dont le milieu est marqué par une astérisque) que dans des cellules qui en dérivent, où ils apparaissent généralement plus fluorescents. Noter le développement de cellules O4+/Pax6- au pourtour de l'explant traité par SHH (B). De rares cellules oligodendrocytaires sont également visibles à la périphérie de l'explant cotraité par SHH et BMP4 (D). Les cellules O4+ apparaissent jaunes en raison de l'utilisation d'anticorps secondaires dirigés contre les Ig de souris pour révéler les anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène O4 et la protéine Pax6. E : Quantification de l'effet de BMP4 sur l'expression de Pax6 : représentation graphique du nombre moyen de cellules Pax6+ par explant en fonction des différents traitements, après 2 jours *in vitro*. n : nombre total d'explants cultivés au cours de 2 expériences indépendantes sauf pour les cultures en présence de BMP4 seule où une expérience unique a été réalisée. Les barres d'erreur représentent l'écart standard à la moyenne ou esm.

des explants dans ces conditions, attestant de l'activité de la protéine SHH (figure 67B, voir aussi figure 64B, E et F). Aucune des cellules O4⁺ n'exprime Pax6 (figure 67B).

Tous les explants de neuroépithélium ventral cultivés en présence de 0,6 nM de protéine BMP4 présentent une grande quantité de cellules Pax6⁺ (figure 67C, tableau 1). Les comptages indiquent une augmentation du nombre de ces cellules. On dénombre, en effet, environ 400 noyaux Pax6⁺ par explant, en moyenne (figure 67E, tableau 1), ce qui correspond à une augmentation d'un facteur 2,7 par rapport aux explants témoins. Sous l'effet de ce traitement, il ne se développe pas un nombre significatif de cellules O4⁺, comme vu précédemment (figure 67C, voir aussi figure 64C, E et F).

Dans les cultures cotraitées par les protéines SHH (12 nM) et BMP4 (0,6 nM), la totalité des explants contiennent une grande quantité de cellules Pax6⁺ et le nombre moyen de noyaux exprimant Pax6 est d'environ 200 par explant (figure 67D et E, tableau 1). Ceci représente une augmentation d'1,4 fois par rapport aux explants témoins, inférieure à celle observée sous l'effet d'un traitement par la protéine BMP4 seule. Ainsi, bien que SHH n'entraîne pas de modification du nombre de noyaux marqués, cette protéine limite l'augmentation médiée par BMP4 montrant, ici encore, que les effets de ces deux protéines s'antagonisent. Comme nous l'avons déjà montré, dans ces conditions, le traitement par BMP4 entraîne une inhibition quasi-totale de l'oligodendrogenèse induite par SHH (figure 67D, voir également figure 64D, E et F).

Tableau 1 : Effet de BMP4 sur l'expression de Pax6, en présence de SHH ou non, dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral prélevés aux stades HH 25 et 26 (E4,5-5)

	Traitement			
	–	BMP4 0,6 nM**	SHH 12 nM	BMP4 0,6 nM SHH 12 nM
Pourcentage d'explants positifs* (n = 2) sauf **	100% (17)	100% (14)	83,3% (18)	100% (19)
Nombre moyen ± esm de noyaux Pax6⁺ par explant (n = 2) sauf **	154,1 ± 18,7 (17)	407,3 ± 40 (14)	127,4 ± 20,9 (18)	212,9 ± 22,2 (19)

* les explants sont considérés comme positifs s'ils contiennent un minimum de 10 noyaux Pax6⁺. n : nombre d'expériences indépendantes. ** les cultures réalisées en présence de BMP4 seule sont issues d'une expérience unique. Le nombre entre parenthèses indique le nombre d'explants analysés.

L'ensemble de ces résultats montre que **l'inhibition de la formation des oligodendrocytes médiée par BMP4 s'accompagne d'une augmentation du nombre de cellules exprimant Pax6**, même en présence de la protéine SHH. A l'inverse, l'induction

des oligodendrocytes médiée par SHH ne s'accompagne pas d'une diminution du nombre de cellules Pax6⁺.

b. Après la détermination des oligodendrocytes

Tous les explants prélevés à E6 et cultivés en absence ou en présence de BMP4 contiennent des cellules dont le noyau exprime le facteur de transcription Pax6 (figure 68A et B).

Les cultures témoins présentent en moyenne une trentaine de noyaux Pax6⁺ par explant (figure 68C). Cette quantité de cellules Pax6⁺ est bien moins importante que celle comptée dans les explants prélevés plus tôt au cours du développement (voir figure 67E). Ceci reflète vraisemblablement le fait que la limite ventrale du domaine d'expression de Pax6 est repoussée de 5 à 6 diamètres cellulaires dorsalement dans le neuroépithélium, au moment de la détermination des précurseurs oligodendrocytaires (Agius *et al.*, 2004). L'étendue du domaine Pax6⁺ contenu dans les explants est donc probablement moins importante à E6 qu'à E4,5-5. Comme montré antérieurement (Soula *et al.*, 2001), ces cultures développent de nombreux oligodendrocytes à la périphérie des explants (figure 68A, voir aussi figure 66A, C et D). Les cellules O4⁺ ne coexpriment pas la protéine Pax6 à ce stade non plus (figure 68A).

Le traitement du neuroépithélium ventral de E6 par 0,6 nM de protéine BMP4 cause également une augmentation de la quantité de cellules exprimant Pax6. Le nombre moyen de noyaux Pax6⁺ est alors de 100 par explant, ce qui correspond à une augmentation d'un facteur 3 par rapport aux cultures témoins (figure 68C). Comme nous l'avons déjà décrit, l'inhibition de l'oligodendrogenèse est très nette dans ces conditions, mais moins importante que celle observée lorsque le traitement est appliqué, seul ou avec SHH, sur du neuroépithélium ventral prélevé avant la détermination des oligodendrocytes (figure 68B, voir également figure 66B, C et D).

Les résultats montrent que **l'inhibition de l'oligodendrogenèse, partielle à ce stade, est également accompagnée d'une augmentation de la quantité de cellules qui expriment Pax6** dans ce contexte.

Les cellules oligodendrocytaires détectées dans ces explants de neuroépithélium ventral, toutes conditions de stade de développement et de traitement confondues, n'expriment jamais Pax6, confirmant la constatation que les précurseurs des oligodendrocytes ne dérivent pas du domaine neuroépithélial exprimant Pax6 (Soula *et al.*, 2001). Cette observation, doublée du fait que l'inhibition de l'oligodendrogenèse par BMP4

O4/Pax6 (2 jdc)

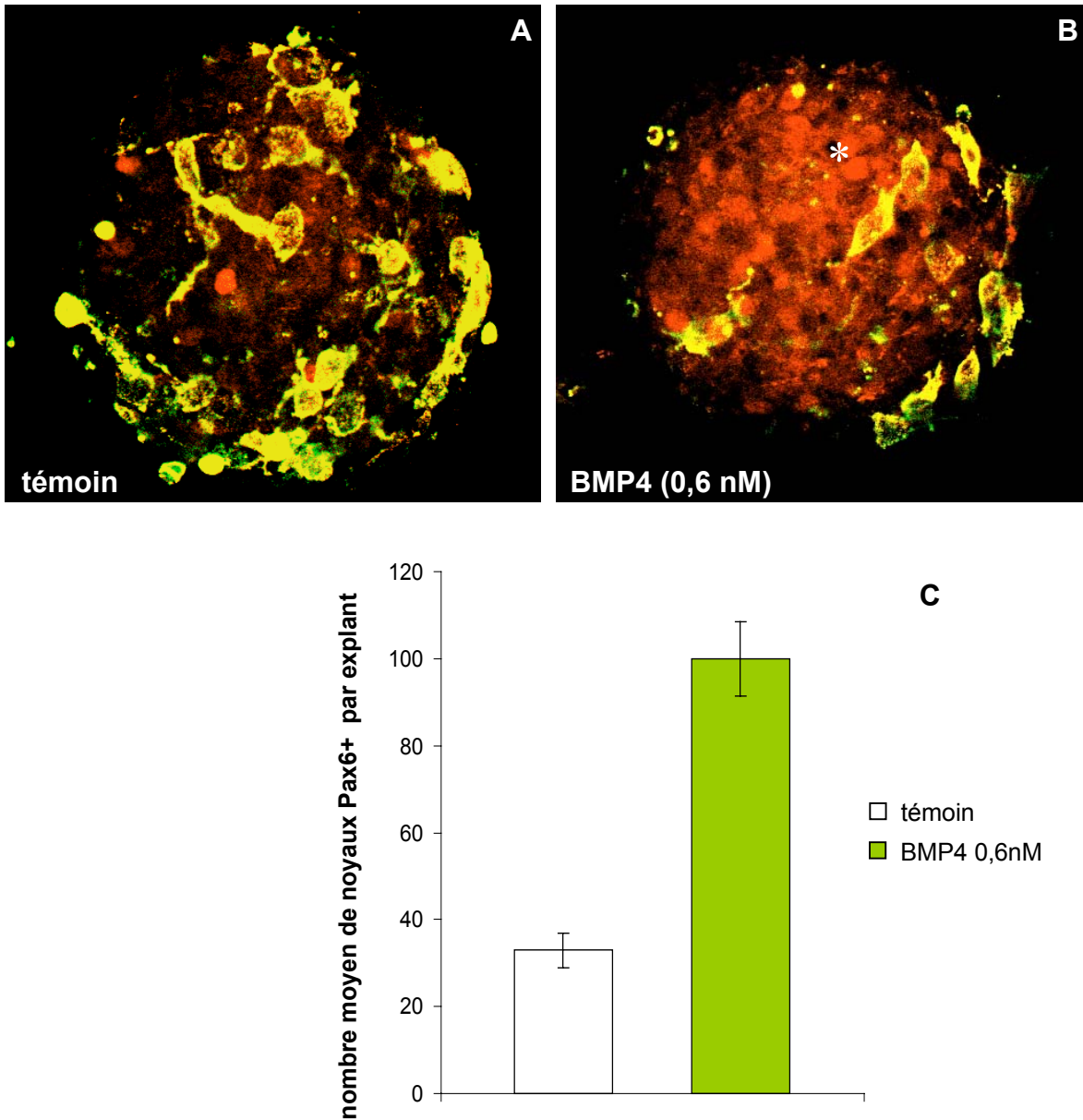


Figure 68 : Effet de la protéine BMP4 (0,6 nM) sur le développement des oligodendrocytes et l'expression de Pax6 dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 29 (E6). A, B : Double immunofluorescence de l'antigène O4 (fluorescéine, vert) et de la protéine Pax6 (rhodamine, rouge) dans les explants contrôles (A) et traités par BMP4 (B), après 2 jours de culture (jdc). Les explants présentent des noyaux cellulaires exprimant Pax6, plus nombreux en présence de BMP4 (B) qu'en absence de la protéine (A). Ces noyaux sont localisés dans le neuroépithélium (rosettes dont le milieu est marqué par une astérisque) et dans des cellules qui en dérivent (B). A ce stade, les explants témoins développent des cellules O4+ qui ne coexpriment pas Pax6 (A) et l'inhibition de l'oligodrogenèse par BMP4 n'est pas totale (B). Les cellules O4+ apparaissent jaunes en raison de l'utilisation d'anticorps secondaires dirigés contre les Ig de souris pour révéler les anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène O4 et la protéine Pax6. C : Quantification de l'effet de BMP4 sur l'expression de Pax6 : représentation graphique du nombre moyen de cellules Pax6+ par explant, en absence (n = 8) et en présence de BMP4 à la concentration de 0,6 nM (n = 9), après 2 jours *in vitro*. Les résultats proviennent d'une expérience unique. Les barres d'erreur représentent l'écart standard à la moyenne ou esm.

est associée à une augmentation de l'expression de Pax6, laisse imaginer que Pax6 pourrait médier l'effet de BMP4 dans notre système. Alternativement, l'augmentation du nombre de cellules exprimant Pax6 pourrait être une conséquence de l'effet de BMP4 sur l'expression d'autres facteurs de transcription du neuroépithélium. Dans cette structure, les protéines Pax6 et Nkx2.2 répriment mutuellement leur expression (Ericson *et al.*, 1997 ; Briscoe *et al.*, 2000). Par ailleurs, les oligodendrocytes dérivent du domaine exprimant Nkx2.2 (Xu *et al.*, 2000 ; Soula *et al.*, 2001) et ce facteur joue un rôle dans le développement du lignage oligodendrocytaire (Qi *et al.*, 2001 ; Sun *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 2001 ; Lu *et al.*, 2002 ; Zhou et Anderson, 2002). Les BMPs pourraient donc inhiber la formation des oligodendrocytes en réprimant l'expression de Nkx2.2, ce qui devrait avoir pour effet, l'augmentation de l'expression de Pax6. Pour tester ces possibilités, nous avons analysé l'expression de Nkx2.2 dans les cultures de neuroépithélium ventral soumises à l'effet de BMP4.

2. Effet de BMP4 sur l'expression de Nkx2.2 dans le neuroépithélium ventral *in vitro*

a. Avant la détermination des oligodendrocytes

Les explants témoins contiennent un nombre très variable de noyaux exprimant le facteur de transcription Nkx2.2 (de 0 à environ 300). La moitié d'entre eux sont positifs *-i.e.* présentent au moins 10 noyaux Nkx2.2⁺ (figure 69A et E) ; les autres sont négatifs et ont au maximum 5 noyaux marqués. Le nombre moyen de noyaux Nkx2.2⁺ par explant (explants positifs et négatifs confondus) est de 40 (figure 69F). La présence de cellules exprimant Nkx2.2 dans des explants de neuroépithélium ventral isolés en culture indique que le maintien de l'expression de ce facteur ne nécessite pas le concours de signaux provenant des tissus environnants. Ceci confirme les données selon lesquelles la protéine SHH qui est responsable de l'induction de l'expression de Nkx2.2 dans le neuroépithélium ventral jouxtant la *floor plate*, n'est pas nécessaire pour l'expression continue de ce facteur dans ce domaine (Ericson *et al.*, 1997 ; Briscoe *et al.*, 1999, 2000 ; Agius *et al.*, 2004). La très grande variabilité dans le nombre de cellules exprimant Nkx2.2 dans les explants illustre vraisemblablement le fait qu'on ne prélève pas la même quantité de tissu neuroépithélial du domaine Nkx2.2⁺ dans chaque dissection. Les quelques cellules O4⁺ se développant dans ces explants témoins coexpriment toutes Nkx2.2 (non montré).

Les explants traités par 12 nM de protéine SHH contiennent tous un nombre important de noyaux Nkx2.2⁺ (figure 69B, E et F). La présence de SHH augmente d'une

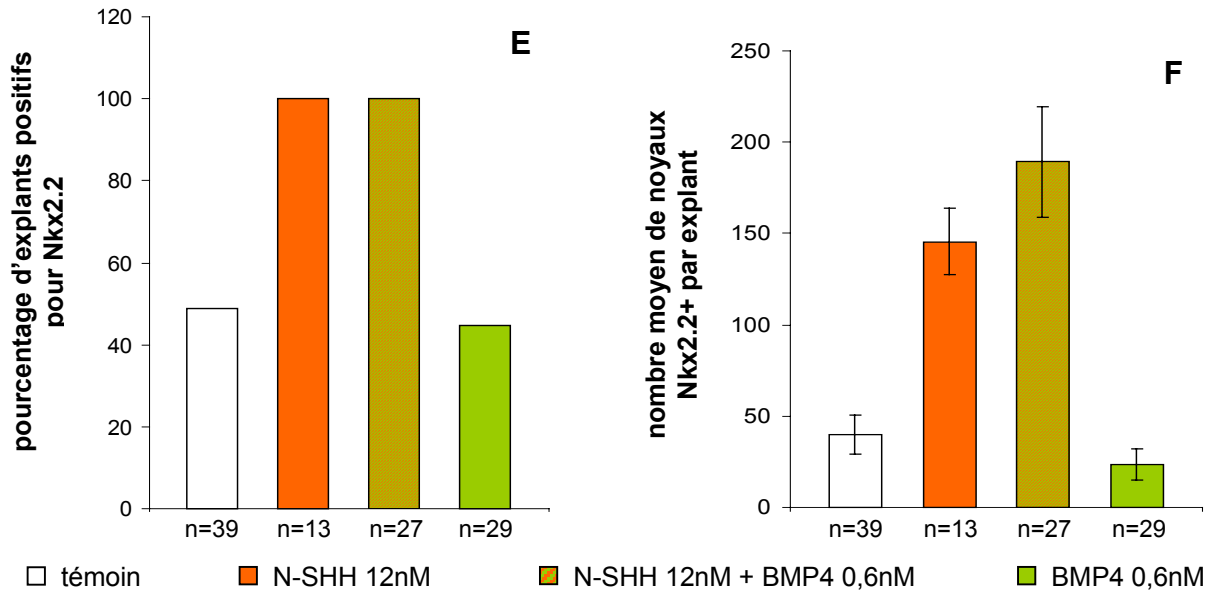
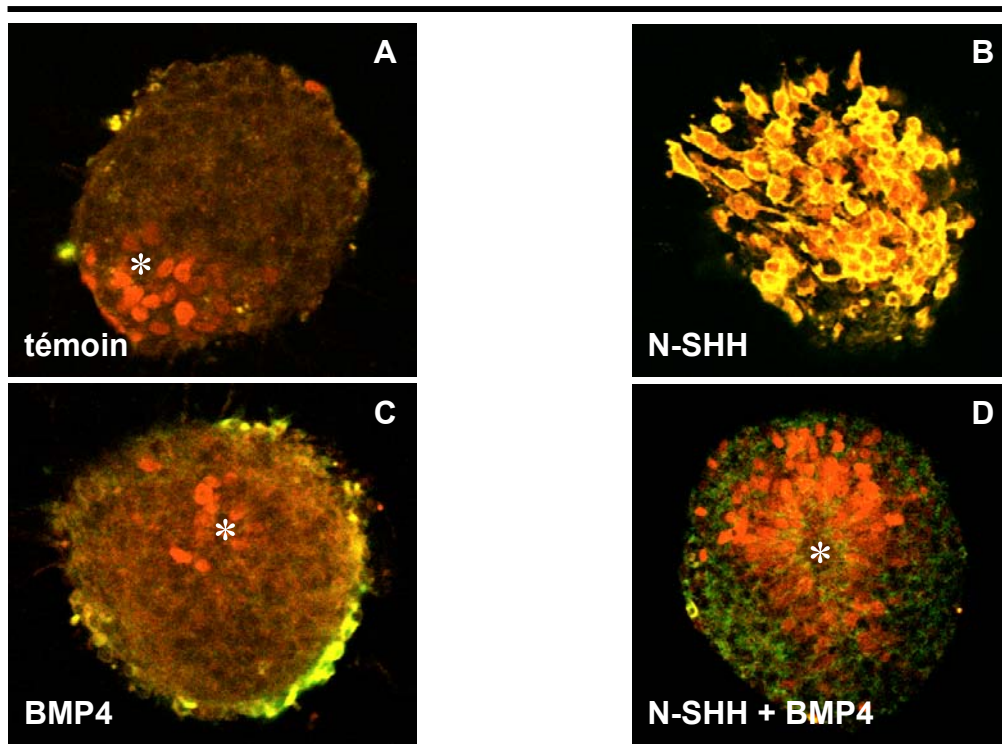


Figure 69 : Effet de la protéine BMP4 (0,6 nM) sur le développement des oligodendrocytes et l'expression de Nkx2.2 dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 25-26 (E4,5/5). A, B, C, D : Double immunofluorescence de l'antigène O4 (fluorescéine, vert) et de la protéine Nkx2.2 (rhodamine, rouge) dans les explants contrôles (A), traités par N-SHH seule (B), traités par BMP4 seule (C) ou cotraités par N-SHH et BMP4 (D), après 2 jours de culture (jdc). Les explants présentent des noyaux cellulaires exprimant Nkx2.2, plus nombreux sous l'effet de N-SHH indépendamment de la présence de BMP4 (B, D). Ces noyaux sont aussi bien localisés dans le neuroépithélium (rosettes dont le milieu est marqué par une astérisque) que dans des cellules qui en dérivent, où ils apparaissent généralement plus fluorescents. Noter le développement de cellules O4+ qui coexpriment toutes Nkx2.2 à la surface de l'explant traité par SHH (B). Le marquage O4 apparaît jaune en raison de l'utilisation d'anticorps secondaires dirigés contre les Ig de souris pour révéler les anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène O4 et la protéine Nkx2.2. E, F : Quantification de l'effet de BMP4 sur l'expression de Nkx2.2. E : Représentation graphique du nombre d'explants positifs, c'est à dire contenant au moins 10 cellules Nkx2.2+, exprimé en pourcentage du nombre total d'explants (n) dans chaque condition de traitement, après 2 jours de culture. F : L'histogramme représente le nombre moyen de cellules Nkx2.2+ par explant en fonction de différents traitements, après 2 jours *in vitro*. n : nombre total d'explants cultivés au cours d'au moins 3 expériences indépendantes. Les barres d'erreur représentent l'écart standard à la moyenne ou esm.

part, le nombre d'explants contenant des cellules exprimant Nkx2.2 et d'autre part, le nombre de ces cellules dans ces explants (figure 69E et F). On dénombre en moyenne 146 noyaux positifs par explant (figure 69F). De nombreux oligodendrocytes exprimant tous Nkx2.2 se développent dans ces conditions (figure 69B), conformément aux données publiées dans une étude précédente (Soula *et al.*, 2001).

Dans les cultures réalisées en présence de BMP4 à 0,6 nM, le nombre de noyaux exprimant Nkx2.2 n'apparaît pas significativement modifié puisque l'on compte une moyenne de 24 noyaux positifs par explant (figure 69F). On observe également une grande variabilité dans le nombre de noyaux Nkx2.2⁺ dans ces explants (de 0 à environ 200). Près de la moitié d'entre eux sont positifs (figure 69C et E) et les autres, ne présentent pas ou peu de noyaux marqués.

Tous les explants cultivés en présence simultanée de BMP4 (0,6 nM) et de SHH (12 nM), présentent de nombreux noyaux Nkx2.2⁺ (figure 69D et E). Leur nombre moyen est de 189 par explant (figure 69F), ce qui n'est pas significativement différent de ce que l'on compte dans les explants cultivés avec la protéine SHH seule. SHH est donc capable d'induire l'expression de Nkx2.2 même en présence de BMP4, indiquant que cette dernière n'antagonise pas tous les effets de SHH.

Les résultats montrent que, même si l'induction des oligodendrocytes par SHH s'accompagne d'une augmentation du nombre de cellules Nkx2.2⁺ et que toutes les cellules oligodendrocytaires expriment Nkx2.2, conformément à des résultats précédents (Soula *et al.*, 2001), **la répression du lignage par BMP4 n'est pas associée à une diminution du nombre de cellules exprimant Nkx2.2.**

b. Après la détermination des oligodendrocytes

A ce stade, tous les explants témoins sont positifs et le nombre moyen de noyaux Nkx2.2⁺ est de 80 par explant (figure 70A et C). D'après l'observation de coupes transversales du tube neural après immunodétection de la protéine Nkx2.2, l'étendue du domaine neuroépithélial exprimant Nkx2.2 passe de 5-6 à 10-12 diamètres cellulaires selon l'axe dorso-ventral entre E5 et E6, moment de la spécification des oligodendrocytes (Agius *et al.*, 2004). Ceci explique vraisemblablement le fait que tous les explants prélevés à E6 sont positifs pour l'expression de Nkx2.2 alors que seulement la moitié de ceux disséqués à E4,5-5 le sont. Les nombreuses cellules O4⁺ générées dans ces explants témoins présentent toutes un noyau Nkx2.2⁺ (figure 70A).

O4/Nkx2.2 (2 jdc)

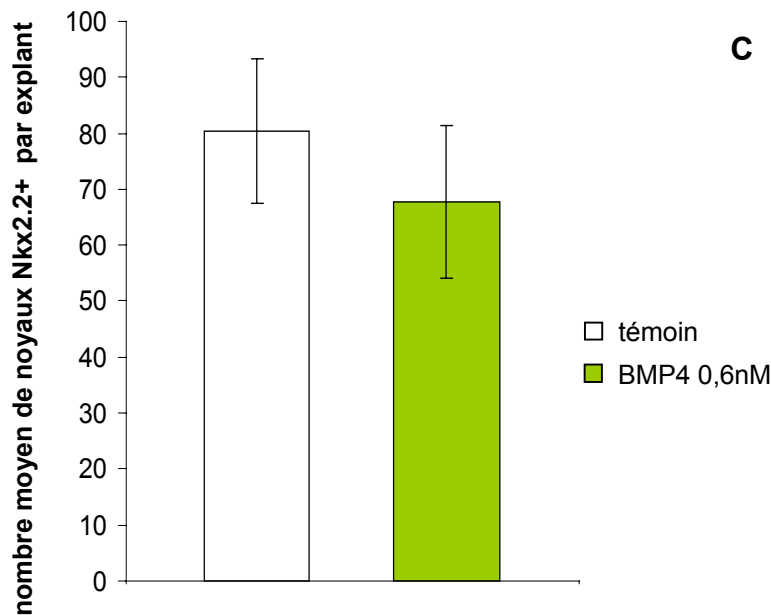
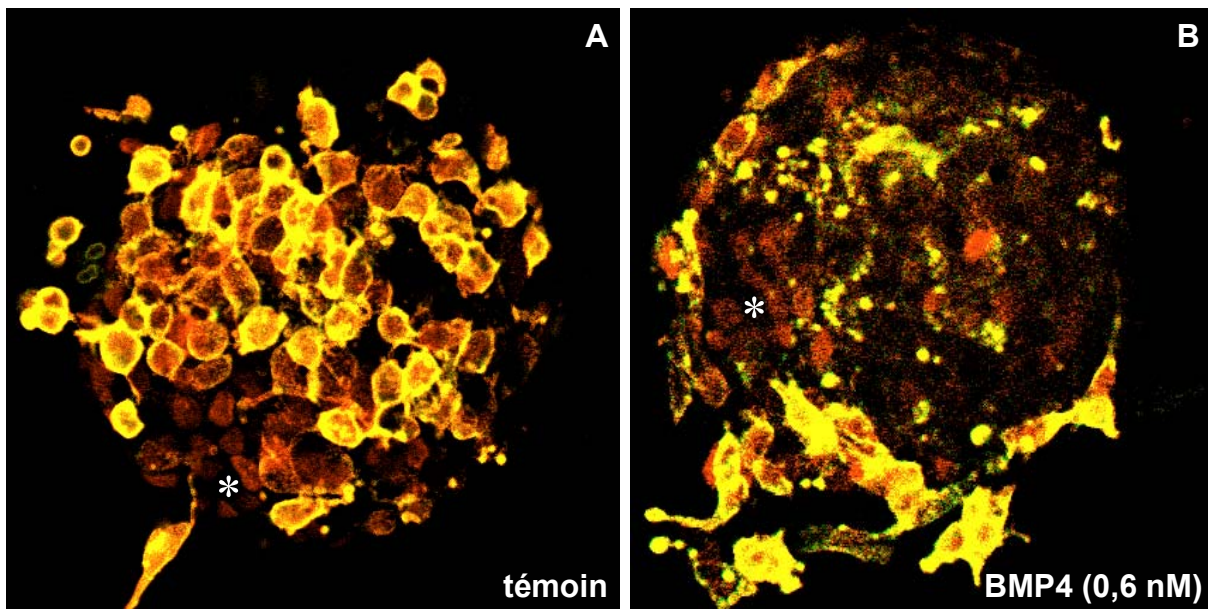


Figure 70 : Effet de la protéine BMP4 (0,6 nM) sur le développement des oligodendrocytes et l'expression de Nkx2.2 dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 29 (E6). A, B : Double immunofluorescence de l'antigène O4 (fluorescéine, vert) et de la protéine Nkx2.2 (rhodamine, rouge) dans les explants contrôles (A) et traités par BMP4 (B), après 2 jours de culture (jdc). Les explants témoins et traités présentent de nombreux noyaux cellulaires exprimant Nkx2.2. Ces noyaux sont localisés dans le neuroépithélium (rosettes dont le milieu est marqué par une astérisque) et dans des cellules qui en dérivent. A ce stade, les explants témoins développent des cellules O4+ qui coexpriment toutes Nkx2.2 (A) et l'inhibition de l'oligodrogenèse par BMP4 n'est pas totale (B). Les cellules O4+ apparaissent jaunes en raison de l'utilisation d'anticorps secondaires dirigés contre les Ig de souris pour révéler les anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène O4 et la protéine Nkx2.2. C : Quantification de l'effet de BMP4 sur l'expression de Nkx2.2 : représentation graphique du nombre moyen de cellules Nkx2.2+ par explant, en absence (n = 9) et en présence de BMP4 à la concentration de 0,6 nM (n = 10), après 2 jours *in vitro*. Les résultats sont issus d'une expérience unique. Les barres d'erreur représentent l'écart standard à la moyenne ou esm.

En présence de BMP4, les explants expriment également tous Nkx2.2 avec un nombre moyen de 68 noyaux marqués par explant (figure 70B et C), ce qui n'est pas significativement différent de ce que l'on observe dans les explants contrôles. Les oligodendrocytes qui se développent en nombre réduit dans ces conditions expriment Nkx2.2 (figure 70B).

Les résultats des expériences réalisées à E6 sont similaires à ceux obtenus à E4,5-5. L'induction *in vivo* de l'oligodendrogenèse (c'est à dire avant le prélèvement des explants) est accompagnée d'un accroissement du nombre de noyaux Nkx2.2⁺ comme dans le cas de l'induction de la formation des oligodendrocytes par SHH *in vitro*. D'après des données récentes obtenues au laboratoire, l'extension du domaine neuroépithélial exprimant Nkx2.2 dans la direction dorsale est médiée par SHH (Agius *et al.*, 2004). A l'inverse, **l'inhibition de l'oligodendrogenèse par BMP4 n'est pas associée à une réduction du nombre de cellules exprimant Nkx2.2 à ce stade non plus**. Comme dans les explants prélevés à E4,5-5, les cellules O4⁺ détectées dans les cultures réalisées à E6, traitées ou non, coexpriment Nkx2.2. Cependant toutes les cellules Nkx2.2⁺ ne coexpriment pas l'antigène O4. Ceci est évident, notamment, en présence de BMP4 où le nombre de cellules exprimant Nkx2.2 n'est pas affecté alors que le nombre de cellules O4⁺ est considérablement réduit dans tous les cas de figure testés. Cette observation illustre le fait que ce facteur de transcription n'est pas suffisant pour la spécification des oligodendrocytes (Sun *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 2001). Aussi, bien que toutes les cellules oligodendrocytaires expriment Nkx2.2, la régulation de l'oligodendrogenèse est à découpler de la régulation de l'expression de Nkx2.2, au moins en certains aspects.

Par ailleurs, de manière inattendue, les résultats indiquent que l'augmentation du nombre de cellules exprimant Pax6 dans le neuroépithélium ventral, sous l'effet de BMP4, n'est pas le résultat d'une réduction de l'expression de Nkx2.2.

En résumé, l'inhibition de la formation des oligodendrocytes ne résulte pas d'un effet de BMP4 sur l'expression de Nkx2.2. Inversement, l'induction du développement de ces cellules ne dépend pas de la seule présence de Nkx2.2. Enfin, l'augmentation du nombre de cellules exprimant Pax6 accompagnant la suppression de l'oligodendrogenèse médiée par BMP4 reste inexpliquée. Ensemble, ces constatations impliquent l'existence d'autres facteurs participant à la régulation de l'oligodendrogenèse.

Le facteur de transcription à bHLH Olig2, dont l'expression est positivement régulée par SHH, est exprimé par une fraction de précurseurs oligodendrocytaires (Lu *et*

al., 2000 ; Zhou *et al.*, 2000, 2001) et par la plupart des oligodendrocytes, sinon tous, plus tard au cours du développement embryonnaire et dans le SNC mature (Lu *et al.*, 2000). En outre, les résultats d'expériences de gain et de perte de fonction de Olig2 indiquent que ce facteur joue un rôle dans la mise en place des oligodendrocytes (Lu *et al.*, 2000 ; Sun *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 2001 ; Fu *et al.*, 2002 ; Lu *et al.*, 2002 ; Park *et al.*, 2002 ; Takebayashi *et al.*, 2002 ; Zhou et Anderson, 2002). Des cultures de neuroépithélium ventral prélevé à E4,5-5 ont alors été réalisées selon le même mode que précédemment, dans le but d'étudier un effet éventuel de BMP4 sur l'expression de Olig2. Par ailleurs, dans d'autres essais, une double immunodétection de Olig2 et de O4 a été réalisée afin de corrélérer la régulation de l'oligodrogenèse à la régulation éventuelle de l'expression de Olig2 par BMP4.

Nous avons aussi examiné l'expression de Nkx2.2 dans ces explants. Avant la détermination des précurseurs oligodendrocytaires, les facteurs de transcription Nkx2.2 et Olig2 sont exprimés dans des domaines neuroépithéliaux adjacents mais absolument exclusifs. Au moment de la détermination de ce lignage, le domaine Nkx2.2⁺ s'étend dorsalement dans le neuroépithélium de telle façon que Nkx2.2 et Olig2 sont alors coexprimés dans une certaine population de cellules neuroépithéliales, probablement des précurseurs d'oligodendrocytes (Zhou *et al.*, 2001 ; Fu *et al.*, 2002). Il est, en effet, évident qu'au moins une partie de ces précurseurs coexpriment les deux facteurs à un moment de leur développement puisque toutes les cellules O4⁺ développées dans nos explants de neuroépithélium ventral expriment Nkx2.2 et qu'une fraction de précurseurs O4⁺ exprime Olig2 (Lu *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2000, 2001). Enfin, l'extension du domaine d'expression de Nkx2.2 est dépendant de la signalisation SHH (Agius *et al.*, 2004). A la lumière de ces éléments, il est apparu nécessaire de regarder comment évoluait la population de cellules Nkx2.2⁺/Olig2⁺ en présence de BMP4.

3. Effet de BMP4 sur l'expression de Olig2 dans le neuroépithélium ventral *in vitro*

Dans les cultures témoins, la majorité des explants (72,7%) présentent un nombre significatif mais variable de noyaux Olig2⁺ (figure 71A et E). On compte, en moyenne, 60 noyaux marqués par explant (figure 71F), parmi lesquels, certains sont situés dans les cellules neuroépithéliales en rosette au cœur de l'explant et la plupart, dans les cellules ayant migré hors de ces rosettes. L'observation minutieuse des explants en microscopie confocale révèle que les cellules neuroépithéliales exprimant Olig2 apparaissent en nombre bien moins important que celles qui expriment Pax6 ou Nkx2.2 dans les mêmes conditions. Or le domaine neuroépithélial Olig2⁺ a la même taille que le domaine Nkx2.2⁺ au stade du

Olig2 (2 jdc)

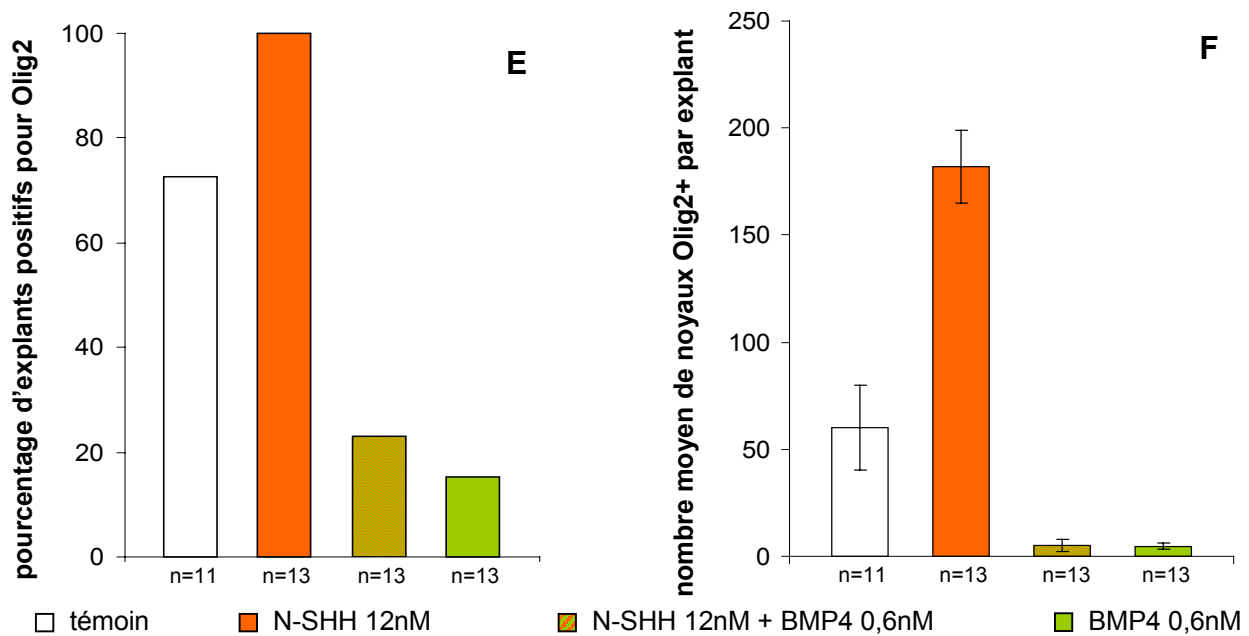
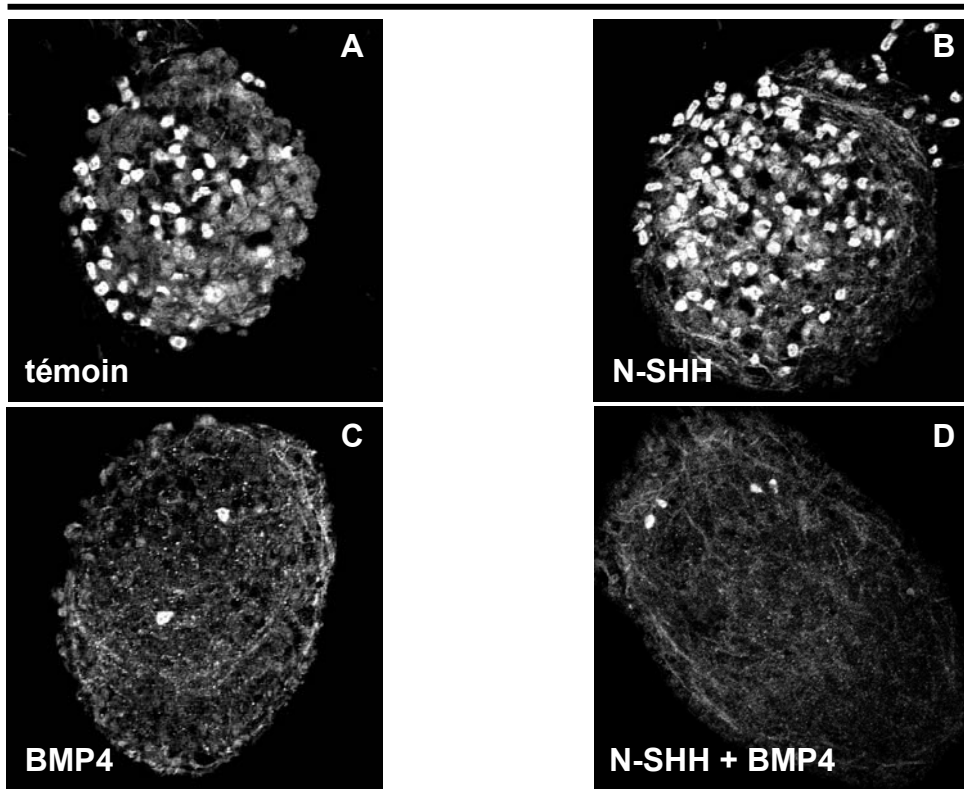


Figure 71 : Effet de la protéine BMP4 (0,6 nM) sur l'expression de Olig2 dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 25-26 (E4,5/5). A, B, C, D : Immunofluorescence de la protéine Olig2 dans les explants contrôles (A), traités par N-SHH seule (B), traités par BMP4 seule (C) ou cotraités par N-SHH et BMP4 (D), après 2 jours de culture (jdc). Les explants témoins présentent des noyaux cellulaires exprimant Olig2 (A). Le traitement par N-SHH stimule la production des cellules Olig2+ (B). Sous l'effet de BMP4, les explants ne contiennent quasiment pas de cellules exprimant Olig2, en absence de SHH comme en présence de cette protéine (C, D). E, F : Quantification de l'effet inhibiteur de BMP4 . E : Représentation graphique du nombre d'explants positifs, c'est à dire présentant au moins 10 cellules Olig2+, exprimé en pourcentage du nombre total d'explants (n) dans chaque condition de traitement, après 2 jours de culture. F : L'histogramme représente le nombre moyen de cellules Olig2+ par explant en fonction de différents traitements, après 2 jours *in vitro*. n : nombre total d'explants cultivés au cours d'une expérience unique. Les barres d'erreur représentent l'écart standard à la moyenne ou esm.

prélèvement (5-6 diamètres cellulaires selon l'axe dorso-ventral) et a toutes les chances d'être entièrement compris dans les explants prélevés vu sa localisation selon l'axe dorso-ventral et la procédure de microdissection décrite p. 91-92. Cette observation pourrait refléter la nécessité de SHH pour le maintien de l'expression de Olig2 dans les cellules neuroépithéliales, jusqu'à ce qu'elles soient engagées dans une voie de différenciation, c'est à dire jusqu'au moment de leur dernière division mitotique. Une étude toute récente indique effectivement que SHH est requise pour le maintien de l'expression de Olig2 dans le neuroépithélium ventral (Agius *et al.*, 2004). Dans ces conditions, la variabilité dans le nombre de noyaux Olig2⁺ contenus dans ces explants pourrait résulter de différences dans le stade précis de la dissection, des différences selon les embryons (certains se développent plus rapidement que d'autres) et/ou de la présence d'une quantité variable de cellules neuroépithéliales Nkx2.2⁺ exprimant SHH. Comme nous l'avons déjà montré, ces explants témoins contiennent très peu de cellules O4⁺ (figure 64E et F), coexprimant toutes Olig2 (non montré). Des noyaux Nkx2.2⁺ sont présents en nombre variable parmi lesquels seuls quelques uns coexpriment Olig2 (figure 72A). La quasi-totalité des noyaux marqués est donc soit Olig2⁺, soit Nkx2.2⁺, ce qui illustre le fait qu'au stade de prélèvement des explants (E4,5-5), les domaines Nkx2.2⁺ et Olig2⁺ ne se chevauchent pas et que la coexpression de ces deux facteurs dans les cellules neuroépithéliales et celles qui en dérivent au moment de la détermination des précurseurs oligodendrocytaires (vers E5,5) nécessite la présence de SHH (Agius *et al.*, 2004).

La totalité des explants cultivés en présence de SHH contiennent de nombreuses cellules exprimant Olig2 et le nombre moyen de noyaux marqués par explant est accru puisqu'il est de 182 (figure 71B, E et F). En particulier, on observe plus de cellules Olig2⁺ dans les rosettes neuroépithéliales de ces explants que dans celles des explants témoins, illustrant vraisemblablement la nécessité de SHH pour le maintien de l'expression de Olig2 (Agius *et al.*, 2004). Les cellules oligodendrocytaires générées dans ces conditions expriment toutes Olig2, mais toutes les cellules Olig2⁺ ne coexpriment pas O4 même parmi celles qui ont quitté le neuroépithélium (non montré). De manière intéressante, tous les noyaux Olig2⁺ sont également Nkx2.2⁺ (figure 72B), reflétant probablement l'induction par SHH de la coexpression de ces 2 facteurs de transcription dans le neuroépithélium *in vivo* au moment de la détermination des précurseurs des oligodendrocytes (Agius *et al.*, 2004).

Les explants traités par BMP4 présentent peu ou pas de cellules Olig2⁺ (figure 71C, E et F). On dénombre, en moyenne, 5 noyaux marqués par explant, dans ces cultures

Olig2/Nkx2.2 (2 jdc)

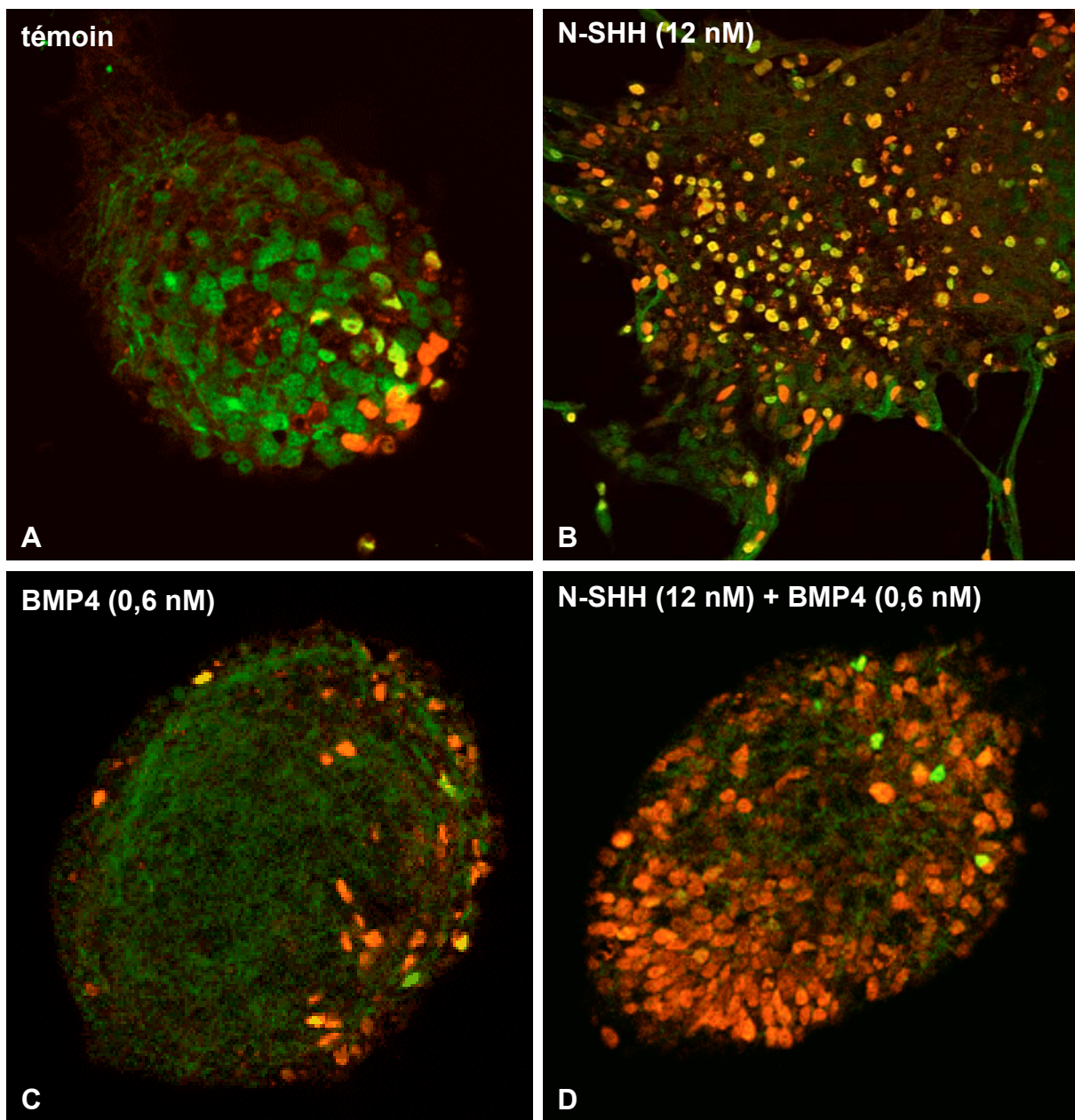


Figure 72 : Effet de la protéine BMP4 (0,6 nM) sur la coexpression de Olig2 et de Nkx2.2 dans les cultures d'explants de neuroépithélium ventral de stade HH 25-26 (E4,5/5). A, B, C, D : Double immunofluorescence des protéines Olig2 (fluorescéine, vert) et Nkx2.2 (rhodamine, rouge) dans les explants contrôles (A), traités par N-SHH seule (B), traités par BMP4 seule (C) ou cotraités par N-SHH et BMP4 (D), après 2 jours de culture (jdc). Dans les explants témoins, la quasi-totalité des cellules Olig2+ ne coexprime pas Nkx2.2 (A). En présence de N-SHH, toutes les cellules positives pour Olig2 le sont également pour Nkx2.2 (B). Sous l'effet de BMP4, les explants contiennent de rares cellules exprimant Olig2 lesquelles coexpriment toutes Nkx2.2, en absence de SHH comme en présence de cette protéine (C, D).

(figure 71F). Le traitement par BMP4 entraîne donc une diminution du nombre d'explants exprimant Olig2 et une réduction très nette du nombre de cellules positives dans ces explants. La double immunodétection de Olig2 et de Nkx2.2 dans ces cultures traitées par BMP4 révèle que la quasi-totalité des cellules marquées sont Nkx2.2⁺/Olig2⁻ (figure 72C). Les rares cellules Olig2⁺ coexpriment Nkx2.2 (figure 72C).

Les explants cotraités par SHH et BMP4 contiennent également peu ou pas de cellules exprimant le facteur Olig2 (figure 71D, E et F). On détecte, en moyenne, 5 noyaux positifs par explant, comme dans les cultures traitées par BMP4 seule (figure 71F). La protéine BMP4 entraîne donc une réduction quasi-totale du nombre de cellules exprimant Olig2 malgré la présence de SHH. La co-immunodétection de Olig2 et de Nkx2.2 dans ces cultures révèle que presque toutes les cellules marquées sont Nkx2.2⁺/Olig2⁻ (figure 72D). Les quelques cellules Olig2⁺ coexpriment Nkx2.2 (figure 72D).

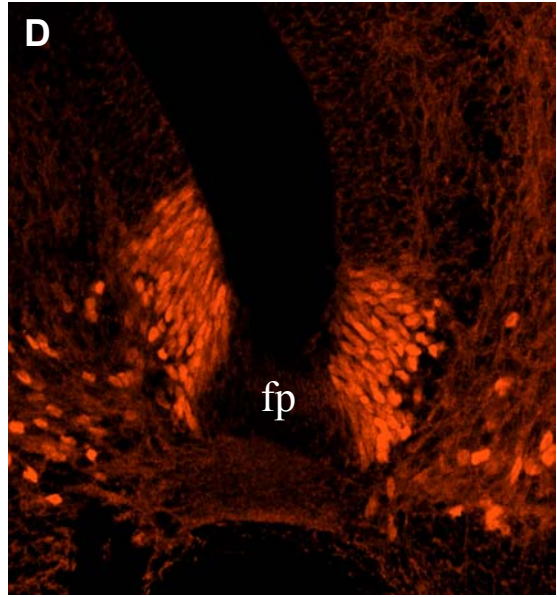
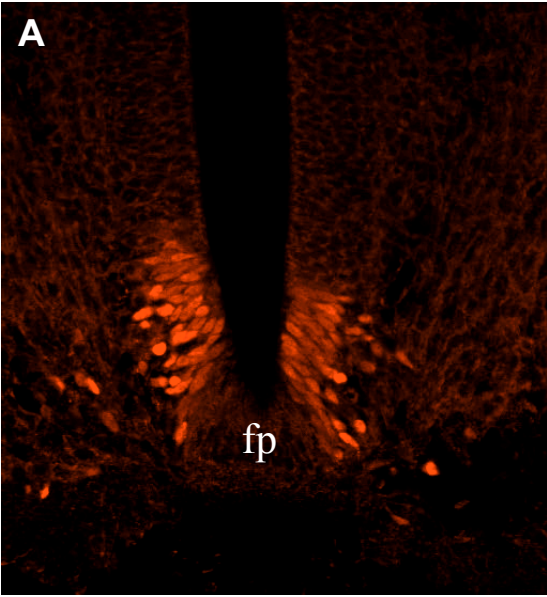
Les résultats montrent que l'induction des oligodendrocytes par SHH est associée à une augmentation du nombre de cellules exprimant Olig2 et qu'inversement, **l'inhibition de l'oligodendrogenèse sous l'effet de BMP4 s'accompagne d'une réduction quasi-totale de l'expression de cette protéine, même en présence de SHH.** En revanche, **toutes les cellules oligodendrocytaires produites par les explants de neuroépithélium ventral traités par SHH, expriment Olig2.** Sachant que l'inactivation des gènes *Olig* aboutit à l'absence d'oligodendrocytes (Lu *et al.*, 2002 ; Park *et al.*, 2002 ; Takebayashi *et al.*, 2002 ; Zhou et Anderson, 2002), **ces données suggèrent que la suppression de l'oligodendrogenèse en présence de BMP4 pourrait être la conséquence de la perte de l'expression d'Olig2.**

Nos résultats précédents révèlent que toutes les cellules O4⁺ expriment le facteur de transcription Nkx2.2. Ici, nous observons que toutes les cellules O4⁺ expriment Olig2. **Les cellules oligodendrocytaires coexpriment donc nécessairement Nkx2.2 et Olig2,** suggérant ainsi que la présence de ces deux protéines ensemble est indispensable pour la formation des oligodendrocytes. D'ailleurs, **l'induction de la formation des oligodendrocytes par SHH est concomitante à une augmentation massive de la population cellulaire Nkx2.2⁺/Olig2⁺ et inversement, sa répression par BMP4 est accompagnée par une quasi-disparition de cette population,** vu l'effet de cette protéine sur l'expression de Olig2. L'ensemble de ces données est en accord avec le fait que l'expression ectopique de Nkx2.2 et Olig2 simultanément aboutit au développement d'oligodendrocytes, mais pas celle de chacun des deux facteurs séparément (Sun *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 2001).

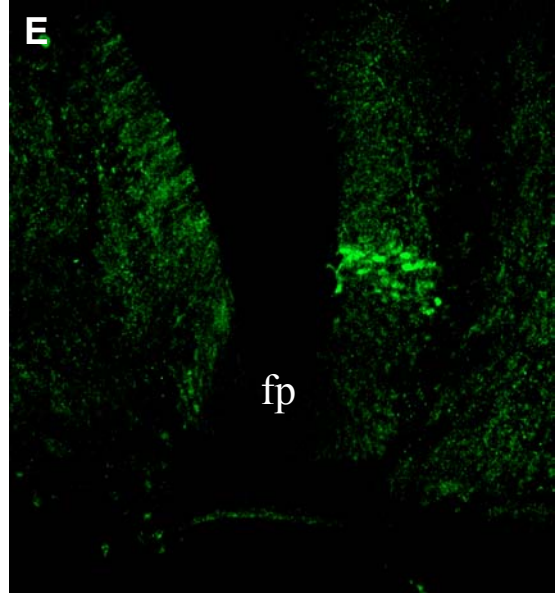
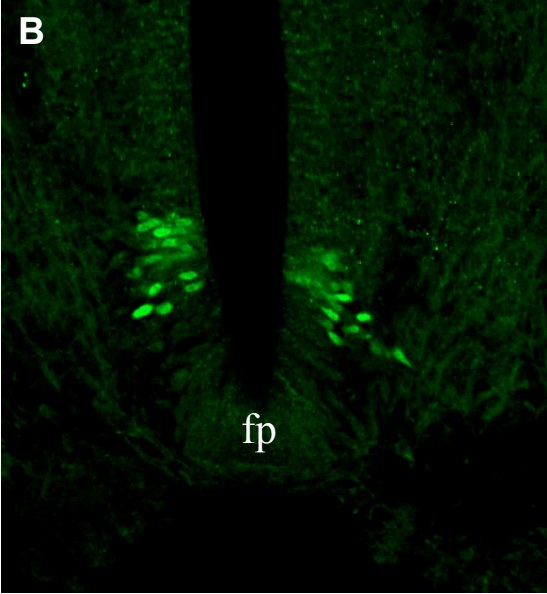
Coupes transversales du tube neural

à distance du greffon de Q2bn-BMP2 au sein du greffon de Q2bn-BMP2

Nkx2.2



Olig2



Olig2/Nkx2.2

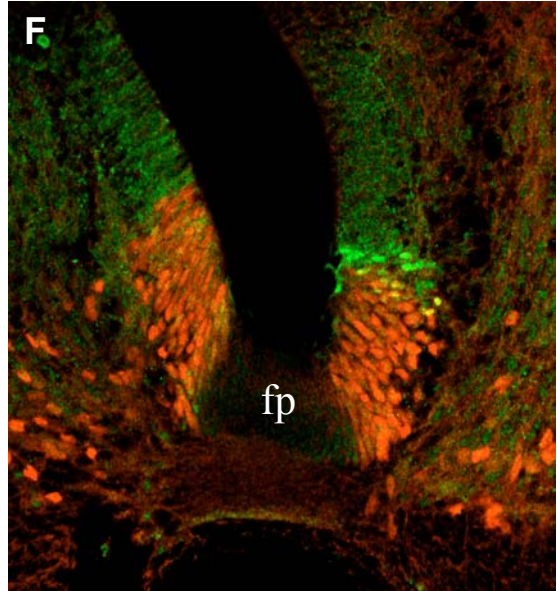
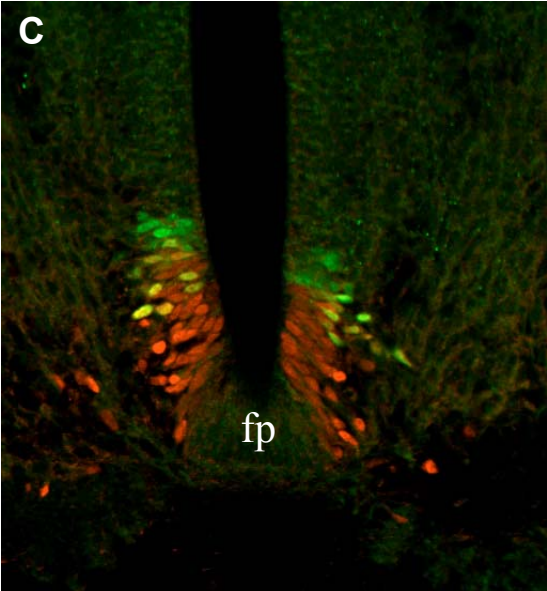


Figure 73 : Effet de la protéine BMP2 sur l'expression des facteurs de transcription Nkx2.2 et Olig2 *in vivo*. Coupes transversales du tube neural au stade HH 29-30 (E6/6.5), en amont ou en aval du greffon (A, B, C) et au niveau du greffon (D, E, F), chez un embryon de poulet ayant reçu une greffe d'agrégats de cellules produisant BMP2 entre le tube neural et les somites, *in ovo*, au stade HH 18-20 (E3). Le greffon, non visible sur ces images, flanque le côté gauche du tube neural. A, D : Images de la moitié ventrale du neuroépithélium en immunofluorescence pour la protéine Nkx2.2 (rhodamine, rouge). Sur une coupe réalisée hors de la zone du greffon (A), le facteur Nkx2.2 est exprimé bilatéralement, dans le domaine le plus ventral du neuroépithélium, contre la *floor plate* (fp), et dans des cellules situées dans la partie la plus ventrale de la zone du manteau de la moelle épinière, semblant quitter le domaine neuroépithélial Nkx2.2+. Au niveau du greffon de cellules sécrétant la protéine BMP2 (D), le patron d'expression de Nkx2.2 n'est pas modifié. B, E : Images de la moitié ventrale du neuroépithélium en immunofluorescence pour la protéine Olig2 (fluorescéine, vert). Hors de la zone du greffon (B), le facteur Olig2 est exprimé dans un domaine bilatéral de cellules neuroépithéliales localisé à distance de la *floor plate* (fp). Dans la moitié dorsale de ce domaine, toutes les cellules neuroépithéliales sont positives pour Olig2 alors que dans la moitié ventrale du domaine, l'expression de Olig2 n'intéresse pas toutes les cellules. Quelques cellules Olig2+ localisées dans la zone sous-ventriculaire commencent à quitter la partie ventrale du domaine neuroépithélial Olig2+. Au niveau du greffon (E), le patron d'expression de Olig2 est inchangé du côté contralatéral mais plus aucune cellule n'exprime Olig2 du côté ipsilatéral. C, F : Superposition des images A et B (C) et D et E (F). A distance du greffon (C), les régions dorsale du domaine Nkx2.2+ et ventrale du domaine Olig2+ se superposent. Dans cette zone de chevauchement, certaines cellules coexpriment les deux facteurs de transcription, les autres exprimant seulement Nkx2.2. Les cellules Olig2+ en migration dans la zone sous-ventriculaire coexpriment Nkx2.2. Au niveau du greffon (F), les cellules Nkx2.2+/Olig2+ n'apparaissent que du côté opposé au greffon et leur distribution n'est pas modifiée. fp : *floor plate*.

Afin de confirmer et de préciser les résultats obtenus *in vitro*, l'effet des BMPs sur l'expression de Olig2 et de Nkx2.2 a été étudié *in vivo*, grâce à des expériences de greffe de cellules exprimant BMP2 réalisées par Eric Agius.

4. Effet de BMP4 sur l'expression de Nkx2.2 et de Olig2 dans le neuroépithélium ventral *in vivo* (E3)

Succinctement, des agrégats de fibroblastes Q2bn-BMP2 préalablement marqués au DiI ont été greffés, *in ovo*, entre le tube neural thoraco-lombaire et les somites, d'un seul côté, sur des embryons de 3 jours (E3/stades HH 18 à 20) (figure 75). Les individus se développent jusqu'à E6-6,5 (stades HH 29 et 30), stade auquel les embryons survivants sont récoltés et la région d'intérêt, extraite, puis fixée. Des coupes transversales des échantillons sont ensuite réalisées et soumises à une double immunodétection afin de visualiser les cellules Nkx2.2⁺ et les cellules Olig2⁺. Sur 9 embryons opérés, 5 ont survécu et été analysés.

Dans des coupes témoins, effectuées en amont ou en aval du greffon, le facteur de transcription Nkx2.2 est exprimé bilatéralement dans le domaine le plus ventral du neuroépithélium, celui qui jouxte le territoire de la *floor plate* (figure 73A). Ce domaine s'étend sur 9 à 12 diamètres cellulaires selon l'axe dorso-ventral, en fonction des coupes considérées. Des cellules exprimant Nkx2.2, semblant provenir de ce domaine Nkx2.2⁺, sont détectées dans la partie la plus ventrale du manteau de la moelle épinière et en particulier, dans la zone sous-ventriculaire.

Au niveau de ces coupes contrôles, la protéine Olig2 est exprimée des deux côtés dans le neuroépithélium ventral, dans un domaine localisé à quelques diamètres cellulaires de la zone de la *floor plate* et s'étendant sur 5 à 6 corps cellulaires selon l'axe dorso-ventral (figure 73B). Il est intéressant de noter que contrairement à l'expression neuroépithéliale de Nkx2.2 qui apparaît continue, celle de Olig2 n'intéresse pas toutes les cellules du domaine. A ce stade, on détecte peu de cellules Olig2⁺ à l'extérieur du neuroépithélium. Les rares figures positives observées sont localisées dans la zone sous-ventriculaire bordant la partie la plus ventrale du domaine Olig2⁺ et semblent quitter le neuroépithélium.

La superposition des images obtenues avec les deux anticorps montre que la partie la plus ventrale du domaine Olig2⁺ chevauche la partie la plus dorsale du domaine Nkx2.2⁺ à ce stade postérieur à l'induction des oligodendrocytes (figure 73C). Dans ce domaine de recouvrement, certaines cellules coexpriment Olig2 et Nkx2.2 et les autres

n'expriment que Nkx2.2 reflétant l'expression mosaïque de Olig2. Enfin, les quelques cellules Olig2⁺ semblant quitter le neuroépithélium et localisées dans la zone sous-ventriculaire coexpriment Nkx2.2.

Rappelons que dans ces coupes réalisées hors de la zone greffée, le patron d'oligodendrogenèse est normal (revoir figures 54B, C, 58A et B). Les précurseurs O4⁺ sont localisés dans l'ensemble du domaine neuroépithélial Nkx2.2⁺ (Soula *et al.*, 2001).

Dans tous les embryons analysés (5/5), les coupes réalisées au niveau du greffon (repérable grâce à la fluorescence du DiI) présentent un patron d'expression du facteur Nkx2.2 non modifié (figure 73D). La position et l'étendue du domaine Nkx2.2⁺ selon l'axe dorso-ventral ainsi que l'intensité du marquage sont similaires des deux côtés de ces coupes et comparables à ce que l'on observe sur les coupes témoins. Il en est de même des noyaux Nkx2.2⁺ localisés dans la zone sous-ventriculaire bordant le domaine neuroépithélial Nkx2.2⁺ et dans le reste de la région ventrale du manteau de la moelle épinière. Ainsi, conformément à ce que montrent les expériences de culture de neuroépithélium ventral réalisées en présence de BMP4, BMP2 n'affecte pas l'expression de Nkx2.2 *in vivo*.

En revanche, dans tous les cas (5/5), l'expression de Olig2 est très nettement altérée au niveau du greffon de Q2bn-BMP2. Chez 3 embryons, on n'observe plus aucun noyau Olig2⁺ dans l'ensemble des régions du tube neural. Pour les 2 autres, l'expression de ce facteur de transcription est complètement inhibée du côté du greffon uniquement, le côté controlatéral présentant une quantité et une distribution de cellules Olig2⁺ analogues à celles observées sur les coupes témoins (figure 73E).

Chez ces 2 embryons, la superposition des images acquises avec les deux marqueurs montre, évidemment, l'absence de cellules coexprimant Nkx2.2 et Olig2 du côté du greffon et la présence de noyaux Nkx2.2⁺, olig2⁺ et Nkx2.2⁺/Olig2⁺ de l'autre côté, agencés selon un patron similaire à ce que l'on observe sur les coupes contrôles (figure 73F). Ceci confirme ainsi que la localisation dorso-ventrale du domaine Olig2⁺ et que l'émergence des cellules Nkx2.2⁺/Olig2⁺ dans la zone sous-ventriculaire ne sont pas affectées du côté opposé au greffon. La greffe de fibroblastes exprimant BMP2 entraîne donc une disparition totale de l'expression d'Olig2 du côté du greffon, ou dans l'ensemble du tube neural pour les cas les plus sévères, en accord avec les résultats obtenus en culture.

Chez des embryons opérés de la même façon, rappelons ici que l'oligodendrogenèse est inhibée soit du côté ipsilatéral au greffon (figure 55E et F), soit des deux côtés lorsque le greffon est de taille importante (figures 54E, F, 55B, 58D et E).

Cette observation, en plus de corrélérer la suppression de l'oligodendrogenèse à l'absence d'expression de Olig2, suggère que l'inhibition de l'expression de Olig2 par BMP2 est également dose-dépendante.

Tableau 2 : Récapitulatif des résultats des greffes de cellules Q2bn entre le tube neural et les somites, *in ovo*, au stade HH 18/20 (E3)

Cellules greffées	Nombre d'embryons analysés	Marqueurs utilisés	Localisation du greffon par rapport au tube neural	Observations
Q2bn-BMP2	5	anti-Nkx2.2	latérale	aucun effet sur le patron d'expression de Nkx2.2 (n = 5)
Q2bn-BMP2	5	anti-Olig2	latérale	absence de cellules Olig2 ⁺ dans tout le tube neural (n = 3) absence de cellules Olig2 ⁺ du côté ipsilatéral (n = 2)
Q2bn-BMP2	14	O4	latéro-ventrale ou ventrale (n = 10)	absence d'OLPs dans tout le NE (n = 6) + élargissement du NE (n = 3) absence d'OLPs dans le NE ipsilatéral (n = 4)
			latérale (n = 2)	pas d'effet apparent
			dorsale (n = 2)	pas d'effet apparent
Q2bn-contrôle	5	O4	latéro-ventrale	aucun effet
Q2bn-BMP2	3	5E1	latéro-ventrale	aucun effet
Q2bn-BMP2	2	anti-GLAST	latéro-ventrale	aucun effet

n : nombre de cas ; OLPs : précurseurs oligodendrocytaires ; NE : neuroépithélium ; 5E1 : anticorps anti-SHH.

Les résultats de ces expériences de greffe (tableau 2) confirment les données obtenues *in vitro* et permettent de préciser quelques points.

Ils réaffirment que **les BMPs n'affectent pas la localisation dorso-ventrale du domaine Nkx2.2⁺, ainsi que la distribution des cellules qui en dérivent.** En particulier, **les BMPs n'interfèrent pas avec la régulation de l'expression neuroépithéliale de Nkx2.2 par SHH** qui aboutit à l'extension dorsale du domaine Nkx2.2⁺ juste avant l'induction des oligodendrocytes (Agius *et al.*, 2004). Au moment de l'opération (E3), le domaine Nkx2.2⁺ est restreint à 5-6 corps cellulaires selon l'axe dorso-ventral et à E6-6,5, on observe que ce domaine s'est effectivement étendu dorsalement, en dépit de la présence du greffon de Q2bn-BMP2. L'inhibition de l'oligodendrogenèse dans ces greffes, malgré un patron normal d'expression de Nkx2.2, illustre, ici encore, la non suffisance de ce facteur de transcription pour la spécification oligodendrocytaire.

Les greffes de fibroblastes exprimant BMP2 reproduisent la réduction du nombre de cellules Olig2⁺ obtenue *in vitro* sous l'effet de BMP4 malgré la présence de SHH et montrent, en outre, que les BMPs agissent sur les cellules neuroépithéliales.

L'ensemble des résultats de ces travaux de thèse indiquent que **les BMPs empêchent l'induction du développement des oligodendrocytes par SHH vraisemblablement en inhibant l'expression de Olig2 dans le neuroépithélium.** Ils permettent d'étendre les données établissant que les BMPs sont des acteurs clés de la spécification des cellules neuronales de l'ensemble de la moelle épinière en plaçant ces morphogènes comme régulateurs de la détermination des cellules gliales dans la région ventrale du neuroépithélium.

DISCUSSION

Dans la moelle épinière embryonnaire, les cellules précurseurs des oligodendrocytes sont générées dans un domaine bien défini du neuroépithélium ventral. L'origine ventrale de ces cellules reflète l'influence inductrice du morphogène SHH, produit par la chorde et la *floor plate*. Les résultats présentés dans ce travail indiquent que des signaux présents dans la région dorsale de la moelle épinière, dont des BMPs, participent à la restriction ventrale des étapes initiales de l'oligodrogenèse. Ils montrent, en effet, que ces signaux inhibent la spécification des oligodendrocytes dorsalement, fixant ainsi la limite dorsale de la région productrice des précurseurs oligodendrocytaires. Ils indiquent également que les BMPs sont capables d'antagoniser l'effet inducteur de SHH sur la détermination des oligodendrocytes. Enfin, les données obtenues suggèrent que la répression de la spécification des oligodendrocytes médiée par les BMPs résulte au moins en partie de l'inhibition de l'expression du facteur de transcription Olig2.

I. Des facteurs dorsaux de la moelle épinière, dont des BMPs, participent à la régulation spatiale des étapes précoces de l'oligodrogenèse

Le fait que les oligodendrocytes ne se développent pas dans la région dorsale de la moelle épinière, alors qu'elle contient des cellules compétentes à adopter le destin oligodendrocytaire, peut indiquer un manque de signaux inducteurs et/ou la présence de signaux inhibiteurs de l'oligodrogenèse dans ce territoire. Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la seconde hypothèse et montrons que des facteurs localisés dans le quart le plus dorsal du tube neural empêchent le développement des oligodendrocytes dorsalement à leur domaine normal d'émergence, *in vivo*. Durant la réalisation de nos travaux, Wada et collaborateurs ont également montré, dans un système de culture organotypique d'explants de moelle épinière de souris, que la région dorsale contenait des signaux capables d'inhiber l'oligodrogenèse, en réduisant la prolifération des précurseurs et leur maturation (Wada *et al.*, 2000). L'extension dorsale des foyers neuroépithéliaux de précurseurs et l'augmentation de la densité des cellules du lignage dans la zone marginale, que nous observons suite à l'ablation de la région dorsale de la moelle épinière, pourraient aussi résulter de la levée d'un effet inhibiteur de la prolifération et, éventuellement, de la maturation des cellules oligodendrocytaires, de la part de facteurs normalement présents dorsalement. Cependant, la régulation de la prolifération cellulaire ne peut expliquer l'apparition de précurseurs oligodendrocytaires neuroépithéliaux O4⁺ dorsaux, à distance des foyers oligodendrogéniques, sachant qu'il n'y a pas de migrations cellulaires au sein du neuroépithélium à ces stades (Cameron-Curry et Le Douarin, 1995).

Compte tenu du fait que, dans la moelle épinière de poulet, l'expression de l'antigène O4 dans le neuroépithélium est un marqueur de détermination des oligodendrocytes (Soula *et al.*, 2001), nous proposons que des facteurs situés dans la partie dorsale de cette région du SNC inhibent normalement la spécification des précurseurs oligodendrocytaires dorsalement à leur domaine originel d'émergence.

Parmi les molécules exprimées dans le tube neural dorsal, les BMPs sont responsables de la genèse de plusieurs classes de neurones dorsaux (voir introduction, p. 38 et suivantes ; pour revue, voir Lee et Jessell, 1999) et sont connues pour réguler négativement en culture, le développement des oligodendrocytes à partir de progéniteurs neuraux, issus de différentes régions du cerveau des rongeurs (voir introduction, p. 65 ; Gross *et al.*, 1996 ; Mabie *et al.*, 1997, 1999 ; Zhu *et al.*, 1999a, 1999b ; Mehler *et al.*, 2000). Confirmant ces dernières données, la surexpression de BMP4 dans le système nerveux, *in vivo*, aboutit à une diminution de la densité des oligodendrocytes dans plusieurs régions du cerveau, chez la souris (Gomes *et al.*, 2003). Nos résultats indiquent que les BMPs sont capables de réprimer l'oligodendrogenèse dans la moelle épinière chez le poulet, *in vitro*, mais aussi *in vivo*, et qu'elles font partie des signaux inhibiteurs mis en évidence par l'excision de la région dorsale du tube neural, comme l'illustre l'effet de la réduction spécifique de l'activité BMP au moyen des greffes de cellules exprimant Noggin.

Les analyses réalisées en culture montrent que les BMPs inhibent le développement des oligodendrocytes de manière quasi-totale, que le traitement soit administré à un stade très précoce (E1,5) ou aux stades E3,5 à E5, proches de l'initiation de la détermination du lignage qui a lieu vers E5,5 (Soula *et al.*, 2001). L'inhibition observée suite à un traitement effectué à E1,5 résulte très probablement d'une dorsalisation du tissu neural comme en témoignent la répression du développement des motoneurones et l'augmentation du niveau d'expression du messager de Pax3, un marqueur de cellules neurales dorsales (Liem *et al.*, 1995). En revanche, l'effet des BMPs sur du tissu neural plus âgé semble plus spécifique, puisque le développement des motoneurones, dont la production cesse à E5 (Holiday et Hamburger, 1977 ; Soula *et al.*, 2001), n'apparaît pas affecté et il s'exercerait sur des cellules encore indéterminées. Plusieurs de nos résultats suggèrent, en effet, que les BMPs sont capables d'agir avant ou au moment de la spécification des oligodendrocytes.

- Premièrement, l'inhibition de l'activité BMP, par les greffes de cellules produisant Noggin au voisinage du tube neural, permet l'émergence de précurseurs O4⁺ ectopiques dans le neuroépithélium. Leur localisation neuroépithéliale et à distance des foyers

normaux de précurseurs permet d'envisager une induction locale de la détermination de ces cellules.

- Deuxièmement, l'absence de précurseurs O4⁺ dans le neuroépithélium ventral, consécutive à des greffes de cellules exprimant BMP2 contre la région ventrale de la moelle épinière, illustre l'inhibition de la spécification de ces cellules. Si les BMPs agissaient à une étape ultérieure du développement du lignage oligodendrocytaire, des précurseurs O4⁺ auraient dû être détectés dans la zone ventriculaire ventrale.

- Troisièmement, l'inhibition quasi-totale du développement des oligodendrocytes par BMP4 dans le neuroépithélium ventral prélevé à E5, soit environ 12 heures avant le début de la détermination des précurseurs, corrobore l'idée d'un effet s'exerçant au moment de cet événement.

- Quatrièmement, la suppression de l'oligodendrogenèse médiée par les BMPs est accompagnée par l'inhibition de l'expression de Olig2, un facteur de transcription requis pour la spécification des oligodendrocytes, dans le neuroépithélium, *in vitro* et *in vivo*.

- Enfin, l'effet suppresseur de BMP4 sur l'oligodendrogenèse n'est jamais total dans le neuroépithélium ventral isolé à E6, après l'initiation de la détermination des oligodendrocytes, suggérant que les BMPs ne peuvent plus modifier le destin de cellules déjà déterminées de manière irréversible à moins qu'elles ne soient déjà différenciées ; chez le poulet, O4 marque les précurseurs tout juste déterminés (Soula *et al.*, 2001) mais aussi les oligodendrocytes différenciés (Bansal *et al.*, 1992). En effet, des études réalisées sur des cultures de préprogéniteurs et de progéniteurs d'oligodendrocytes issus du cerveau de rat nouveau-né montrent que les BMPs sont capables d'empêcher la différenciation oligodendrocytaire mais n'agissent plus sur des oligodendrocytes différenciés (Mabie *et al.*, 1997 ; Grinspan *et al.*, 2000 ; Mehler *et al.*, 2000).

Par ailleurs, le fait que les cellules neuroépithéliales ventrales isolées de leur environnement soient sensibles à l'effet de BMP4 juste avant l'initiation de la détermination des oligodendrocytes suggère que cette protéine agit directement sur les cellules destinées à former des précurseurs oligodendrocytaires. A l'appui de cette idée, au moins chez la souris, l'ARN messager d'un des deux récepteurs de type I aux BMPs (BMPR-IA) est exprimé dans l'ensemble du neuroépithélium à ce stade et ce récepteur induit l'expression du messager du second récepteur de type I aux BMPs (BMPR-IB) en présence de BMPs (Panchision *et al.*, 2001).

L'inhibition des étapes précoces de l'oligodendrogenèse par les BMPs a tout récemment été observée dans la moelle épinière chez d'autres espèces. L'implantation d'une

bille imbibée de BMP4 contre la moelle épinière du xénope, *in vivo*, empêche totalement le développement des oligodendrocytes alors que celle d'une bille traitée par un anticorps bloquant la fonction de BMP4 suffit à induire l'oligodendrogenèse en région dorsale (Miller *et al.*, 2004). Des résultats analogues ont été obtenus sur des cultures de coupes transversales de moelle épinière de rat traitées avec ces ligands, solubles (Miller *et al.*, 2004).

Ensemble, ces nouvelles données et les nôtres, indiquent que les BMPs endogènes participent à la régulation spatiale de l'induction de l'oligodendrogenèse dans la moelle épinière. Il est possible qu'elles agissent également à des étapes ultérieures du développement du lignage, comme le suggèrent des résultats provenant d'études effectuées sur des cellules neurales de rongeurs, *in vitro*. Les BMPs sont capables d'empêcher la différenciation oligodendrocytaire dans des cultures de préprogéniteurs et progéniteurs d'oligodendrocytes isolés à partir du cerveau de rat nouveau-né (Mabie *et al.*, 1997 ; Grinspan *et al.*, 2000). De plus, dans des cultures de cellules dissociées de moelle épinière de rat, les cellules O4⁺ sont plus sensibles à l'effet de BMP4 que les cellules plus précoces du lignage oligodendrocytaire (*i. e.* les cellules A2B5⁺) (Miller *et al.*, 2004). Enfin, le fait que l'expression de BMP4 persiste après la naissance dans la moelle épinière dorsale de rat, qui est la dernière région à être myélinisée, permet de supposer un rôle de cette protéine dans la régulation de la différenciation oligodendrocytaire (Miller *et al.*, 2004). La détection d'oligodendrocytes plus tardifs, au moyen d'autres anticorps que O4, dans nos cultures de neuroépithélium ventral de E6 traitées par BMP4, ainsi que l'analyse de l'effet de cette protéine sur du tissu neural plus âgé, auraient permis d'étudier ce point.

De façon surprenante, l'effet inhibiteur de la région dorsale du tube neural sur le développement des oligodendrocytes, mis en évidence par Wada *et al.* dans des cultures de moelles épinières de souris ouvertes le long de la *roof plate*, n'a pu être mimé par l'addition de BMP4 dans ce système (Wada *et al.*, 2000). Cette différence entre nos résultats et ceux du groupe de Miller, d'une part, et ceux de Wada et collègues, d'autre part, reste inexplicée. Utilisant une technique de culture analogue à celle employée par l'équipe de Wada, nous avons pu montrer l'effet suppresseur de BMP4 sur l'oligodendrogenèse chez le poulet (Mekki-Dauriac *et al.*, 2002). Par ailleurs, un effet différentiel de BMP4 selon les espèces nous paraît improbable, cette protéine inhibant le développement des oligodendrocytes dans la moelle épinière chez le poulet, le xénope et le rat, espèce proche de la souris (cette étude ; Miller *et al.*, 2004), et dans des cultures de progéniteurs neuraux

issus du cerveau aussi bien chez le rat que la souris (Gross *et al.*, 1996 ; Mabie *et al.*, 1997, 1999 ; Zhu *et al.*, 1999a, 1999b ; Grinspan *et al.*, 2000 ; Mehler *et al.*, 2000).

Les greffes de cellules exprimant Noggin contre le tube neural aboutissent au développement de précurseurs O4⁺ neuroépithéliaux dorsalement à leur domaine normal d'émergence, un résultat mimant celui obtenu après ablation du quart le plus dorsal de la moelle épinière, suggérant que la source de l'activité BMP inhibée par Noggin est le tube neural dorsal. Cependant, rien n'exclut que les BMPs sensibles à l'inactivation par Noggin proviennent d'autres régions dans et/ou autour de la moelle épinière tels que les somites. Des données publiées depuis peu, indiquent que BMP4 est aussi exprimée dans les racines dorsales et leurs ganglions et dans la région ventrale de la moelle épinière, bien qu'à un plus faible niveau que dorsalement, au moment de la spécification des oligodendrocytes (Miller *et al.*, 2004).

Bien que les greffes de cellules produisant Noggin à proximité du tube neural aient un effet similaire à celui de l'excision de la partie dorsale de la moelle épinière, il est moins prononcé. Dans le second cas, des précurseurs O4⁺ se développent dans des régions du neuroépithélium plus dorsales qu'en conditions normales, chez tous les embryons examinés et au delà du *sulcus limitans*, pour certains d'entre eux. Concernant les expériences au moyen de cellules exprimant Noggin, certains individus présentent un patron d'oligodendrogenèse non modifié et chez les autres, l'apparition de précurseurs O4⁺ ectopiques est toujours restreinte à la moitié ventrale du neuroépithélium. Nous avons remarqué que, contrairement aux fibroblastes sécrétant BMP2, les cellules produisant Noggin ne formaient pas des agrégats très cohésifs et qu'elles avaient tendance à se disperser au lieu de persister près du tube neural sous la forme d'un greffon compact. Cette observation pourrait rendre compte d'un effet moins important que celui de l'ablation de la moelle épinière dorsale. La différence dans la sévérité de l'effet de nos deux types d'expériences visant à s'affranchir de la signalisation BMP pourrait également signifier que d'autres facteurs dorsaux, insensibles à l'activité de Noggin, participent à la régulation de l'oligodendrogenèse avec BMP4 et BMP7. D'autres membres de la superfamille du TGFβ tels que BMP5, DSL1, GDF6/7 et l'activine B sont exprimés dans la partie dorsale du tube neural (Liem *et al.*, 1997 ; Lee *et al.*, 1998) et certains partagent des effets communs avec BMP4 et BMP7. Par exemple, DSL1, qui est insensible à l'inhibition par la protéine Noggin (Liem *et al.*, 1997), mime la capacité de BMP4 à augmenter l'expression du facteur de transcription Pax3 (Liem *et al.*, 1995), à induire le développement des interneurons dorsaux D1 (Liem *et al.*, 1997) et à supprimer la différenciation des

motoneurones dans des explants de plaque neurale intermédiaire exposés à des signaux ventralisants de la corde et de la *floor plate* (Basler *et al.*, 1993). Il est donc possible que d'autres facteurs BMPs ou de type BMP-like agissent avec BMP4 et BMP7 dans la régulation de l'oligodendrogenèse. Il est en outre envisageable que des protéines de la famille Wnt, qui sont exprimées dans le tube neural dorsal, positivement régulées par l'ectoderme non neural qui le recouvre (Dickinson *et al.*, 1995) et impliquées dans la spécification de neurones dorsaux (Muroyama *et al.*, 2002), puissent intervenir dans ce processus.

II. BMP4 est capable d'antagoniser l'induction du développement des oligodendrocytes médiée par SHH

Il est clairement établi que le morphogène SHH, produit dans des régions proches des domaines oligodendrogéniques dont la corde et la *floor plate*, est nécessaire et suffisant pour la spécification des oligodendrocytes, *in vitro* et *in vivo*, dans l'ensemble du SNC (Poncet *et al.*, 1996 ; Orentas *et al.*, 1999 ; Alberta *et al.*, 2001 ; Davies et Miller, 2001 ; Nery *et al.*, 2001 ; Soula *et al.*, 2001 ; Spassky *et al.*, 2001). Dans certaines conditions, le tube neural dorsal est capable de générer des oligodendrocytes et SHH est également requise pour ce processus (Sussman *et al.*, 2000 ; Alberta *et al.*, 2001 ; Spassky *et al.*, 2001). En apparence contradiction avec ces données, bien que les oligodendrocytes ne se développent pas chez les souris mutantes pour le gène *SHH*, *in vivo*, des cellules dissociées du cerveau de ces individus peuvent donner naissance à des oligodendrocytes en culture (Nery *et al.*, 2001). Il est toutefois possible que des molécules apparentées à SHH telles que IHH (Indian Hedgehog) et DHH (Desert Hedgehog) puissent s'y substituer fonctionnellement, comme le suggère le fait que des régions n'exprimant pas SHH *in situ* aient la capacité à générer des précurseurs oligodendrocytaires *in vitro* et que ce phénomène soit inhibé en présence de cyclopamine. La détection des transcrits de SHH et IHH dans ces cultures supporte cette notion (Tekki-Kessarar *et al.*, 2001). Il apparaît par ailleurs que le FGF peut induire la formation d'oligodendrocytes dans des cultures de cellules issues du tube neural dorsal et ce, de manière indépendante de la signalisation Hh (Chandran *et al.*, 1998, 2003). Cependant, rien n'indique si ce scénario existe *in vivo*.

Partant de l'idée que la signalisation SHH est requise pour l'induction des oligodendrocytes, au moins *in vivo*, l'inhibition de ce processus par nos greffes de cellules exprimant BMP2 suggère que les BMPs sont capables de contrecarrer l'effet inducteur de SHH produite par la *floor plate*. L'absence de cellules du lignage oligodendrocytaire dans

les explants de neuroépithélium ventral, prélevés et soumis à BMP4 et SHH juste avant l'initiation de la détermination des précurseurs, confirme ce point et montre que cet antagonisme s'exerce au moment de la spécification des oligodendrocytes. Nos observations sont en accord avec des données indiquant que les BMPs inhibent le développement des oligodendrocytes médié par SHH dans des cultures de cellules issues du cerveau ou de la moelle épinière de rat (Zhu *et al.*, 1999b ; Miller *et al.*, 2004).

Plus tôt au cours du développement du SNC, les BMPs sont également capables d'antagoniser les effets de SHH. Par exemple, l'addition simultanée de BMP4 ou BMP7 et de SHH dans des cultures d'explants de plaque neurale entraîne le développement de neurones plus dorsaux que ceux produits sous l'effet de SHH seule (Liem *et al.*, 2000). Au contraire, l'inhibition de la signalisation BMP aboutit à une conversion de l'identité des cellules neuronales de la moelle épinière vers un destin plus ventral *in vitro* et *in vivo* (Liem *et al.*, 2000 ; Patten et Placzek, 2002). Il semble même, qu'au moins lors des étapes précoces du développement du SNC, l'inhibition de la signalisation BMP soit requise pour permettre la genèse des populations cellulaires ventrales. Ainsi, chez les souris mutantes pour le gène *Noggin*, normalement exprimé dans la chorde, la *floor plate* et plusieurs classes de neurones ventraux sont absentes dans la région caudale de la moelle épinière, malgré une expression normale de SHH dans la chorde. Ce phénotype est accompagné de l'expression anormale de BMP4 dans la chorde et la région ventrale du tube neural caudal (McMahon *et al.*, 1998). D'autre part, le fait qu'*in vivo*, SHH ne puisse mimer l'effet de la chorde dans l'induction du développement d'une *floor plate* ectopique, seulement si elle est coexprimée avec Chordin, soutient l'idée de la nécessité d'inhiber la signalisation BMP afin de permettre aux cellules neurales de répondre à SHH de manière appropriée (Patten et Placzek, 2002). Le développement de précurseurs oligodendrocytaires surnuméraires dans nos greffes de cellules sécrétant Noggin laisse penser que la réduction de l'activité BMP crée également un environnement favorisant l'effet inducteur de SHH à des stades plus tardifs. Ces observations expliquent vraisemblablement pourquoi des greffes de cellules exprimant SHH contre la région dorsale du tube neural, réalisées chez le poulet, au laboratoire, ne suffisent pas à promouvoir le développement ectopique des oligodendrocytes *in vivo* (Poncet *et al.*, non publié), au contraire des greffes de chorde (Orentas *et al.*, 1996 ; Poncet *et al.*, 1996). Cependant des résultats récents, obtenus chez le xénope, indiquent que l'implantation d'une bille imprégnée de SHH contre la moelle épinière dorsale aboutit à la genèse d'oligodendrocytes dorsaux (Miller *et al.*, 2004). Cette différence dépend peut-être du modèle animal utilisé, de la technique de microchirurgie

employée avec, par exemple, une perturbation de l'environnement de la moelle épinière dorsale et de la signalisation susceptible d'en provenir ou, plus simplement, de la dose de SHH présente localement. Quoi qu'il en soit, nos résultats indiquent que les activités antagonistes des BMPs et de SHH, à l'œuvre lors de l'établissement de la *floor plate* et des populations neuronales ventrales de la moelle épinière, s'exercent au moins jusqu'au moment de la détermination des oligodendrocytes et suggèrent qu'elles régulent également la spécification des cellules gliales dans cette région du SNC. L'interaction entre les systèmes de signalisation BMP et SHH semble donc être une caractéristique générale de la moelle épinière, permettant la mise en place correcte des populations neurales qui la composent. Nous proposons que la position à laquelle les précurseurs oligodendrocytaires doivent être spécifiés, selon l'axe dorso-ventral de la moelle épinière, dépend de l'intégration des activités SHH et BMP.

Les mécanismes de l'antagonisme entre les BMPs et SHH sont encore inconnus. Des données indiquent que des signaux dorsalisants du tube neural seraient capables d'inhiber l'expression de SHH dans le SNC. Ainsi, la greffe de cellules produisant BMP7 contre la région latéro-ventrale du cerveau postérieur aboutit à une diminution considérable du niveau d'expression de SHH dans la *floor plate* (Arkell et Beddington, 1997). D'autre part, des explants de moelle épinière dorsale, qui n'expriment pas SHH au moment de leur prélèvement, sont capables de générer des oligodendrocytes après une longue période de culture, un processus dépendant de l'activité de SHH qui s'y trouve alors exprimée (Sussman *et al.*, 2000). Les auteurs proposent que la dilution des signaux dorsaux initialement présents dans ces explants permet l'expression de SHH. Enfin, l'implantation d'une bille imprégnée de Chordin contre la partie ventrale de la gouttière neurale entraîne une extension du domaine d'expression de SHH en direction dorsale (Patten et Placzek, 2002). De manière analogue, l'expression de Noggin au voisinage de la moelle épinière pourrait permettre l'extension dorsale de celle de SHH, ce qui aurait pour conséquence l'émergence de précurseurs oligodendrocytaires plus dorsaux. Cependant, l'observation que le profil d'expression de SHH n'est pas modifié en présence d'un greffon de cellules sécrétant BMP2 rend cette hypothèse improbable. Elle indique, au contraire, que l'inhibition de la spécification des oligodendrocytes médiée par les BMPs ne résulte pas de la régulation de l'expression de SHH.

Le fait que, dans notre système de culture de neuroépithélium ventral, les BMPs inhibent l'induction du développement des oligodendrocytes par SHH montre que ces protéines peuvent agir sur les cellules cibles malgré la présence de SHH. En absence

d'éléments permettant de supposer une interaction directe entre les BMPs et SHH, il est possible que ces molécules s'antagonisent au niveau intracellulaire. A l'appui de cette hypothèse, les BMPs altèrent la réponse des cellules neurales à SHH, en aval de sa présentation et probablement, à une étape proximale de la voie de transduction du signal comme le suggère la répression de l'induction de l'expression de HNF3 β et de *Ptc*, dont les gènes sont considérés comme étant des gènes de réponse immédiate à SHH (Liem *et al.*, 2000). Il a par ailleurs été rapporté que les facteurs de transcription Smad et Gli, effecteurs des signalisations BMP et SHH, respectivement, pouvaient s'associer *in vitro* (Liu *et al.*, 1998). Il est donc tentant d'imaginer que les voies de transduction de SHH et des BMPs convergent au niveau transcriptionnel dans les cellules neurales de la moelle épinière. Alternativement, les BMPs pourraient modifier la compétence des cellules neuroépithéliales à répondre à SHH, par exemple, en les orientant irréversiblement dans une voie de différenciation (qui reste à déterminer) sans interférer avec la voie de signalisation Hh.

III. Les BMPs inhibent la spécification des oligodendrocytes *via* la répression de l'expression du facteur de transcription Olig2

Les observations que, chez le poulet au moins, les précurseurs oligodendrocytaires ne sont jamais localisés dans la région du neuroépithélium exprimant Pax6 (Soula *et al.*, 2001), qu'ils n'expriment jamais ce facteur de transcription (cette étude ; Soula *et al.*, 2001) et qu'à une dose qui induit l'oligodendrogenèse, SHH réprime son expression (Ericson *et al.*, 1997) peuvent laisser penser que Pax6 inhibe le développement des oligodendrocytes et pourrait alors être un médiateur de l'effet des BMPs. Plusieurs données sont en accord avec cette double hypothèse. La limite ventrale du domaine Pax6 positif est repoussée de 5 à 6 diamètres cellulaires dorsalement au moment de la détermination du lignage, et ce processus, affranchissant le domaine où seront spécifiés les oligodendrocytes de l'expression de Pax6, requiert l'activité de SHH (Agius *et al.*, 2004). D'ailleurs, de manière intéressante, l'émergence des oligodendrocytes ne peut être induite dans la partie intermédiaire du neuroépithélium qui correspond au domaine exprimant un fort niveau de Pax6 (résultat non publié du laboratoire), lequel n'est pas diminué par l'expression ectopique de SHH *in vivo*, au moins plus tôt au cours du développement (Patten et Placzek, 2002). Par contre, la greffe de cellules exprimant Chordin contre la région latéro-ventrale du tube neural baisse l'expression de Pax6 dans le neuroépithélium adjacent et cet effet est augmenté en présence de cellules produisant SHH, indiquant que des BMPs favorisent

l'expression de Pax6 et empêchent l'action de SHH à ces stades précoces (Patten et Placzek, 2002). Notons cependant que, chez la souris pour laquelle au moins une fraction des précurseurs oligodendrocytaires sont situés dans la partie la plus ventrale du domaine Pax6 positif *-i. e.* exprimant de faibles niveaux de Pax6-, l'absence de la fonction de Pax6 ne modifie pas le nombre de précurseurs générés. Le rôle de ce facteur de transcription serait de positionner correctement le site d'origine des oligodendrocytes comme l'indique leur émergence en région plus dorsale chez le mutant murin *Sey^{-/-}* (Sun *et al.*, 1998).

Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet de SHH sur le nombre de cellules exprimant Pax6 dans les cultures de neuroépithélium ventral, à une concentration suffisante pour induire le développement des oligodendrocytes. Des résultats indiquent pourtant que cette protéine est nécessaire et suffisante, à des doses inférieures, pour la répression de l'expression de Pax6 *in vitro* dans la plaque neurale ou dans des cultures organotypiques de moelle épinière (Ericson *et al.*, 1997 ; Liem *et al.*, 2000 ; Agius *et al.*, 2004). Il est toutefois possible que le traitement ait modifié le niveau d'expression de ce facteur de transcription et que notre méthode d'immunodétection, avec amplification du signal, masque des différences quantitatives ou que le nombre de cellules affectées soit trop faible pour être visible. Alternativement, l'inhibition de l'expression de Pax6 par SHH à ce stade tardif, comme aux stades précoces (*cf.* ci-dessus résultats de Patten et Placzek, 2002), requiert d'autres facteurs présents dans la plaque neurale et le tube neural (*cf.* résultats de Ericson *et al.*, 1997 ; Liem *et al.*, 2000 ; Agius *et al.*, 2004), mais absents du neuroépithélium ventral. A l'appui de cette éventualité, le cotraitement d'explants de plaque neurale avec SHH, à une dose insuffisante pour réprimer totalement l'expression de Pax6, et Follistatine aboutit à l'absence de cellules exprimant ce facteur de transcription, indiquant que l'inhibition de l'activité BMP sensibilise les cellules neurales à l'effet de SHH (Liem *et al.*, 2000).

En revanche, nous montrons que la répression de l'oligodendrogenèse par BMP4 dans les cultures de neuroépithélium ventral s'accompagne d'une augmentation du nombre de cellules exprimant Pax6, malgré la présence de SHH. En concordance avec nos observations, l'activation de la signalisation BMP dans l'ensemble du tube neural *in vivo* aboutit à l'augmentation du niveau d'expression de Pax6 dans le neuroépithélium ventral (Timmer *et al.*, 2002) et l'implantation d'une bille imbibée de Chordin contre la région latéro-ventrale du tube neural (Patten et Placzek, 2002) ou l'expression ectopique de Follistatine par électroporation dans le tube neural (Liem *et al.*, 2000) causent l'effet inverse. Enfin, l'adjonction de BMPs à une dose de SHH, suffisante pour réduire le niveau

d'expression de Pax6 dans des explants de plaque neurale, entraîne une augmentation de ce dernier (Liem *et al.*, 2000).

Nos résultats restent donc en accord avec l'hypothèse selon laquelle les BMPs pourraient inhiber l'oligodendrogenèse *via* l'augmentation de l'expression de Pax6. Cependant, le fait que l'induction du développement des oligodendrocytes par SHH ne s'accompagne pas d'une réduction apparente de l'expression de Pax6 suggère que, si ce processus existe, il n'est pas prépondérant et que la régulation de la spécification des oligodendrocytes implique d'autres facteurs. Alternativement, l'augmentation du niveau d'expression de Pax6 en présence de BMP4 n'interviendrait pas dans la répression du développement du lignage oligodendrocytaire et serait une conséquence de l'effet de BMP4 sur l'expression et/ou l'activité d'autres facteurs.

Etant établi que Pax6 et Nkx2.2 répriment mutuellement leur expression de manière cellule autonome (Ericson *et al.*, 1997 ; Briscoe *et al.*, 2000), nous nous attendions à ce que le nombre de cellules exprimant Pax6 et le nombre de cellules exprimant Nkx2.2 évoluent de façon opposée dans nos cultures de neuroépithélium ventral, pour une condition de traitement donnée. Ainsi, du fait de cet antagonisme, BMP4 régulerait positivement l'expression de Pax6 et négativement celle de Nkx2.2, ce dernier effet pouvant être à l'origine de l'absence d'oligodendrocytes. Ce n'est cependant pas le cas, puisque dans ces cultures, le nombre de cellules exprimant Nkx2.2 n'est pas modifié malgré une augmentation de celui des cellules Pax6 positives et l'inhibition de l'oligodendrogenèse. Inversement, en présence de SHH, le nombre de cellules Nkx2.2 positives est augmenté, conformément à des données montrant que SHH induit l'expression de ce facteur de transcription dans l'ébauche neurale (Ericson *et al.*, 1997), alors que le nombre de cellules exprimant Pax6 n'est pas visiblement affecté. Sous l'effet simultané de SHH et de BMP4, on observe même une augmentation parallèle des populations Nkx2.2 positive (de l'ordre de celle obtenue en la seule présence de SHH) et Pax6 positive (moins importante qu'avec BMP4 seule), montrant que, dans nos conditions de culture, BMP4 n'antagonise pas l'effet de SHH sur l'expression de Nkx2.2. A la différence de ce que nous observons, les BMPs entraînent une diminution du nombre de cellules Nkx2.2 positives produites en réponse à SHH, dans des explants de plaque neurale (Liem *et al.*, 2000). Cependant, cet effet est plus ou moins prononcé en fonction du ratio de BMPs et de SHH utilisé. Ceci suggère que la divergence entre notre résultat et celui de Liem et collègues pourrait provenir d'une différence dans les quantités relatives de BMPs et SHH employées dans les deux études.

Dans nos greffes de cellules sécrétant BMP2 contre la région ventrale du tube neural, le profil d'expression de Nkx2.2 n'est pas affecté non plus. En particulier, l'extension dorsale de son domaine d'expression, dépendante de SHH (Agius *et al.*, 2004), a lieu en dépit de la présence du greffon, confirmant *in vivo* que les BMPs n'interfèrent pas avec la régulation de l'expression de Nkx2.2 par SHH, au moins dans ce contexte. Ceci indique en outre que les cellules neuroépithéliales reçoivent le signal SHH même lorsque les BMPs sont surexprimées et supporte l'hypothèse d'un antagonisme des activités SHH et BMP au niveau intracellulaire.

Le fait que l'expression de Nkx2.2 ne soit pas affectée par les BMPs, *in vitro* et *in vivo*, dans des conditions où la spécification des oligodendrocytes est inhibée indique que cet effet des BMPs ne passe pas par la régulation de l'expression de ce facteur de transcription. Ceci corrobore l'idée que cette protéine n'est pas suffisante pour l'émergence des oligodendrocytes (Sun *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 2001).

Un autre facteur de transcription, Olig2, dont l'expression est positivement régulée par SHH, est présent dans une fraction de précurseurs oligodendrocytaires, puis dans la plupart, sinon tous, les oligodendrocytes (Lu *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2000, 2001 ; Fu *et al.*, 2002 ; Danesin *et al.*, en préparation). Au moment de la détermination du lignage, les domaines neuroépithéliaux Nkx2.2⁺ et Olig2⁺, initialement adjacents, se chevauchent partiellement du fait de l'extension dorsale de la région exprimant Nkx2.2 (Sun *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 2001 ; Fu *et al.*, 2002) attribuée à l'activité de SHH (Agius *et al.*, 2004).

En corrélation avec ces données, les explants de neuroépithélium ventral prélevés avant la spécification des oligodendrocytes et cultivés seuls contiennent des populations distinctes de cellules Nkx2.2⁺ et Olig2⁺, avec de rares cellules doublement positives, alors qu'en présence de SHH, l'expression de Olig2 et de Nkx2.2 est accrue et la plupart des cellules marquées coexpriment ces deux facteurs de transcription. Les cellules oligodendrocytaires générées dans ces conditions expriment toutes Olig2 et Nkx2.2, illustrant vraisemblablement le fait que l'expression forcée de ces facteurs dans la moelle épinière aboutit à l'émergence de précurseurs ectopiques seulement s'ils sont coexprimés (Zhou *et al.*, 2001).

A l'opposé, l'inhibition de l'oligodendrogenèse par les BMPs dans ces cultures est associée à une réduction massive du nombre de cellules Olig2⁺, malgré la présence de SHH. Nos résultats de greffe de cellules sécrétant BMP2 contre le tube neural *in vivo* confirment ce point et montrent que les BMPs agissent sur le neuroépithélium. Ils indiquent en outre que l'effet des BMPs résulterait plutôt de l'inhibition de l'expression de

Olig2 que d'une diminution de la prolifération ou de l'induction de la mort de ces cellules puisque plus aucune cellule n'exprime Olig2 et la taille du domaine Nkx2.2⁺, qui contient une fraction de cellules normalement Olig2⁺, n'est pas modifiée dans ces conditions. En présence du greffon de cellules produisant BMP2, on observe une réduction, totale dans certains cas, de l'expression des messagers Olig2 dans le neuroépithélium indiquant que l'inhibition de l'expression de Olig2 par les BMPs s'exerce, au moins en partie, au niveau transcriptionnel (non montré). Cet effet pourrait être indirect et passer par l'inhibition de l'expression de Nkx6.1 et/ou Nkx6.2, requise(s) pour celle de Olig2 (Novitch *et al.*, 2001).

Le fait que l'induction de la détermination des oligodendrocytes par SHH soit accompagnée d'une augmentation du nombre de cellules Olig2 positives, que tous les oligodendrocytes expriment ce facteur et qu'inversement, l'inhibition de la spécification de ces cellules par les BMPs soit corrélée à la répression de l'expression de Olig2 suggère fortement que les BMPs bloquent l'émergence des précurseurs oligodendrocytaires en empêchant l'expression de Olig2. Au moment de notre étude, plusieurs laboratoires ont démontré la nécessité de Olig2 pour les étapes précoces de l'oligodendrogenèse grâce à des analyses de perte de fonction (Lu *et al.*, 2002 ; Park *et al.*, 2002 ; Takebayashi *et al.*, 2002 ; Zhou et Anderson, 2002), soutenant ainsi cette hypothèse. Dans ce contexte, il serait intéressant de savoir si l'induction de précurseurs oligodendrocytaires en position dorsale sous l'effet de l'inhibition de l'activité BMP par Noggin ou de l'ablation de la région dorsale du tube neural est accompagnée de l'expression ectopique de Olig2 et éventuellement, de celle de Nkx2.2. En effet, bien que requis pour la spécification des oligodendrocytes, Olig2 ne devient suffisant pour ce processus qu'en présence de Nkx2.2 ou de conditions où l'expression de Ngn1/2 est inhibée (Zhou *et al.*, 2001).

Par ailleurs, reposant sur des données suggérant que Olig2 module négativement l'expression de Pax6, l'augmentation du nombre de cellules Pax6 positives observée dans les explants de neuroépithélium ventral traités par BMP4 pourrait s'expliquer par l'inhibition de l'expression de Olig2 dans ces cultures. Ainsi, chez les souris dont le gène *Olig2* a été invalidé, le niveau d'expression de Pax6 est accru dans les cellules neuroépithéliales du domaine qui aurait dû exprimer une protéine Olig2 normale (Lu *et al.*, 2002 ; Takebayashi *et al.*, 2002 ; Zhou et Anderson, 2002) et l'expression ectopique de Olig2 dans le cerveau postérieur chez le poulet aboutit à l'effet inverse (Mizuguchi *et al.*, 2001).

IV. Que deviennent les cellules normalement destinées à former des oligodendrocytes en présence de BMPs?

En absence de la fonction de Olig2 (en présence ou non de celle de Olig1), aucune cellule du lignage oligodendrocytaire ne se développe dans la moelle épinière et, de manière intéressante, au moins la moitié des cellules qui expriment un gène rapporteur sous le contrôle des séquences régulatrices de *Olig2*, expriment des marqueurs astrocytaires au lieu du marqueur oligodendrocytaire O4 (Takebayashi *et al.*, 2002 ; Zhou et Anderson, 2002). Dans des cultures de moelle épinière de souris homozygotes *Olig1*^{-/-} ; *Olig2*^{-/-}, beaucoup de cellules marquées par l'expression du gène rapporteur se différencient en astrocytes mais aucune en oligodendrocyte (Zhou et Anderson, 2002). Les résultats de ces études de lignage suggèrent clairement que les cellules normalement destinées à former des oligodendrocytes deviennent des astrocytes, en absence de Olig2. Ainsi, ce facteur de transcription qui est requis pour la spécification des oligodendrocytes dans la moelle épinière pourrait simultanément y réprimer le destin astrocytaire. En outre, des études toutes récentes indiquent que Olig2 est capable d'inhiber la différenciation astrocytaire à partir de précurseurs neuraux *in vitro* (Gabay *et al.*, 2003 ; Fukuda *et al.*, 2004).

Nous montrons que la répression de l'oligodendrogenèse par les BMPs est couplée à une inhibition de l'expression de Olig2 dans la moelle épinière de poulet. Compte tenu des conséquences de l'invalidation du gène *Olig2* sur la gliogenèse, mentionnées ci-dessus, il est tentant d'imaginer que dans notre système, la présence des BMPs oriente les cellules neuroépithéliales qui auraient exprimé Olig2 et généré des oligodendrocytes, vers le destin astrocytaire. Soutenant cette idée, de nombreuses analyses réalisées chez les rongeurs montrent que l'inhibition du développement oligodendroglial médiée par les BMPs s'accompagne d'une stimulation concomitante de l'astrocytogenèse dans des cultures de progéniteurs neuraux provenant de différentes régions du cerveau (Gross *et al.*, 1996 ; Mabie *et al.*, 1997, 1999 ; Zhu *et al.*, 1999a, 1999b ; Grinspan *et al.*, 2000 ; Mehler *et al.*, 2000) et également dans plusieurs zones du cerveau *in vivo* (Gomes *et al.*, 2003). Ainsi, l'effet suppresseur de l'oligodendrogenèse des BMPs pourrait, au moins partiellement, résulter de l'orientation des cellules pluripotentes dans la voie des astrocytes. Par ailleurs, SHH qui est nécessaire et suffisante pour l'expression de Olig2 (Lu *et al.*, 2000 ; Takebayashi *et al.*, 2000 ; Agius *et al.*, 2004) et la spécification des oligodendrocytes (Orentas *et al.*, 1999 ; Soula *et al.*, 2001) et qui montre des effets opposés à et antagonistes de ceux des BMPs dans ces processus (cette étude ; Zhu *et al.*, 1999b ; Miller *et al.*, 2004), est également capable de supprimer l'effet des BMPs sur le développement des astrocytes

(Zhu *et al.*, 1999b). De plus, SHH inhibe l'expression de marqueurs précoces du lignage astrocytaire dans la moelle épinière de poulet et le développement ultérieur d'une fraction d'astrocytes (Agius *et al.*, 2004).

En dépit de l'ensemble de ces informations suggérant que la spécification des lignages oligodendrocytaire et astrocytaire pourraient être liées, nos expériences n'ont pas montré de stimulation de l'astrocytogenèse aux dépens de l'oligodendrogenèse. Dans des cocultures de tissu neural ventral et de cellules produisant BMP2 et dans un système de culture organotypique de moelle épinière en présence de BMP4, le développement des cellules exprimant la GFAP n'était pas modifié par le traitement, malgré une inhibition sévère du développement des oligodendrocytes. Ceci pourrait signifier que des doses de BMPs suffisantes pour la répression de l'oligodendrogenèse ne le soient pas pour la stimulation de l'astrocytogenèse. Il est d'autre part possible que l'effet des BMPs concerne une trop faible proportion de cellules neuroépithéliales pour être apparent dans nos conditions. D'ailleurs, chez les mutants pour le gène *Olig2*, où des études de lignage indiquent que l'absence de la fonction *Olig2* permet l'émergence d'astrocytes GFAP⁺ à partir du domaine normalement oligodendrogénique (Zhou et Anderson, 2002), le patron d'expression de la GFAP est inchangé (Lu *et al.*, 2002 ; Takebayashi *et al.*, 2002), suggérant que les astrocytes spécifiés dans ces conditions sont trop peu nombreux pour modifier significativement le nombre total de cellules astrocytaires. Le fait que, dans la moelle épinière de poulet, l'inhibition du développement astrocytaire par SHH s'accompagne de l'induction de l'expression de *Olig2* dans des territoires importants du neuroépithélium pourrait expliquer pourquoi la diminution de la population GFAP⁺ est visible dans ce contexte (Agius *et al.*, 2004). De la même façon, l'expression de GLAST n'est pas affectée par les greffes de cellules sécrétant BMP2 contre la moelle épinière, dans des conditions où la spécification du lignage oligodendrocytaire est abolie. On peut penser que si les BMPs induisent l'astrocytogenèse, elles n'affectent pas les cellules de glie radiale qui expriment GLAST, vraisemblablement présentes avant le traitement, mais leur développement ultérieur en astrocytes, lequel ne nécessiterait pas une augmentation du niveau d'expression de GLAST. L'analyse de l'expression d'autres marqueurs du lignage astrocytaire tels que le FGFR3 dans ce type de greffe pourrait apporter des informations complémentaires sur ce point.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Les résultats de ce travail permettent de penser que des BMPs présentes dans et/ou autour de la moelle épinière s'opposent à l'induction du développement des oligodendrocytes par SHH *via* la répression de l'expression de Olig2.

Sachant que les BMPs sont capables de maintenir l'expression de Gli3, un inhibiteur des réponses à SHH exprimé dans le neuroépithélium selon un gradient croissant de la région ventrale vers la région dorsale, dans des explants de plaque neurale et que les Smads, effecteurs de la signalisation BMP, interagissent physiquement avec Gli3, il serait intéressant de savoir si les BMPs antagonisent l'effet inducteur de SHH *via* la régulation de l'expression et/ou l'activité de Gli3. Des expériences de surexpression des BMPs dans le tube neural de poulet dans le but d'étudier l'expression des gènes cibles de SHH, Gli1, Gli2 et Gli3, sont en cours au laboratoire.

Le rôle de SHH dans la spécification des oligodendrocytes pourrait être d'antagoniser l'activité BMP et/ou ses effets. Etayant cette hypothèse, le phénotype des doubles mutants SHH^{-/-} ; Gli3^{-/-} suggère qu'une des fonctions de SHH dans l'établissement des populations neuronales ventrales de la moelle épinière serait de contrer l'activité de Gli3. Alternativement, limiter l'activité BMP ventralement serait nécessaire mais pas suffisant pour la détermination des oligodendrocytes et permettrait de créer un domaine de compétence à répondre à SHH de manière appropriée. L'étude de l'oligodendrogenèse dans le contexte de l'inhibition simultanée des signalisations Hh et BMP dans le tube neural pourrait aider à comprendre la signification de l'antagonisme SHH/BMP.

L'inhibition de l'oligodendrogenèse par les BMPs s'accompagne d'une répression de l'expression de Olig2 et d'une augmentation de celle de Pax6, au moins *in vitro*. Des résultats d'expériences de perte et de gain de fonction indiquent que Olig2 est capable de moduler négativement l'expression de Pax6 dans le neuroépithélium et plusieurs observations pourraient suggérer que Pax6 inhibe l'oligodendrogenèse chez le poulet. Il semble donc envisageable que la répression de l'expression de Olig2 par les BMPs stimule celle de Pax6 et que l'inhibition de l'oligodendrogenèse soit une conséquence de l'expression de Pax6 dans le domaine exprimant normalement Olig2. Afin d'élucider ce point, il faudrait premièrement chercher à savoir si des greffes de cellules exprimant les BMPs modifient le patron d'expression de Pax6 dans le neuroépithélium *in vivo*. Si ces greffes causent une augmentation de l'expression de Pax6 dans le domaine normalement Olig2 positif, la prochaine étape de l'étude du mode d'action des BMPs dans la régulation de la mise en place des oligodendrocytes serait de savoir si Pax6 est capable d'inhiber la

spécification de ces cellules. L'électroporation d'ADNc de Pax6 dans le tube neural devrait permettre de répondre à cette question.

D'autre part, l'inhibition de l'oligodendrogenèse par les BMPs fait vraisemblablement intervenir la régulation de l'expression et/ou de l'activité d'autres intermédiaires que Olig2 puisque ces protéines suppriment l'émergence de tous les précurseurs oligodendrocytaires (identifiés par l'expression de O4) alors que seulement une fraction d'entre eux expriment Olig2 au moment de la détermination. Des études de lignage amorcées au laboratoire permettront en premier lieu de savoir si le stade de détermination des oligodendrocytes précédemment défini à E5-5,5 (Soula *et al.*, 2001) concerne l'ensemble des précurseurs oligodendrocytaires ou seulement l'une ou l'autre des deux populations.

Enfin, il serait utile de suivre le devenir des cellules neuroépithéliales qui n'expriment plus Olig2 en présence de BMPs. L'étude de l'expression de marqueurs neuronaux et astrocytaires dans des cultures de neuroépithélium ventral prélevé avant la détermination des oligodendrocytes et soumis à un cotraitement par SHH et BMP permettra probablement d'apporter des indications concernant cette question. Des résultats très préliminaires obtenus au laboratoire semblent indiquer que la surexpression des BMPs dans la moelle épinière embryonnaire de poulet entraîne une extension en direction ventrale du domaine d'expression de GLAST et une extinction de l'expression de FGFR3, suggérant que, dans ce contexte, les cellules du neuroépithélium deviennent des cellules de glie radiale, cellules neurales souches. De manière intéressante, des données récentes montrent que les BMPs sont requises en coopération avec le LIF pour le maintien de la capacité des cellules souches embryonnaires de souris (cellules ES) à s'auto-renouveler (Qi-Long Ying *et al.*, 2003). Les protéines BMPs favoriseraient-elles un maintien ou un retour des cellules neuroépithéliales à l'état souche, empêcheraient-elles la transition neurogenèse/gliogenèse, ou orienteraient-elles ces cellules vers un destin astroglial?

MATERIELS
ET
METHODES

I. Embryons

Les expériences ont été réalisées chez l'embryon de poulet (*Gallus gallus domesticus*) de la variété *White Leghorn*. Les œufs fécondés, d'origine commerciale, sont conservés à 16°C puis incubés à 38°C en atmosphère humide, jusqu'à ce qu'ils atteignent le stade de développement approprié. Ce dernier est déterminé selon la table de développement établie par Hamburger et Hamilton (1992).

II. Milieux de culture

1. Plaque neurale médiane et neuroépithélium ventral

Les explants de plaque neurale médiane et de neuroépithélium ventral ont été cultivés en SFRI4 (milieu chimiquement défini sans sérum, SFRI Laboratoire, France) additionné de 1% de sérum de veau fœtal (FCS ; DAP ou Sigma).

2. Tube neural ventral

Les explants de tube neural ventral ont été cultivés en DMEM («*Dulbecco's modified Eagle's medium*») à 4,5 g/l de glucose (Biomedica) supplémenté avec 5% de FCS (DAP ou Sigma), 50 mg/l de gentamycine (Sigma) et 480 mg/l de glutamine (Sigma).

3. Préparation du gel de collagène

Les cultures de tissus neuraux ont été réalisées sur un substrat consistant en un gel de collagène constitué de 8 volumes d'une solution de collagène (*Cellon bovine dermal collagen*), d'un volume de solution NaOH 0,2 M tamponnée à l'HEPES (0,2 M) et d'un volume de solution saline tamponnée concentrée (PBS 10X : 80 g/l de NaCl (Merck), 2 g/l de KCl (Merck), 2 g/l de KH₂PO₄ (Merck) et 14,42 g/l de Na₂HPO₄/2H₂O (Merck)) de pH ajusté à 7,4. Un volume de 15 µl de ce mélange est déposé et étalé sur des lamelles de plastique de 14 mm de diamètre, placées dans le fond des puits de culture (Nunc). La polymérisation du gel de collagène est obtenue après incubation des puits de culture ainsi préparés, à 37°C pendant 15 minutes.

4. Lignée cellulaire Q2bn

Cette lignée était entretenue en milieu DMEM/F12 («*Dulbecco's modified Eagle's medium/Nut Mix F-12*») (1/1) (Gibco BRL) complétement en FCS (DAP ou Sigma) à 8%, sérum de poulet (*chicken serum*, Gibco BRL) à 2%, gentamycine (Sigma) à 50 mg/l, glutamine (Sigma) à 480 mg/l et en généticine® (*Antibiotic G-418 sulphate*, Gibco BRL) à 800 mg/l. Les agrégats de cellules Q2bn ont été préparés dans le milieu décrit ci-dessus mais ne contenant pas de généticine.

5. Lignée cellulaire CHO (*Chinese Hamster Ovary*)

Les cellules CHO ont été cultivées en milieu α-MEM sans nucléosides (Gibco BRL) additionné de 10% de FCS dialysé (Gibco BRL), de 10 ml/l de L-glutamine 200 mM 100X (Gibco BRL), de 10 ml/l de pénicilline-streptomycine 10000UI/ml 100X (Gibco BRL), de 80 µM de

méthotrexate (*Amethopterin*, Sigma). Les agrégats de cellules CHO ont été préparés en milieu CHO-S-SFMII (Gibco BRL) supplémenté avec 3% de FCS dialysé (Gibco BRL), 10 ml/l de L-glutamine 200 mM 100X (Gibco BRL), 10 ml/l de pénicilline-streptomycine 10000 UI/ml 100X (Gibco BRL).

Nota : le milieu CHO-S-SFMII est un milieu de culture complet, sans sérum, optimisé pour la croissance et le maintien des cellules CHO et pour la production de protéines recombinantes dans les cultures en suspension.

III. Prélèvement des tissus embryonnaires

Les embryons sont prélevés au stade approprié, rincés dans un tampon phosphate salin (PBS 1X de pH 7,4 composé de 8g/l de NaCl (Merck), 0,2 g/l de KCl (Merck), 0,2 g/l de KH_2PO_4 (Merck) et 1,442 g/l de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/2\text{H}_2\text{O}$ (Merck)) et les tissus sont disséqués dans du milieu de culture ou dans une solution de sels de Tyrode (Gibco BRL ou Sigma) à 9,5 g/l dont le pH (7,4) est tamponné avec une solution de NaHCO_3 (Merck). Les dissections sont réalisées sous une loupe binoculaire.

1. Plaque neurale médiane

La région médiane de la plaque neurale caudale, située entre le dernier somite individualisé et le nœud de Hensen, est prélevée chez des embryons de 1,5 jours de développement (E1,5/stade HH 10). L'embryon, épinglé face ventrale vers l'expérimentateur, est incubé dans une solution de trypsine à 0,1% dans du Tyrode durant 5 à 10 min., pendant lesquelles, l'endoderme, le mésoderme paraxial non segmenté et la corde sont retirés, du dernier somite formé au nœud de Hensen, à l'aide d'une aiguille à insecte de 0,2 mm de diamètre. La réaction enzymatique est alors arrêtée avec du milieu de culture SFRI4 riche en sérum (SFRI4 à 10% de FCS). Le tiers médian (environ) de la largeur de la plaque neurale caudale -selon le futur axe dorso-ventral- est ensuite découpé longitudinalement de part et d'autre de la *floor plate* et transversalement en arrière du dernier somite formé et légèrement en avant du nœud de Hensen (figure 74) avec une fine aiguille à insecte (0,1 mm de diamètre), selon la méthode décrite par Yamada et collaborateurs (Yamada *et al.*, 1993).

2. Tube neural ventral

La région ventrale de la portion du tube neural qui s'étend du niveau cervical (postérieur au rhombencéphale) au niveau lombaire (faisant face aux bourgeons de membres postérieurs) est prélevée chez des embryons de E3,5 à E4,5 (stades HH 22 à 25). La dissection est réalisée dans une solution de sels de Tyrode, l'embryon étant épinglé face dorsale vers l'expérimentateur. L'ectoderme est décollé de la surface du tube neural avec des pinces fines et éliminé. Le tube neural est ouvert dorsalement, le long de la *roof plate*, du niveau cervical au niveau lombaire, au moyen d'un micro-scalpel et dégagé des tissus environnants (des somites de part et d'autre et de la corde dessous) avec une aiguille à insecte, puis coupé au niveau des limites antérieure et

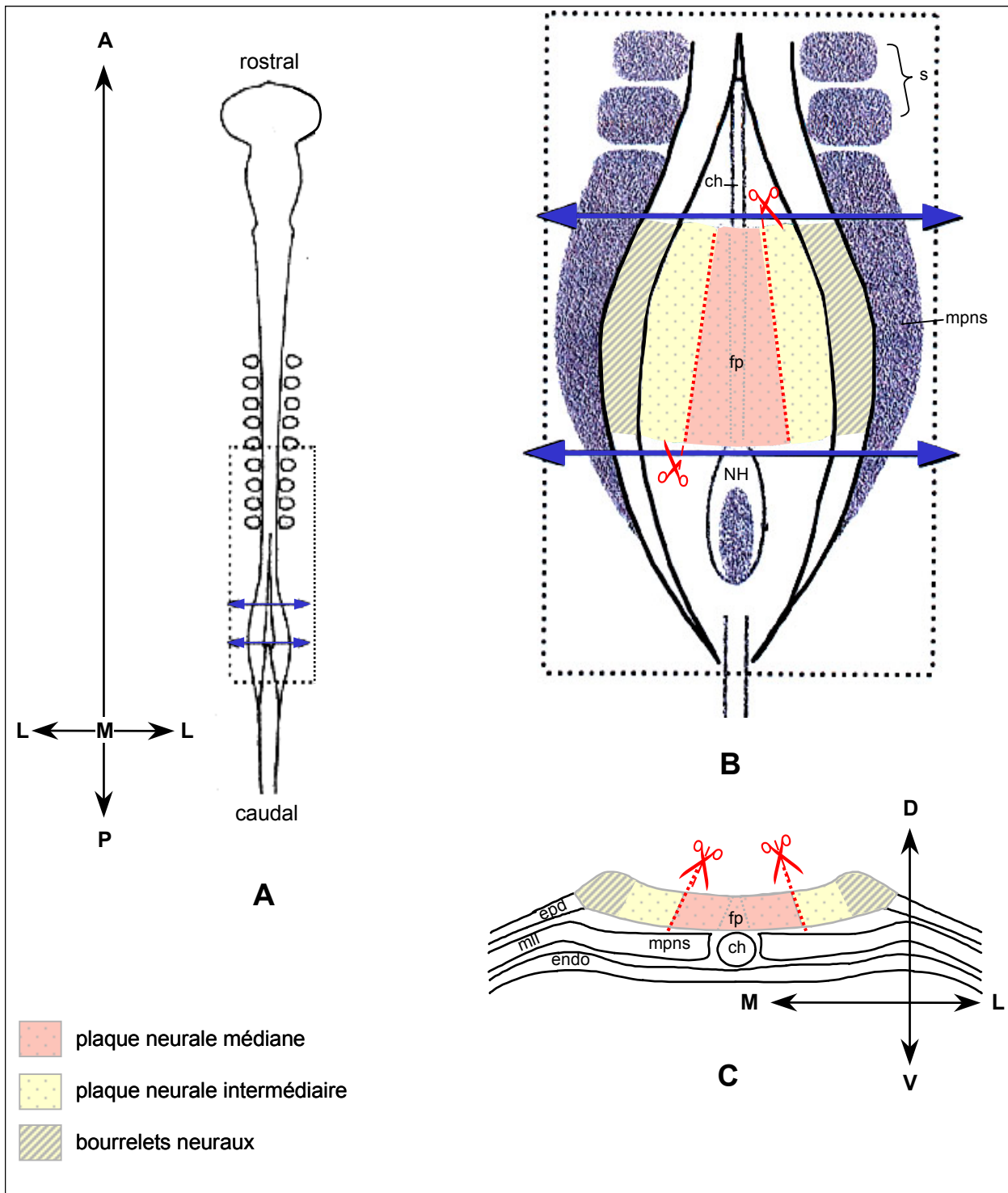


Figure 74 : Dissection de la partie médiane de la plaque neurale caudale chez un embryon de poulet de stade HH 10 (E1,5). Les axes rostro-caudal ou antéro-postérieur (A : antérieur ; P : postérieur), médo-latéral (M : médian ; L : latéral) et dorso-ventral (D : dorsal ; V : ventral) sont représentés par les doubles flèches noires. A) Vue dorsale schématique d'un embryon de poulet de stade HH 10. B) Agrandissement du cadre en A. La plaque neurale caudale s'étend du dernier somite individualisé au nœud de Hensen (régions jaunes et rosée situées entre les deux doubles flèches bleues). La zone prélevée est la partie médiane de la plaque neurale caudale, appelée plaque neurale médiane (région rosée), comprenant la *floor plate* au milieu (délimitée par les pointillés gris). Ce territoire correspond grossièrement au tiers médian de la largeur de la plaque neurale caudale selon l'axe médo-latéral, futur axe dorso-ventral. C) Vue en coupe transversale de la plaque neurale caudale et des tissus environnants. NH : nœud de Hensen ; ch : corde ; fp : *floor plate* ; s : somites ; mpns : mésoderme paraxial non segmenté ; mll : mésoderme des lames latérales ; epd : épiderme ; endo : endoderme.

postérieure de l'ouverture de la *roof plate* avec des Pachefs. Le tube neural est alors épinglé, face externe au dessus, et débarrassé du mésenchyme adhérent et des racines ventrales des neurones ventraux. Dans cette configuration, la partie ventrale du tube neural, de part et d'autre de la *floor plate*, et les deux demi parties dorsales qui flanquent la partie ventrale latéralement peuvent être aisément distinguées. La limite entre les régions ventrale et dorsale ainsi différenciées est appelée le *sulcus limitans*. Les 2 régions dorsales du tube neural sont ensuite découpées sur toute sa longueur (selon l'axe antéro-postérieur), le long du *sulcus limitans* avec un micro-scalpel et écartées. De la même façon, chaque moitié de tube neural ventral est découpée le long de la *floor plate* qui est grossièrement éliminée. Chacun des 2 territoires ainsi isolés est divisé transversalement en 30 à 40 explants, aussitôt placés en culture.

3. Neuroépithélium ventral

Le neuroépithélium ventral du tube neural cervico-brachial est prélevé chez des embryons de E4,5-5 et E6 (stades HH 25-26 et 29, respectivement), selon une méthode mise au point au laboratoire (Soula *et al.*, 2001). Le tube neural est dégagé des tissus environnants comme ci-dessus, sectionné en arrière du rhombencéphale et au niveau des bourgeons de membres antérieurs, puis inclus dans un gel d'agarose (Sigma) à 3% dans du PBS 1X, liquide à 37°C. Des coupes transversales de 80 à 100 µm d'épaisseur sont réalisées dans le bloc d'agarose (solide à température ambiante) au moyen d'un vibratome (EMS, Microm ou Leica) dont la cuve réfrigérée contient du PBS 1X. Les coupes sont conservées dans du milieu de culture, à 4°C, jusqu'à la dissection du neuroépithélium. Sur ces coupes, les différentes structures du tube neural (neuroépithélium, *floor plate* et zone du manteau) sont identifiables grâce à leur réfringence différentielle sous une loupe binoculaire. La limite entre les régions ventrale et dorsale du tube neural est définie morphologiquement par la position du *sulcus limitans* et par le fait que le neuroépithélium dorsal est plus large que le ventral, à ces stades. Les coupes sont ensuite débarrassées de l'agarose entourant le tube neural. Un fragment de neuroépithélium ventral est prélevé sur chaque section après 2 incisions perpendiculaires à l'axe dorso-ventral, l'une réalisée ventralement au *sulcus limitans* et l'autre dorsalement à la *floor plate*, et une incision parallèle à cet axe, faite dans le neuroépithélium afin d'éviter d'emporter du tissu de la zone du manteau. Ces opérations sont réalisées au moyen d'aiguilles à insecte de 0,1 mm de diamètre. L'accès au neuroépithélium est facilité par la rupture de la *roof plate* lors du prélèvement du tube neural. Les explants de neuroépithélium ventral ainsi obtenus sont placés dans du milieu de culture, à 4°C, jusqu'à la fin de la dissection.

IV. Cultures cellulaires

Les cultures cellulaires sont réalisées dans des flacons (Nunc) et maintenues à 37°C, en atmosphère humide et en présence de 5% de CO₂.

1. Lignée Q2bn

Des fibroblastes de caille de la lignée Q2bn produisant la protéine BMP2 humaine (Q2bn-BMP2) ou non (Q2bn contrôles) nous ont été fournis par le Dr D. Duprez (UMR 7622 CNRS, Biologie du Développement, Paris). Ces cellules ont été transfectées de façon stable avec le vecteur rétroviral aviaire pCRNCM déficient pour la réplication (de la Pompa et Zeller, 1993) contenant la région codante de la protéine BMP2 humaine en orientation sens (Q2bn-BMP2) ou antisens (Q2bn contrôles) (Duprez *et al.*, 1996). La construction des vecteurs produisant BMP2 et contrôle et la procédure de transfection ont été décrits par D. Duprez et collègues (Duprez *et al.*, 1996). Ces auteurs ont montré, par immunocytochimie, que les cellules Q2bn-BMP2 synthétisent la protéine BMP2 humaine mais pas les Q2bn contrôles, et que cette protéine est biologiquement active sur les cellules de poulet (Duprez *et al.*, 1996).

Les cellules Q2bn sont cultivées en milieu DMEM/F12 jusqu'à confluence. Elles sont alors rincées avec du PBS 1X afin d'éliminer le sérum, décollées par un traitement à la trypsine-EDTA 1X (Gibco, BRL) d'environ 5 min. à 37°C. La suspension cellulaire estensemencées dans une boîte de Pétri bactériologique de 55 mm de diamètre (Poly Labo). La culture est maintenue de 24 à 48 h à 37°C. Dans ces conditions, les fibroblastes n'adhèrent pas au substrat et forment des agrégats cellulaires sphériques très cohésifs et de taille variable lesquels seront utilisés pour les cocultures avec le tissu neural et les greffes *in ovo*.

2. Lignée CHO

Des cellules d'ovaires de hamster chinois de la lignée CHO-B3 produisant la protéine Noggin de xénope nous ont été fournies par le Dr R. Harland (Lamb *et al.*, 1993). Elles sont déficientes pour la déhydrofolate réductase (dhfr^r) (J. Papkoff, Syntex Research) et transfectées de façon stable avec un vecteur d'expression contenant la région codante de la protéine Noggin de xénope (Lamb *et al.*, 1993).

Les cellules CHO sont cultivées en milieu α -MEM sans nucléosides jusqu'à confluence. La préparation des agrégats cellulaires pour les expériences de greffe *in ovo* est identique à celle décrite ci-dessus pour les cellules Q2bn. L'activité biologique de Noggin a été vérifiée selon Tonegawa *et al.* (1998).

3. Marquage des cellules au DiI

Pour certaines expériences de greffe *in ovo*, les cellules Q2bn et CHO ont été préalablement marquées au DiI, un colorant membranaire fluorescent ayant des caractéristiques spectrales similaires à celles de la rhodamine. Pour ce faire, les cellules attachées sont recouvertes d'un ml de milieu de culture (DMEM/F12, pour les Q2bn ; CHO-S-SFMII, pour les CHO) contenant 40 μ g/ml de CellTrackerTM CM-DiI (Molecular Probes, Eugene, Oregon USA) et incubées à 37°C pendant 15 min. Les cellules sont rincées 3 fois 5 min. avec du PBS 1X à 37°C avant d'être décollées à la trypsine etensemencées dans des boîtes de Pétri bactériologiques afin qu'elles forment des agrégats, comme précédemment décrit.

V. Cultures des tissus embryonnaires

Les explants de tissu neural sont cultivés sur des lamelles de plastique de 14 mm de diamètre recouvertes de gel de collagène, à raison d'un explant de plaque neurale médiane, 15 à 20 explants de tube neural ventral ou 6-7 explants de neuroépithélium ventral par puits de culture. Chaque explant de plaque neurale médiane est partagé en 2 ou 3 fragments, transversalement, de sorte que les explants obtenus présentent la même organisation cellulaire selon le futur axe dorso-ventral. Les expériences sont réalisées, au minimum, en double, c'est à dire que chaque condition de traitement est appliquée à 2 puits de culture, parfois à 3.

Les protéines sont ajoutées dans le milieu juste avant la mise en culture des explants ou 3 jours après, pour le traitement tardif des explants de plaque neurale médiane par la protéine BMP4. La protéine BMP4 recombinante humaine (Genetics Institute, Cambridge, MA, USA ou R&D Systems) est utilisée à la concentration finale de 0,15 ; 0,6 ; 0,9 ou 1,5 nM. Le fragment N-terminal de la protéine SHH recombinante humaine (Biogen, Cambridge, MA, USA) est employé à la concentration finale de 12 nM.

Pour les expériences en présence de cellules produisant BMP2, les agrégats de cellules Q2bn-BMP2 ou Q2bn-contrôles sont disposés autour et au contact de chaque explant, soit au moment de la mise en culture des explants (tube neural ventral), soit 3 jours plus tard (plaque neurale médiane).

VI. Manipulations des embryons in ovo à E3

1. Préparation des embryons

Les expériences sont réalisées dans l'œuf sur des embryons de E3 (stades HH 18 à 20), stade le plus tardif permettant d'obtenir un taux de survie acceptable après ce type de microchirurgie. Les œufs sont fenêtrés et de l'encre de Chine (Pelikan), diluée au 1/10^e dans une solution de sels de Tyrode, est injectée sous l'embryon, afin de pouvoir visualiser les tissus par contraste.

2. Greffe de cellules Q2bn et CHO-Noggin entre le tube neural ventral et les somites

L'ectoderme est incisé sur une longueur de 2 somites environ, entre le tube neural et les somites thoraco-lombaires, d'un côté, à l'aide d'un micro-scalpel. De 2 à 6 agrégats de cellules (préalablement marquées au DiI pour certaines expériences), préparés 24 à 48h avant l'opération, sont insérés dans l'incision et placés au contact de la partie ventrale du tube neural (Q2bn) ou de sa partie dorsale (CHO-Noggin) (figure 75).

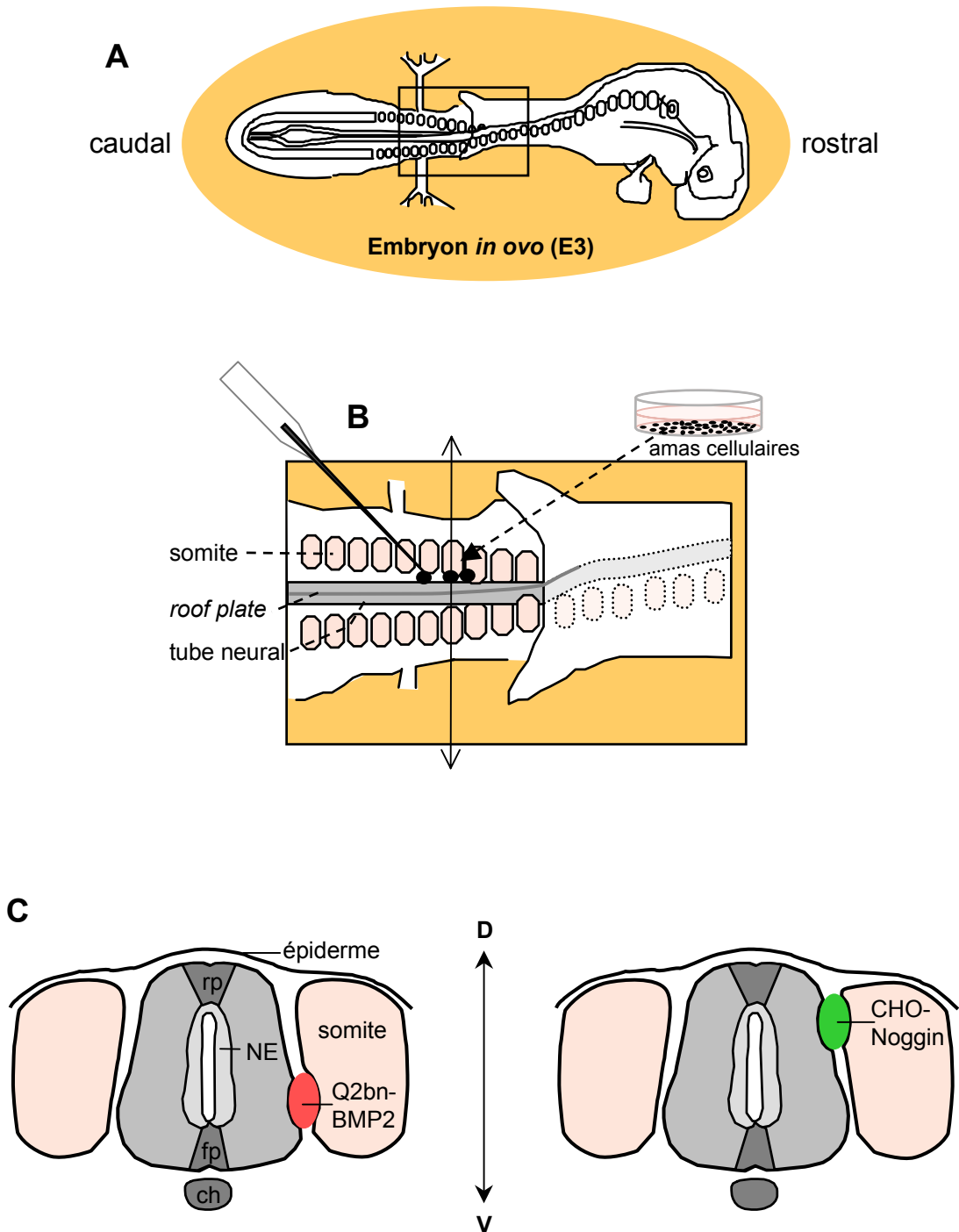


Figure 75 : Greffe d'agrégats cellulaires entre le tube neural thoraco-lombaire et les somites, *in ovo*, chez un embryon de poulet de stade HH 18-20 (E3). A) Vue dorsale schématique d'un embryon de poulet à E3 dans l'œuf. B) Agrandissement du cadre en A. Après incision de l'épiderme, des agrégats de cellules Q2bn ou CHO-Noggin sont introduits, en file indienne, entre le tube neural et les somites à l'aide d'une micro-aiguille. Les amas cellulaires sont placés au contact de la partie ventrale du tube neural ventral (cellules produisant BMP2) ou de sa partie dorsale (cellules sécrétant Noggin). C) Schéma d'une coupe transversale de l'embryon juste après l'opération, au niveau indiqué par la double flèche en B. L'axe dorso-ventral est représenté (D : dorsal ; V : ventral). L'agrégat de cellules Q2bn-BMP2 est au contact du tube neural ventral. Les cellules CHO-Noggin sont contre le tube neural dorsal. ch : chorde ; fp : *floor plate* ; NE : neuroépithélium ; rp : *roof plate*.

3. Ablation de la région dorsale du tube neural

Au maximum, le quart le plus dorsal de la hauteur totale du tube neural (selon l'axe dorso-ventral), recouvert par l'ectoderme, est retiré sur une longueur de 4 à 6 somites au niveau de la région lombaire (figure 76). L'opération est effectuée grâce à un Gastromaster (Xenotek Engineering) avec une électrode de 200 µm de largeur. Chez les embryons témoins, la *roof plate* est fendue sur une longue distance allant du niveau brachial au niveau lombaire, avec un micro-scalpel, de manière à induire une *spina bifida* sans excision de tissu.

Pour tous les types de microchirurgie, l'embryon manipulé est remis en incubation à 38°C, en atmosphère humide, dès la fin de l'opération, après avoir soigneusement refermé l'ouverture réalisée dans la coquille au moyen d'un film adhésif.

4. Prélèvement des tissus

Les embryons opérés sont récoltés entre E6 et E7,5 (stades HH 29 à 33), l'antigène O4 étant exprimé à partir de E6 dans le tube neural (Poncet *et al.*, 1996). La zone opérée est isolée de l'embryon après retrait de l'ectoderme qui la recouvre à l'aide de pinces fines. Chez les individus dont la partie dorsale du tube neural a été excisée ou fendue, le tube neural reste ouvert dorsalement au niveau de l'opération donnant lieu à une *spina bifida*, visible morphologiquement. Pour ces embryons, l'ectoderme adhérent au tube neural opéré n'est pas retiré pour éviter d'abîmer le tissu neural fragilisé. Dans la plupart des cas, le corps vertébral en formation entourant la portion de tube neural prélevée est conservé, ce qui permet de maintenir le greffon et/ou de consolider l'échantillon. Les échantillons sont fixés aussitôt après le prélèvement.

VI. Immunohistochimie

1. Anticorps et révélateurs utilisés

a. Anticorps primaires

- L'anticorps O4 est un anticorps monoclonal de souris dirigé contre des sulfatides présents à la surface des oligodendrocytes immatures et différenciés (Sommer et Schachner, 1981 ; Bansal *et al.*, 1989 ; Ono *et al.*, 1995). Il reconnaît également un antigène non caractérisé, dénommé « *prooligodendroblast antigen, POA* » et exprimé avant les sulfatides par les précurseurs oligodendrocytaires et les jeunes oligodendrocytes en différenciation (Bansal *et al.*, 1992). Le surnageant de culture de l'hybridome O4, fourni par le Dr R. Bansal, est utilisé pur.

- L'anticorps OL-1 est un anticorps monoclonal de rat qui lie aussi des sulfatides membranaires exprimés par les oligodendrocytes immatures et matures (Ghandour et Nussbaum, 1990). Il reconnaît des oligodendrocytes plus différenciés que l'anticorps O4 (Giess *et al.*, 1992). OL-1 nous a été fourni par le Dr S. Ghandour et est employé au 1/50.

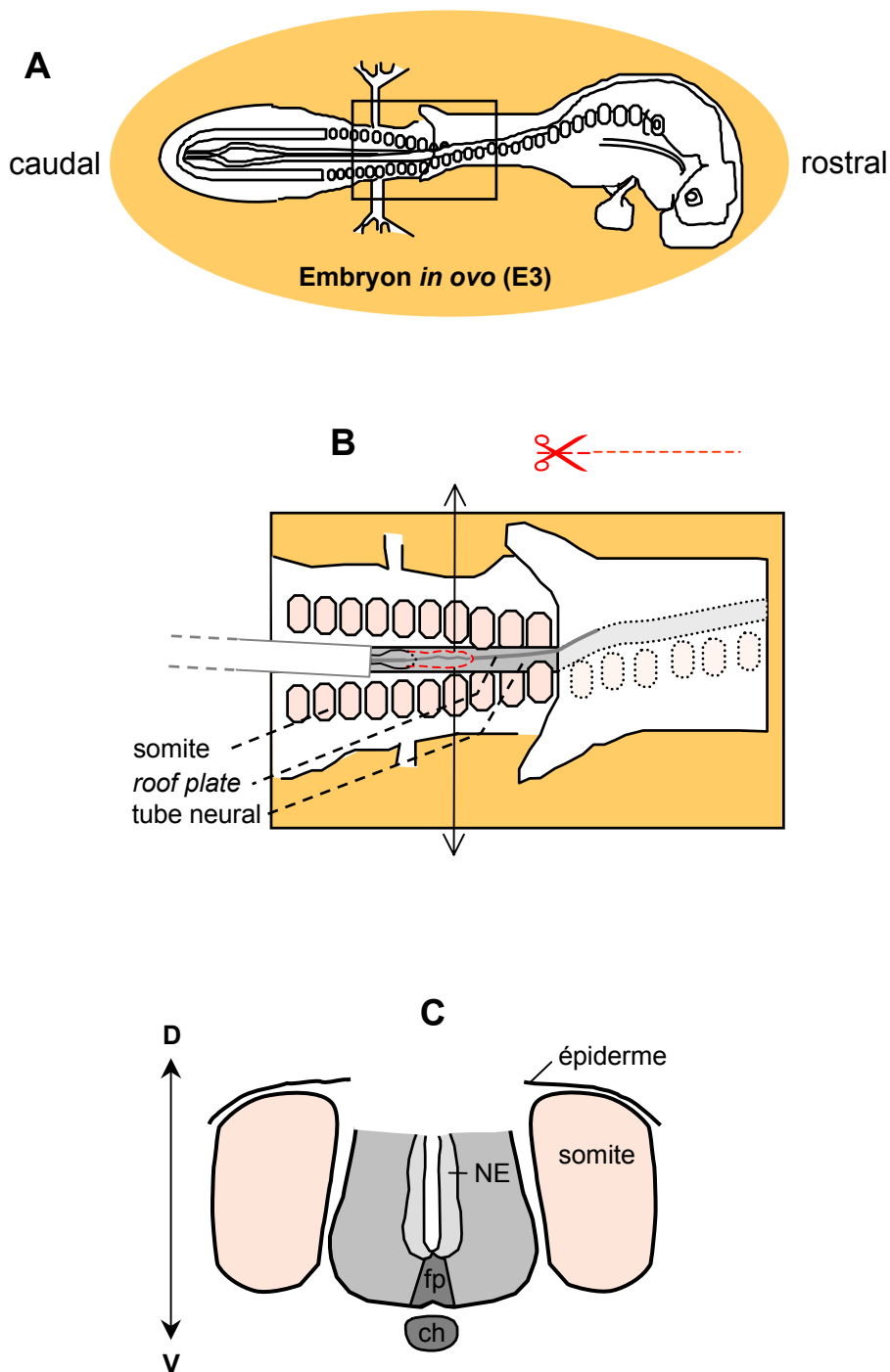


Figure 76 : Ablation de la partie dorsale du tube neural lombaire, *in ovo*, chez un embryon de poulet de stade HH 18-20 (E3). A) Vue dorsale schématique d'un embryon de poulet à E3 dans l'œuf. B) Agrandissement du cadre en A. La partie dorsale du tube neural et l'épiderme sus-jacent sont découpés sur une longueur de 4 à 6 somites à l'aide d'une anse de platine reliée à un courant électrique. C) Schéma d'une coupe transversale de l'embryon juste après l'opération, au niveau indiqué par la double flèche en B. Au maximum, le quart le plus dorsal de la hauteur totale du tube neural selon l'axe dorso-ventral (D : dorsal ; V : ventral) et l'épiderme qui le recouvre sont retirés. ch : corde ; fp : *floor plate* ; NE : neuroépithélium.

- L'anticorps AA3 est un anticorps monoclonal de rat dirigé contre l'isoforme DM20 de la protéine protéolipide PLP, exprimée à la surface des oligodendrocytes matures (Yamamura *et al.*, 1991). Cet anticorps, fourni par le Dr B. Zalc, est utilisé au 1/10.
- L'antisérum de lapin K2 reconnaît le facteur de transcription HNF-3 β exprimé par les cellules de la *floor plate* (Ruiz i Altaba *et al.*, 1993). Il nous a été fourni par le Dr Ruiz i Altaba et est utilisé au 1/1000.
- L'anticorps monoclonal de souris dirigé contre le facteur de transcription Islet-1 (39-4D5), reconnaît spécifiquement les motoneurons dans l'ébauche du tube neural ventral (Ericson *et al.*, 1992). Le surnageant de culture (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA) est utilisé au 1/5.
- L'antisérum de lapin dirigé contre la ChAT (Chemicon International, Inc) marque spécifiquement le cytoplasme des motoneurons dans la moelle épinière (Yamada *et al.*, 1993). Il est utilisé au 1/500.
- L'antisérum de lapin anti-GLAST (Shibata *et al.*, 1997), dirigé contre le transporteur du glutamate et de l'aspartate, reconnaît les cellules de la glie radiale, des précurseurs astrocytaires et des astrocytes. Cet anticorps, fourni par le Dr M. Watanabe, est utilisé au 1/500.
- L'antisérum de lapin dirigé contre la GFAP (DAKO A/S, Danemark) marque les filaments intermédiaires des astrocytes. Il est utilisé au 1/100.
- L'anticorps QCPN est un anticorps monoclonal de souris qui reconnaît la membrane périmoléculaire des cellules de caille (Selleck et Bronner-Fraser, 1995). Le surnageant de culture (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA) est utilisé pur.
- L'anticorps 5E1 est un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la protéine SHH (Ericson *et al.*, 1996), exprimée par les cellules de la *floor plate* et la corde sous-jacente. Cet anticorps (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA) est utilisé au 1/5.
- L'anticorps monoclonal de souris dirigé contre le facteur de transcription Nkx2.2 (74.5A5 ; Ericson *et al.*, 1997) reconnaît les cellules neuroépithéliales les plus ventrales du tube neural. Le surnageant de culture (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA) est utilisé pur.
- L'anticorps monoclonal de souris dirigé contre le facteur de transcription Pax6 (Ericson *et al.*, 1997) marque un domaine du neuroépithélium dorsal au domaine exprimant la protéine Nkx2.2. Le surnageant de culture (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA) est utilisé pur.
- L'antisérum de lapin dirigé contre le facteur de transcription Olig2 (Takebayashi *et al.*, 2000) identifie un petit domaine du neuroépithélium ventral. Cet anticorps nous a été fourni par le Dr H. Takebayashi et est utilisé au 1/2000.

b. Anticorps secondaires et conjugats de streptavidine

- Les immunoglobulines (Ig) dirigées contre les Ig de souris sont produites chez le mouton et biotinylées (Amersham). Elles sont utilisées au 1/50.

- Les Ig de mouton anti- Ig de rat sont également couplées à la biotine (Amersham) et employées à la dilution 1/50.

- Les Ig de chèvre dirigées contre les Ig de rat sont directement liées au fluorochrome isothiocyanate de fluorescéine (GARa/FITC, Nordic Immunology, Tilburg, Pays-Bas) et utilisées au 1/50.

- Les Ig dirigées contre les Ig de lapin sont biotinylées (Amersham) et diluées au 1/50 avant leur utilisation.

- Les Ig de chèvre dirigées contre les Ig de souris sont couplées au fluorochrome Alexa Fluor® 546 (Molecular Probes, Inc), qui a des propriétés spectrales similaires à celles de la rhodamine, et employées à la dilution 1/500.

- Les anticorps secondaires biotinylés sont révélés par de la streptavidine conjuguée à un fluorochrome, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, Amersham) ou l'isothiocyanate de tétraméthyl rhodamine (TRITC, Immunotech). Ces conjugats sont utilisés à la dilution de 1/50.

2. Préparation des tissus

a. Cultures

Les explants sont fixés après un temps de culture approprié à la nature de l'antigène que l'on veut détecter. Le milieu de culture est remplacé par une solution de formaldéhyde (Prolabo) à 3,7% dans du PBS. La fixation se fait à température ambiante pendant 30 min. Concernant la détection du facteur de transcription Islet-1, les cultures sont préfixées pendant 2 min. avec une solution de paraformaldéhyde (Fluka) à 2% dans du PBS 1X, puis fixées pendant 15 min. dans une solution de paraformaldéhyde à 4% dans du PBS 1X. Ces étapes se déroulent à 4°C. Les lamelles de plastique supportant les cultures sont alors rincées dans plusieurs bains de PBS 1X.

b. Echantillons de tube neural

Les tronçons de tube neural sont fixés par une solution de formaldéhyde (Prolabo) à 3,7% dans du PBS 1X ou de paraformaldéhyde (Fluka) à 4% dans du PBS 1X, pendant 4h à température ambiante ou une nuit à 4°C, puis rincés plusieurs fois en PBS 1X pendant 2h au minimum. Les échantillons sont inclus dans un gel d'agarose (Sigma) à 2,5%-4% dans du PBS 1X, liquide à 37°C et se solidifiant en refroidissant. Des coupes transversales de 60 à 100 µm d'épaisseur sont réalisées dans le bloc d'agarose au moyen d'un vibratome (EMS, Microm ou Leica) dont la cuve contient du PBS 1X. Les coupes récoltées une à une sont conservées dans du PBS 1X à 4°C pendant le fractionnement du tronçon de moelle épinière, puis l'agarose entourant les tissus est éliminé. Les coupes sont alors déposées dans de petites fioles de verre contenant du PBS 1X ou

collées sur des lames histologiques préalablement recouvertes de 15 à 20 μ l de protéine adhésive de *Mytilus edulis* (Cell-Tak, Sigma-Aldrich, Inc). Ces dernières sont placées dans des boîtes de Pétri contenant du PBS 1X.

3. Procédure d'immunodétection

L'immunodétection est réalisée sur les lamelles de plastique supportant les cultures de tissu neural, dans des petits tubes de verre pour les coupes flottantes de tube neural et sur les lames de verre pour les coupes collées à l'aide de Cell-Tak. Après fixation et rinçages, les tissus sont incubés en présence de BSA à 1% dans du PBS 1X pendant 30 min. pour les cultures ou 1h pour les coupes, afin de saturer les sites de liaison non spécifiques. Pour la détection de certains antigènes, cette étape a lieu dans du lait à 1% dans du PBS 1X pendant 5 min. Afin d'accéder aux antigènes intracellulaires, les tissus sont perméabilisés grâce à du Triton X-100 à 0,1%-0,5% dans du PBS 1X ou du lait à 1% dans du PBS 1X, pendant 10 ou 15 min. La perméabilisation des tissus se fait avant l'étape de blocage des sites non spécifiques pour la détection de certains de ces antigènes intracellulaires. Les tissus sont ensuite mis en présence de l'anticorps primaire, à la dilution appropriée, pendant 30 min. pour les cultures ou 1h pour les coupes à température ambiante ou la nuit à 4°C. Après plusieurs rinçages en PBS 1X (ou en PBS 1X contenant du lait à 1%), les échantillons sont incubés avec les anticorps secondaires adéquats, couplés à la biotine ou directement à un fluorochrome, pendant 30 min. à température ambiante. Les tissus sont alors rincés dans du PBS 1X (ou du PBS 1X contenant 1% de lait), puis les anticorps secondaires biotinylés sont révélés par une incubation de 15 min., à température ambiante, avec de la streptavidine couplée à un fluorochrome, suivie de rinçages en PBS 1X. Ces immunodétections à plusieurs étapes (ou indirectes) permettent l'amplification du signal.

Pour les doubles immunodétections, la procédure est réalisée entièrement pour le premier antigène puis répétée pour le second, en commençant par la détection de l'antigène membranaire, le cas échéant. Le premier anticorps primaire est révélé grâce à la combinaison anticorps secondaire biotinylé/streptavidine liée au FITC (vert) et le second, *via* le système anticorps secondaire biotinylé/streptavidine-TRITC (rouge). Lors de l'application séquentielle de deux anticorps primaires de la même espèce (ici, monoclonaux de souris O4 et QCPN, Pax6 ou Nkx2.2), le même anticorps secondaire est utilisé et révélé par deux fluorochromes distincts. Il en résulte un croisement des colorations (le premier antigène, marqué par le FITC (O4), apparaît jaune-vert à cause de la contre-coloration par le TRITC), non gênant pour l'interprétation des résultats dans la mesure où cette procédure a été utilisée pour la mise en évidence de deux antigènes de localisation cellulaire différente (O4 et QCPN, Pax6 ou Nkx2.2). Dans le cas de la détection de 2 antigènes nucléaires, les anticorps primaires employés sont d'origine différente. Ils sont donc révélés par des anticorps secondaires différents. Concernant la détection séquentielle des facteurs de transcription HNF3- β et Islet-1, ils sont tous deux biotinylés, limitant les occasions de croisement à l'étape de liaison de la streptavidine-TRITC susceptible de déplacer la streptavidine-FITC. Pour celle des

protéines Olig2 et Nkx2.2, le premier anticorps secondaire est biotinylé et révélé par la streptavidine-FITC, et le second, directement couplé au fluorochrome, éliminant les possibilités de croisement. Les tissus ainsi traités sont rincés avec de l'eau osmosée afin d'éliminer les sels, puis montés entre lame et lamelle à l'aide de Mowiol® 4-88 (Calbiochem).

4. Observations

Les coupes et les cultures sont analysées en microscopie à fluorescence classique et confocale. Les images présentées dans ce travail ont été acquises en microscopie confocale et proviennent, soit d'une seule coupe optique, soit de la projection maximale de plusieurs coupes optiques réalisées dans l'épaisseur de l'échantillon. Pour les doubles marquages, l'image acquise dans le canal de lecture "fluorescéine", codée en fausse couleur verte, est superposée à l'image acquise dans le canal "rhodamine", elle-même codée en fausse couleur rouge. Dans les cultures, les astrocytes et les oligodendrocytes sont comptés directement en microscopie de fluorescence classique. Au delà de 1000 cellules immunoréactives, leur nombre est estimé. Les comptages de noyaux marqués par les différents facteurs de transcription sont effectués, à l'écran, sur des coupes optiques horizontales réalisées tous les 2 µm en mode confocal. Les résultats sont exprimés sous la forme du nombre moyen de cellules marquées par culture ou par explant. La signification statistique des résultats est définie par le test t de Student.

VII. Hybridation in situ

L'expression des transcrits *Pax-3* dans les cultures d'explants de plaque neurale médiane a été analysée avec une sonde ARN antisens qui nous a été fournie par le Dr F. Pituello (Pituello *et al.*, 1995). Après 2 jours *in vitro*, les cultures sont fixées en paraformaldéhyde à 4% dans du PBS 1X pendant 1h, à 4°C. L'hybridation *in situ* a été réalisée selon la procédure de Wilkinson (1992). La sonde hybridée est identifiée à l'aide d'un anticorps anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim). L'activité phosphatase alcaline est révélée grâce à une solution contenant du NBT et du BCIP (réactifs Boehringer Mannheim), substrats chromogènes de l'enzyme, à température ambiante et visualisée par un précipité bleu. Les cultures sont ensuite montées entre lame et lamelle à l'aide de Mowiol® 4-88 (Calbiochem).

BIBLIOGRAPHIE

- Agius, E., Soukkaie, C., Danesin, C., Kan, P., Takebayashi, H., Soula, C. and Cochard, P.** (2004). Converse control of oligodendrocyte and astrocyte lineage development by Sonic hedgehog in the chick spinal cord. *Dev Biol* **270**, 308-21.
- Alberta, J. A., Park, S. K., Mora, J., Yuk, D., Pawlitzky, I., Iannarelli, P., Vartanian, T., Stiles, C. D. and Rowitch, D. H.** (2001). Sonic hedgehog is required during an early phase of oligodendrocyte development in mammalian brain. *Mol Cell Neurosci* **18**, 434-41.
- Altmann, C. R. and Brivanlou, A. H.** (2001). Neural patterning in the vertebrate embryo. *Int Rev Cytol* **203**, 447-82.
- Andrae, J., Hansson, I., Afink, G. B. and Nister, M.** (2001). Platelet-derived growth factor receptor-alpha in ventricular zone cells and in developing neurons. *Mol Cell Neurosci* **17**, 1001-13.
- Arkell, R. and Beddington, R. S.** (1997). BMP-7 influences pattern and growth of the developing hindbrain of mouse embryos. *Development* **124**, 1-12.
- Attisano, L., Silvestri, C., Izzi, L. and Labbe, E.** (2001). The transcriptional role of Smads and FAST (FoxH1) in TGFbeta and activin signalling. *Mol Cell Endocrinol* **180**, 3-11.
- Attisano, L. and Tuen Lee-Hoeflich, S.** (2001). The Smads. *Genome Biol* **2**, reviews 3010.1-8.
- Attisano, L. and Wrana, J. L.** (1996). Signal transduction by members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* **7**, 327-39.
- Attisano, L. and Wrana, J. L.** (2000). Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 235-43.
- Bainter, J. J., Boos, A. and Kroll, K. L.** (2001). Neural induction takes a transcriptional twist. *Dev Dyn* **222**, 315-27.
- Balemans, W. and Van Hul, W.** (2002). Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol* **250**, 231-50.
- Bansal, R., Kumar, M., Murray, K., Morrison, R. S. and Pfeiffer, S. E.** (1996). Regulation of FGF receptors in the oligodendrocyte lineage. *Mol Cell Neurosci* **7**, 263-75.
- Bansal, R., Stefansson, K. and Pfeiffer, S. E.** (1992). Proligodendroblast antigen (POA), a developmental antigen expressed by A007/O4-positive oligodendrocyte progenitors prior to the appearance of sulfatide and galactocerebroside. *J Neurochem* **58**, 2221-9.
- Bansal, R., Warrington, A. E., Gard, A. L., Ranscht, B. and Pfeiffer, S. E.** (1989). Multiple and novel specificities of monoclonal antibodies O1, O4, and R- mAb used in the analysis of oligodendrocyte development. *J Neurosci Res* **24**, 548-57.
- Basler, K., Edlund, T., Jessell, T. M. and Yamada, T.** (1993). Control of cell pattern in the neural tube: regulation of cell differentiation by dorsalin-1, a novel TGF beta family member. *Cell* **73**, 687-702.
- Baumann, N. and Pham-Dinh, D.** (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* **81**, 871-927.
- Beddington, R. S.** (1994). Induction of a second neural axis by the mouse node. *Development* **120**, 613-20.
- Botchkarev, V. A.** (2003). Bone morphogenetic proteins and their antagonists in skin and hair follicle biology. *J Invest Dermatol* **120**, 36-47.
- Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, T. M. and Struhl, G.** (2001). A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell* **7**, 1279-91.

- Briscoe, J. and Ericson, J.** (1999). The specification of neuronal identity by graded Sonic Hedgehog signalling. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 353-62.
- Briscoe, J. and Ericson, J.** (2001). Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 43-9.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M. and Ericson, J.** (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **101**, 435-45.
- Briscoe, J., Sussel, L., Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T. M., Rubenstein, J. L. and Ericson, J.** (1999). Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* **398**, 622-7.
- Bronner-Fraser, M. and Fraser, S. E.** (1997). Differentiation of the vertebrate neural tube. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 885-91.
- Calver, A. R., Hall, A. C., Yu, W. P., Walsh, F. S., Heath, J. K., Betsholtz, C. and Richardson, W. D.** (1998). Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron* **20**, 869-82.
- Cameron-Curry, P. and Le Douarin, N. M.** (1995). Oligodendrocyte precursors originate from both the dorsal and the ventral parts of the spinal cord. *Neuron* **15**, 1299-310.
- Campbell, K.** (2003). Dorsal-ventral patterning in the mammalian telencephalon. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 50-6.
- Caspary, T. and Anderson, K. V.** (2003). Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nat Rev Neurosci* **4**, 289-97.
- Catala, M.** (1999). From conception to the child. *Childs Nerv Syst* **15**, 613-9.
- Catala, M., Teillet, M. A., De Robertis, E. M. and Le Douarin, M. L.** (1996). A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. *Development* **122**, 2599-610.
- Chandran, S., Kato, H., Gerreli, D., Compston, A., Svendsen, C. N. and Allen, N. D.** (2003). FGF-dependent generation of oligodendrocytes by a hedgehog-independent pathway. *Development* **130**, 6599-609.
- Chandran, S., Svendsen, C., Compston, A. and Scolding, N.** (1998). Regional potential for oligodendrocyte generation in the rodent embryonic spinal cord following exposure to EGF and FGF-2. *Glia* **24**, 382-9.
- Charrier, J. B., Lapointe, F., Le Douarin, N. M. and Teillet, M. A.** (2002). Dual origin of the floor plate in the avian embryo. *Development* **129**, 4785-96.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H. and Beachy, P. A.** (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-13.
- Colas, J. F. and Schoenwolf, G. C.** (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn* **221**, 117-45.
- Dale, L. and Jones, C. M.** (1999). BMP signalling in early *Xenopus* development. *Bioessays* **21**, 751-60.
- Davies, J. E. and Miller, R. H.** (2001). Local sonic hedgehog signaling regulates oligodendrocyte precursor appearance in multiple ventricular zone domains in the chick metencephalon. *Dev Biol* **233**, 513-25.

- de la Pompa, J. L. and Zeller, R.** (1993). Ectopic expression of genes during chicken limb pattern formation using replication defective retroviral vectors. *Mech Dev* **43**, 187-98.
- Deng, W. and Poretz, R. D.** (2003). Oligodendroglia in developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology* **24**, 161-78.
- Derynck, R. and Feng, X. H.** (1997). TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta* **1333**, F105-50.
- Derynck, R., Zhang, Y. and Feng, X. H.** (1998). Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* **95**, 737-40.
- Derynck, R. and Zhang, Y. E.** (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577-84.
- Dickinson, M. E., Selleck, M. A., McMahon, A. P. and Bronner-Fraser, M.** (1995). Dorsalization of the neural tube by the non-neural ectoderm. *Development* **121**, 2099-106.
- Ding, Q., Motoyama, J., Gasca, S., Mo, R., Sasaki, H., Rossant, J. and Hui, C. C.** (1998). Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice. *Development* **125**, 2533-43.
- Dubois-Dalcq, M. and Murray, K.** (2000). Why are growth factors important in oligodendrocyte physiology? *Pathol Biol (Paris)* **48**, 80-6.
- Ducy, P. and Karsenty, G.** (2000). The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* **57**, 2207-14.
- Dudley, A. T. and Robertson, E. J.** (1997). Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos. *Dev Dyn* **208**, 349-62.
- Duprez, D. M., Kostakopoulou, K., Francis-West, P. H., Tickle, C. and Brickell, P. M.** (1996). Activation of Fgf-4 and HoxD gene expression by BMP-2 expressing cells in the developing chick limb. *Development* **122**, 1821-8.
- Edlund, T. and Jessell, T. M.** (1999). Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* **96**, 211-24.
- Eggenchwiler, J. T. and Anderson, K. V.** (2000). Dorsal and lateral fates in the mouse neural tube require the cell-autonomous activity of the open brain gene. *Dev Biol* **227**, 648-60.
- Eggenchwiler, J. T., Espinoza, E. and Anderson, K. V.** (2001). Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway. *Nature* **412**, 194-8.
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H. and Jessell, T. M.** (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* **87**, 661-73.
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T. M. and Briscoe, J.** (1997). Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* **90**, 169-80.
- Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessell, T. M. and Yamada, T.** (1992). Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene Islet-1. *Science* **256**, 1555-60.
- Fruttiger, M., Karlsson, L., Hall, A. C., Abramsson, A., Calver, A. R., Bostrom, H., Willetts, K., Bertold, C. H., Heath, J. K., Betsholtz, C. et al.** (1999). Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development* **126**, 457-67.

- Fu, H., Qi, Y., Tan, M., Cai, J., Takebayashi, H., Nakafuku, M., Richardson, W. and Qiu, M.** (2002). Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation. *Development* **129**, 681-93.
- Fukuda, S., Kondo, T., Takebayashi, H. and Taga, T.** (2004). Negative regulatory effect of an oligodendrocytic bHLH factor OLIG2 on the astrocytic differentiation pathway. *Cell Death Differ* **11**, 196-202.
- Gabay, L., Lowell, S., Rubin, L. L. and Anderson, D. J.** (2003). **Deregulation of Dorsoventral Patterning by FGF Confers Trilineage Differentiation Capacity on CNS Stem Cells In Vitro.** *Neuron* **40**, 485-499.
- Ghandour, M. S. and Nussbaum, J. L.** (1990). Oligodendrocyte cell surface recognized by a novel monoclonal antibody specific to sulfatide. *Neuroreport* **1**, 13-6.
- Giess, M. C., Soula, C., Duprat, A. M. and Cochard, P.** (1992). Cells from the early chick optic nerve generate neurons but not oligodendrocytes in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* **70**, 163-71.
- Gomes, W. A., Mehler, M. F. and Kessler, J. A.** (2003). Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment. *Dev Biol* **255**, 164-77.
- Goodrich, L. V. and Scott, M. P.** (1998). Hedgehog and patched in neural development and disease. *Neuron* **21**, 1243-57.
- Goulding, M., Lanuza, G., Sapir, T. and Narayan, S.** (2002). The formation of sensorimotor circuits. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 508-15.
- Gowan, K., Helms, A. W., Hunsaker, T. L., Collisson, T., Ebert, P. J., Odom, R. and Johnson, J. E.** (2001). Crossinhibitory activities of Ngn1 and Math1 allow specification of distinct dorsal interneurons. *Neuron* **31**, 219-32.
- Gregori, N., Proschel, C., Noble, M. and Mayer-Proschel, M.** (2002). The tripotential glial-restricted precursor (GRP) cell and glial development in the spinal cord: generation of bipotential oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells and dorsal-ventral differences in GRP cell function. *J Neurosci* **22**, 248-56.
- Grinspan, J. B., Edell, E., Carpio, D. F., Beesley, J. S., Lavy, L., Pleasure, D. and Golden, J. A.** (2000). Stage-specific effects of bone morphogenetic proteins on the oligodendrocyte lineage. *J Neurobiol* **43**, 1-17.
- Gritli-Linde, A., Lewis, P., McMahon, A. P. and Linde, A.** (2001). The whereabouts of a morphogen: direct evidence for short- and graded long-range activity of hedgehog signaling peptides. *Dev Biol* **236**, 364-86.
- Gross, M. K., Dottori, M. and Goulding, M.** (2002). Lbx1 specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord. *Neuron* **34**, 535-49.
- Gross, R. E., Mehler, M. F., Mabie, P. C., Zang, Z., Santschi, L. and Kessler, J. A.** (1996). Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* **17**, 595-606.
- Gunther, T., Struwe, M., Aguzzi, A. and Schughart, K.** (1994). Open brain, a new mouse mutant with severe neural tube defects, shows altered gene expression patterns in the developing spinal cord. *Development* **120**, 3119-30.
- Hajihosseini, M., Tham, T. N. and Dubois-Dalcq, M.** (1996). Origin of oligodendrocytes within the human spinal cord. *J Neurosci* **16**, 7981-94.

- Hall, A., Giese, N. A. and Richardson, W. D.** (1996). Spinal cord oligodendrocytes develop from ventrally derived progenitor cells that express PDGF alpha-receptors. *Development* **122**, 4085-94.
- Hamburger, V. and Hamilton, H. L.** (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951 [classical article] [see comments]. *Dev Dyn* **195**, 231-72.
- Heldin, C. H., Miyazono, K. and ten Dijke, P.** (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465-71.
- Helms, A. W. and Johnson, J. E.** (2003). Specification of dorsal spinal cord interneurons. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 42-9.
- Herrera, J., Yang, H., Zhang, S. C., Proschel, C., Tresco, P., Duncan, I. D., Luskin, M. and Mayer-Proschel, M.** (2001). Embryonic-derived glial-restricted precursor cells (GRP cells) can differentiate into astrocytes and oligodendrocytes in vivo. *Exp Neurol* **171**, 11-21.
- Ho, K. S. and Scott, M. P.** (2002). Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 57-63.
- Hogan, B. L.** (1996). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* **10**, 1580-94.
- Hollyday, M. and Hamburger, V.** (1977). An autoradiographic study of the formation of the lateral motor column in the chick embryo. *Brain Res* **132**, 197-208.
- Honoré, E. et Hemmati-Brivanlou, A.** (1997). L'induction neurale chez les vertébrés : le cerveau par défaut. *mls* **13**, 192-200.
- Hui, C. C., Slusarski, D., Platt, K. A., Holmgren, R. and Joyner, A. L.** (1994). Expression of three mouse homologs of the Drosophila segment polarity gene cubitus interruptus, Gli, Gli-2, and Gli-3, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development. *Dev Biol* **162**, 402-13.
- Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M. J. and Ten Dijke, P.** (2000). Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* **267**, 6954-67.
- Jessell, T. M.** (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* **1**, 20-9.
- Kasarskis, A., Manova, K. and Anderson, K. V.** (1998). A phenotype-based screen for embryonic lethal mutations in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7485-90.
- Kawabata, M., Imamura, T. and Miyazono, K.** (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* **9**, 49-61.
- Kessarlis, N., Pringle, N. and Richardson, W. D.** (2001). Ventral neurogenesis and the neuronal-glial switch. *Neuron* **31**, 677-80.
- Kingsley, D. M.** (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* **8**, 133-46.
- Lamb, T. M., Knecht, A. K., Smith, W. C., Stachel, S. E., Economides, A. N., Stahl, N., Yancopoulos, G. D. and Harland, R. M.** (1993). Neural induction by the secreted polypeptide noggin [see comments]. *Science* **262**, 713-8.
- Le Douarin, N. M., Teillet, M. A. and Catala, M.** (1998). Neurulation in amniote vertebrates: a novel view deduced from the use of quail-chick chimeras. *Int J Dev Biol* **42**, 909-16.
- Lee, J. C., Mayer-Proschel, M. and Rao, M. S.** (2000a). Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* **30**, 105-21.

- Lee, K. J., Dietrich, P. and Jessell, T. M.** (2000b). Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification. *Nature* **403**, 734-40.
- Lee, K. J. and Jessell, T. M.** (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **22**, 261-94.
- Lee, K. J., Mendelsohn, M. and Jessell, T. M.** (1998). Neuronal patterning by BMPs: a requirement for GDF7 in the generation of a discrete class of commissural interneurons in the mouse spinal cord. *Genes Dev* **12**, 3394-407.
- Lee, S. K. and Pfaff, S. L.** (2001). Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat Neurosci* **4 Suppl**, 1183-91.
- Liem, K. F., Jessell, T. M. and Briscoe, J.** (2000). Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. *Development* **127**, 4855-4866.
- Liem, K. F., Jr., Tremml, G. and Jessell, T. M.** (1997). A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* **91**, 127-38.
- Liem, K. F., Jr., Tremml, G., Roelink, H. and Jessell, T. M.** (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* **82**, 969-79.
- Litingtung, Y. and Chiang, C.** (2000a). Control of Shh activity and signaling in the neural tube. *Dev Dyn* **219**, 143-54.
- Litingtung, Y. and Chiang, C.** (2000b). Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nat Neurosci* **3**, 979-85.
- Liu, F., Massague, J. and Ruiz i Altaba, A.** (1998). Carboxy-terminally truncated Gli3 proteins associate with Smads [letter]. *Nat Genet* **20**, 325-6.
- Liu, J. P., Laufer, E. and Jessell, T. M.** (2001). Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. *Neuron* **32**, 997-1012.
- Lu, Q. R., Sun, T., Zhu, Z., Ma, N., Garcia, M., Stiles, C. D. and Rowitch, D. H.** (2002). Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* **109**, 75-86.
- Lu, Q. R., Yuk, D., Alberta, J. A., Zhu, Z., Pawlitzky, I., Chan, J., McMahon, A. P., Stiles, C. D. and Rowitch, D. H.** (2000). Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* **25**, 317-29.
- Lubetzki, C., Demerens, C. et Zalc, B.** (1997). Signaux axonaux et myélinogénèse dans le système nerveux central. *ms* **13**, 1097-105.
- Lumsden, A.** (1995). Neural development. A 'LIM code' for motor neurons? *Curr Biol* **5**, 491-5.
- Lumsden, A. and Krumlauf, R.** (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274**, 1109-15.
- Lutz, M. and Knaus, P.** (2002). Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal* **14**, 977-88.
- Mabie, P. C., Mehler, M. F. and Kessler, J. A.** (1999). Multiple roles of bone morphogenetic protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype. *J Neurosci* **19**, 7077-88.
- Mabie, P. C., Mehler, M. F., Marmur, R., Papavasiliou, A., Song, Q. and Kessler, J. A.** (1997). Bone morphogenetic proteins induce astroglial differentiation of oligodendroglial-astroglial progenitor cells. *J Neurosci* **17**, 4112-20.

- Mansouri, A. and Gruss, P.** (1998). Pax3 and Pax7 are expressed in commissural neurons and restrict ventral neuronal identity in the spinal cord. *Mech Dev* **78**, 171-8.
- Marigo, V. and Tabin, C. J.** (1996). Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9346-51.
- Marquardt, T. and Pfaff, S. L.** (2001). Cracking the transcriptional code for cell specification in the neural tube. *Cell* **106**, 651-4.
- Marti, E. and Bovolenta, P.** (2002). Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci* **25**, 89-96.
- Marti, E., Bumcrot, D. A., Takada, R. and McMahon, A. P.** (1995a). Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature* **375**, 322-5.
- Marti, E., Takada, R., Bumcrot, D. A., Sasaki, H. and McMahon, A. P.** (1995b). Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development* **121**, 2537-47.
- Massague, J.** (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**, 753-91.
- Massague, J.** (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 169-78.
- Massague, J. and Chen, Y. G.** (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* **14**, 627-44.
- Massague, J. and Weis-Garcia, F.** (1996). Serine/threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals. *Cancer Surv* **27**, 41-64.
- Massague, J. and Wotton, D.** (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J* **19**, 1745-54.
- Matise, M.** (2002). A dorsal elaboration in the spinal cord. *Neuron* **34**, 491-3.
- Matise, M. P., Epstein, D. J., Park, H. L., Platt, K. A. and Joyner, A. L.** (1998). Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development* **125**, 2759-70.
- Matise, M. P. and Joyner, A. L.** (1999). Gli genes in development and cancer. *Oncogene* **18**, 7852-9.
- McMahon, A. P.** (2000). More surprises in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* **100**, 185-8.
- McMahon, J. A., Takada, S., Zimmerman, L. B., Fan, C. M., Harland, R. M. and McMahon, A. P.** (1998). Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* **12**, 1438-52.
- Mehler, M. F., Mabie, P. C., Zhang, D. and Kessler, J. A.** (1997). Bone morphogenetic proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* **20**, 309-17.
- Mehler, M. F., Mabie, P. C., Zhu, G., Gokhan, S. and Kessler, J. A.** (2000). Developmental changes in progenitor cell responsiveness to bone morphogenetic proteins differentially modulate progressive CNS lineage fate. *Dev Neurosci* **22**, 74-85.
- Mekki-Dauriac, S., Agius, E., Kan, P. and Cochard, P.** (2002). Bone morphogenetic proteins negatively control oligodendrocyte precursor specification in the chick spinal cord. *Development* **129**, 5117-30.
- Meyer, N. P. and Roelink, H.** (2003). The amino-terminal region of Gli3 antagonizes the Shh response and acts in dorsoventral fate specification in the developing spinal cord. *Dev Biol* **257**, 343-55.

- Miller, R. H.** (1996). Oligodendrocyte origins. *Trends Neurosci* **19**, 92-6.
- Miller, R. H.** (2002). Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol* **67**, 451.
- Miller, R. H., Dinsio, K., Wang, R., Geertman, R., Maier, C. E. and Hall, A. K.** (2004). Patterning of spinal cord oligodendrocyte development by dorsally derived BMP4. *J Neurosci Res* **76**, 9-19.
- Miller, R. H., Hayes, J. E., Dyer, K. L. and Sussman, C. R.** (1999). Mechanisms of oligodendrocyte commitment in the vertebrate CNS. *Int J Dev Neurosci* **17**, 753-63.
- Miller, R. H., Payne, J., Milner, L., Zhang, H. and Orentas, D. M.** (1997). Spinal cord oligodendrocytes develop from a limited number of migratory highly proliferative precursors. *J Neurosci Res* **50**, 157-68.
- Millonig, J. H., Millen, K. J. and Hatten, M. E.** (2000). The mouse Dreher gene *Lmx1a* controls formation of the roof plate in the vertebrate CNS. *Nature* **403**, 764-9.
- Miyazono, K.** (2000). Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. *J Cell Sci* **113 (Pt 7)**, 1101-9.
- Mizuguchi, R., Sugimori, M., Takebayashi, H., Kosako, H., Nagao, M., Yoshida, S., Nabeshima, Y., Shimamura, K. and Nakafuku, M.** (2001). Combinatorial roles of *olig2* and *neurogenin2* in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* **31**, 757-71.
- Muller, T., Brohmann, H., Pierani, A., Heppenstall, P. A., Lewin, G. R., Jessell, T. M. and Birchmeier, C.** (2002). The homeodomain factor *lhx1* distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord. *Neuron* **34**, 551-62.
- Muroyama, Y., Fujihara, M., Ikeya, M., Kondoh, H. and Takada, S.** (2002). Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev* **16**, 548-53.
- Nakayama, T., Cui, Y. and Christian, J. L.** (2000). Regulation of BMP/Dpp signaling during embryonic development. *Cell Mol Life Sci* **57**, 943-56.
- Nery, S., Wichterle, H. and Fishell, G.** (2001). Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Development* **128**, 527-540.
- Nifuji, A., Kellermann, O., Kuboki, Y., Wozney, J. M. and Noda, M.** (1997). Perturbation of BMP signaling in somitogenesis resulted in vertebral and rib malformations in the axial skeletal formation [see comments]. *J Bone Miner Res* **12**, 332-42.
- Noll, E. and Miller, R. H.** (1993). Oligodendrocyte precursors originate at the ventral ventricular zone dorsal to the ventral midline region in the embryonic rat spinal cord. *Development* **118**, 563-73.
- Novitch, B. G., Chen, A. I. and Jessell, T. M.** (2001). Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor *Olig2*. *Neuron* **31**, 773-89.
- Ohkawara, B., Iemura, S., ten Dijke, P. and Ueno, N.** (2002). Action range of BMP is defined by its N-terminal basic amino acid core. *Curr Biol* **12**, 205-9.
- Ono, K., Bansal, R., Payne, J., Rutishauser, U. and Miller, R. H.** (1995). Early development and dispersal of oligodendrocyte precursors in the embryonic chick spinal cord. *Development* **121**, 1743-54.
- Orentas, D. M., Hayes, J. E., Dyer, K. L. and Miller, R. H.** (1999). Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Development* **126**, 2419-29.

- Orentas, D. M. and Miller, R. H.** (1996). The origin of spinal cord oligodendrocytes is dependent on local influences from the notochord. *Dev Biol* **177**, 43-53.
- Orentas, D. M. and Miller, R. H.** (1998). Regulation of oligodendrocyte development. *Mol Neurobiol* **18**, 247-59.
- Panchision, D. M., Pickel, J. M., Studer, L., Lee, S. H., Turner, P. A., Hazel, T. G. and McKay, R. D.** (2001). Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes Dev* **15**, 2094-110.
- Park, H. C., Mehta, A., Richardson, J. S. and Appel, B.** (2002). *olig2* is required for zebrafish primary motor neuron and oligodendrocyte development. *Dev Biol* **248**, 356-68.
- Park, H. L., Bai, C., Platt, K. A., Matise, M. P., Beeghly, A., Hui, C. C., Nakashima, M. and Joyner, A. L.** (2000). Mouse *Gli1* mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a *Gli2* mutation. *Development* **127**, 1593-605.
- Patten, I. and Placzek, M.** (2002). Opponent activities of *Shh* and BMP signaling during floor plate induction in vivo. *Curr Biol* **12**, 47-52.
- Perez Villegas, E. M., Olivier, C., Spassky, N., Poncet, C., Cochard, P., Zalc, B., Thomas, J. L. and Martinez, S.** (1999). Early specification of oligodendrocytes in the chick embryonic brain. *Dev Biol* **216**, 98-113.
- Persson, M., Stamatakis, D., te Welscher, P., Andersson, E., Bose, J., Ruther, U., Ericson, J. and Briscoe, J.** (2002). Dorsal-ventral patterning of the spinal cord requires *Gli3* transcriptional repressor activity. *Genes Dev* **16**, 2865-78.
- Pfaff, S. L., Mendelsohn, M., Stewart, C. L., Edlund, T. and Jessell, T. M.** (1996). Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* **84**, 309-20.
- Piek, E., Heldin, C. H. and Ten Dijke, P.** (1999). Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *Faseb J* **13**, 2105-24.
- Pierani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C. and Jessell, T. M.** (1999). A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* **97**, 903-15.
- Pituello, F., Medevielle, F., Foulquier, F. and Duprat, A. M.** (1999). Activation of *Pax6* depends on somitogenesis in the chick embryo cervical spinal cord. *Development* **126**, 587-96.
- Pituello, F., Yamada, G. and Gruss, P.** (1995). Activin A inhibits *Pax-6* expression and perturbs cell differentiation in the developing spinal cord in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6952-6.
- Poh, A., Karunaratne, A., Kolle, G., Huang, N., Smith, E., Starkey, J., Wen, D., Wilson, I., Yamada, T. and Hargrave, M.** (2002). Patterning of the vertebrate ventral spinal cord. *Int J Dev Biol* **46**, 597-608.
- Poncet, C., Soula, C., Trousse, F., Kan, P., Hirsinger, E., Pourquie, O., Duprat, A. M. and Cochard, P.** (1996). Induction of oligodendrocyte progenitors in the trunk neural tube by ventralizing signals: effects of notochord and floor plate grafts, and of sonic hedgehog. *Mech Dev* **60**, 13-32.
- Pringle, N. P., Guthrie, S., Lumsden, A. and Richardson, W. D.** (1998). Dorsal spinal cord neuroepithelium generates astrocytes but not oligodendrocytes. *Neuron* **20**, 883-93.
- Pringle, N. P. and Richardson, W. D.** (1993). A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development* **117**, 525-33.

- Pringle, N. P., Yu, W. P., Guthrie, S., Roelink, H., Lumsden, A., Peterson, A. C. and Richardson, W. D.** (1996). Determination of neuroepithelial cell fate: induction of the oligodendrocyte lineage by ventral midline cells and sonic hedgehog. *Dev Biol* **177**, 30-42.
- Pringle, N. P., Yu, W. P., Howell, M., Colvin, J. S., Ornitz, D. M. and Richardson, W. D.** (2003). Fgfr3 expression by astrocytes and their precursors: evidence that astrocytes and oligodendrocytes originate in distinct neuroepithelial domains. *Development* **130**, 93-102.
- Qi, Y., Cai, J., Wu, Y., Wu, R., Lee, J., Fu, H., Rao, M., Sussel, L., Rubenstein, J. and Qiu, M.** (2001). Control of oligodendrocyte differentiation by the Nkx2.2 homeodomain transcription factor. *Development* **128**, 2723-33.
- Raff, M. C., Miller, R. H. and Noble, M.** (1983). A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* **303**, 390-6.
- Rao, M. S., Noble, M. and Mayer-Proschel, M.** (1998). A tripotential glial precursor cell is present in the developing spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3996-4001.
- Reddi, A. H.** (1997). Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**, 11-20.
- Reddi, A. H.** (2001). Interplay between bone morphogenetic proteins and cognate binding proteins in bone and cartilage development: noggin, chordin and DAN. *Arthritis Res* **3**, 1-5.
- Richardson, W. D., Pringle, N. P., Yu, W. P. and Hall, A. C.** (1997). Origins of spinal cord oligodendrocytes: possible developmental and evolutionary relationships with motor neurons. *Dev Neurosci* **19**, 58-68.
- Richardson, W. D., Smith, H. K., Sun, T., Pringle, N. P., Hall, A. and Woodruff, R.** (2000). Oligodendrocyte lineage and the motor neuron connection. *Glia* **29**, 136-42.
- Roelink, H., Porter, J. A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D. T., Beachy, P. A. and Jessell, T. M.** (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* **81**, 445-55.
- Rogister, B., Ben-Hur, T. and Dubois-Dalcq, M.** (1999). From neural stem cells to myelinating oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* **14**, 287-300.
- Rowitch, D. H., Lu, Q. R., Kessler, N. and Richardson, W. D.** (2002). An 'oligarchy' rules neural development. *Trends Neurosci* **25**, 417-22.
- Ruiz i Altaba, A.** (1999a). Gli proteins and Hedgehog signalling: development and cancer. *Trends Genet* **15**, 418-25.
- Ruiz i Altaba, A.** (1999b). Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* **126**, 3205-16.
- Ruiz i Altaba, A.** (1999c). The works of Gli and the power of Hedgehog. *Nature cell Biol* **1**, E147-8.
- Ruiz i Altaba, A., Nguyen, V. and Palma, V.** (2003). The emergent design of the neural tube: prepattern, SHH morphogen and Gli Code. *Mech Dev* **13**, 513-521.
- Ruiz i Altaba, A., Prezioso, V. R., Darnell, J. E. and Jessell, T. M.** (1993). Sequential expression of HNF-3 beta and HNF-3 alpha by embryonic organizing centers: the dorsal lip/node, notochord and floor plate. *Mech Dev* **44**, 91-108.
- Sander, M., Paydar, S., Ericson, J., Briscoe, J., Berber, E., German, M., Jessell, T. M. and Rubenstein, J. L.** (2000). Ventral neural patterning by Nkx homeobox genes: Nkx6.1 controls somatic motor neuron and ventral interneuron fates. *Genes Dev* **14**, 2134-9.
- Sasai, Y. and De Robertis, E. M.** (1997). Ectodermal patterning in vertebrate embryos. *Dev Biol* **182**, 5-20.

- Sasaki, H., Hui, C., Nakafuku, M. and Kondoh, H.** (1997). A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* **124**, 1313-22.
- Schneider-Maunoury, S., Gilardi-Hebenstreit, P. and Charnay, P.** (1998). How to build a vertebrate hindbrain. Lessons from genetics. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences* **321**, 819-34.
- Selleck, M. A. and Bronner-Fraser, M.** (1995). Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Development* **121**, 525-38.
- Shi, Y. and Massague, J.** (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700.
- Shibata, T., Yamada, K., Watanabe, M., Ikenaka, K., Wada, K., Tanaka, K. and Inoue, Y.** (1997). Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J Neurosci* **17**, 9212-9.
- Smith, J. L. and Schoenwolf, G. C.** (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci* **20**, 510-7.
- Sommer, I. and Schachner, M.** (1981). Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol* **83**, 311-27.
- Soula, C., Danesin, C., Kan, P., Grob, M., Poncet, C. and Cochard, P.** (2001). Distinct sites of origin of oligodendrocytes and somatic motoneurons in the chick spinal cord: oligodendrocytes arise from Nkx2.2-expressing progenitors by a Shh-dependent mechanism. *Development* **128**, 1369-79.
- Spassky, N., Goujet-Zalc, C., Parmantier, E., Olivier, C., Martinez, S., Ivanova, A., Ikenaka, K., Macklin, W., Cerruti, I., Zalc, B. et al.** (1998). Multiple restricted origin of oligodendrocytes. *J Neurosci* **18**, 8331-43.
- Spassky, N., Olivier, C., Perez-Villegas, E., Goujet-Zalc, C., Martinez, S., Thomas, J. and Zalc, B.** (2000). Single or multiple oligodendroglial lineages: a controversy. *Glia* **29**, 143-8.
- Spemann, H. and Mangold, H.** (1924). Uber Induktion von Embryonanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Wilhelm Roux' Arch. Entwicklungmech. Org.* **100**, 599-638.
- Sporle, R., Gunther, T., Struwe, M. and Schughart, K.** (1996). Severe defects in the formation of epaxial musculature in open brain (opb) mutant mouse embryos. *Development* **122**, 79-86.
- Stern, C. D.** (2002). Induction and initial patterning of the nervous system - the chick embryo enters the scene. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 447-51.
- Stolt, C. C., Lommes, P., Sock, E., Chaboissier, M. C., Schedl, A. and Wegner, M.** (2003). The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev* **17**, 1677-89.
- Stone, D. and Rosenthal, A.** (2000). Achieving neuronal patterning by repression. *Nat Neurosci* **3**, 967-9.
- Storey, K. G., Selleck, M. A. and Stern, C. D.** (1995). Neural induction and regionalisation by different subpopulations of cells in Hensen's node. *Development* **121**, 417-28.
- Streit, A. and Stern, C. D.** (1999). Neural induction. A bird's eye view. *Trends Genet* **15**, 20-4.
- Sun, T., Echelard, Y., Lu, R., Yuk, D. I., Kaing, S., Stiles, C. D. and Rowitch, D. H.** (2001). Olig bHLH proteins interact with homeodomain proteins to regulate cell fate acquisition in progenitors of the ventral neural tube. *Curr Biol* **11**, 1413-20.

- Sun, T., Pringle, N. P., Hardy, A. P., Richardson, W. D. and Smith, H. K.** (1998). Pax6 Influences the Time and Site of Origin of Glial Precursors in the Ventral Neural Tube. *Mol Cell Neurosci* **12**, 228-239.
- Sussman, C. R., Dyer, K. L., Marchionni, M. and Miller, R. H.** (2000). Local control of oligodendrocyte development in isolated dorsal mouse spinal cord. *J Neurosci Res* **59**, 413-20.
- Takebayashi, H., Nabeshima, Y., Yoshida, S., Chisaka, O. and Ikenaka, K.** (2002). The basic helix-loop-helix factor *olig2* is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Curr Biol* **12**, 1157-63.
- Takebayashi, H., Yoshida, S., Sugimori, M., Kosako, H., Kominami, R., Nakafuku, M. and Nabeshima, Y.** (2000). Dynamic expression of basic helix-loop-helix Olig family members: implication of *Olig2* in neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, *Olig3*. *Mech Dev* **99**, 143-8.
- Tanabe, Y. and Jessell, T. M.** (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord [published erratum appears in *Science* 1997 Apr 4;276(5309):21]. *Science* **274**, 1115-23.
- Tanabe, Y., William, C. and Jessell, T. M.** (1998). Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein. *Cell* **95**, 67-80.
- Tekki-Kessarlis, N., Woodruff, R., Hall, A. C., Gaffield, W., Kimura, S., Stiles, C. D., Rowitch, D. H. and Richardson, W. D.** (2001). Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. *Development* **128**, 2545-54.
- Ten Dijke, P., Goumans, M. J., Itoh, F. and Itoh, S.** (2002). Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* **191**, 1-16.
- Ten Dijke, P., Piek, E. and Heldin, C. H.** (1999). Bone morphogenetic proteins and their receptors. In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing group. <http://gate1.inist.fr/:51010>.
- Thomas, J. L., Spassky, N., Perez Villegas, E. M., Olivier, C., Cobos, I., Goujet-Zalc, C., Martinez, S. and Zalc, B.** (2000). Spatiotemporal development of oligodendrocytes in the embryonic brain. *J Neurosci Res* **59**, 471-6.
- Timmer, J. R., Wang, C. and Niswander, L.** (2002). BMP signaling patterns the dorsal and intermediate neural tube via regulation of homeobox and helix-loop-helix transcription factors. *Development* **129**, 2459-72.
- Timsit, S., Martinez, S., Allinquant, B., Peyron, F., Puelles, L. and Zalc, B.** (1995). Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by *DM-20* mRNA expression. *J Neurosci* **15**, 1012-24.
- Tonegawa, A. and Takahashi, Y.** (1998). Somitogenesis controlled by *Noggin*. *Dev Biol* **202**, 172-82.
- Trousse, F., Giess, M. C., Soula, C., Ghandour, S., Duprat, A. M. and Cochard, P.** (1995). Notochord and floor plate stimulate oligodendrocyte differentiation in cultures of the chick dorsal neural tube. *J Neurosci Res* **41**, 552-60.
- von Bubnoff, A. and Cho, K. W.** (2001). Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol* **239**, 1-14.
- Wada, T., Kagawa, T., Ivanova, A., Zalc, B., Shirasaki, R., Murakami, F., Iemura, S., Ueno, N. and Ikenaka, K.** (2000). Dorsal spinal cord inhibits oligodendrocyte development. *Dev Biol* **227**, 42-55.
- Warf, B. C., Fok-Seang, J. and Miller, R. H.** (1991). Evidence for the ventral origin of oligodendrocyte precursors in the rat spinal cord. *J Neurosci* **11**, 2477-88.

- Watanabe, Y. and Le Douarin, N. M.** (1996). A role for BMP-4 in the development of subcutaneous cartilage. *Mech Dev* **57**, 69-78.
- Weed, M., Mundlos, S. and Olsen, B. R.** (1997). The role of sonic hedgehog in vertebrate development. *Matrix Biol* **16**, 53-8.
- Wegner, M.** (2001). Expression of transcription factors during oligodendroglial development. *Microsc Res Tech* **52**, 746-52.
- Whitman, M.** (1998). Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes Dev* **12**, 2445-62.
- Wilson, S. I. and Edlund, T.** (2001). Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat Neurosci* **4 Suppl**, 1161-8.
- Wilkinson, D. G.** (1992). In *In situ hybridisation: A Practical Approach*. ed. Wilkinson, D. G. (IRL press Oxford) at *Neurosci* **4 Suppl**, 1161-8.
- Woodruff, R. H., Tekki-Kessarlis, N., Stiles, C. D., Rowitch, D. H. and Richardson, W. D.** (2001). Oligodendrocyte development in the spinal cord and telencephalon: common themes and new perspectives. *Int J Dev Neurosci* **19**, 379-85.
- Wrana, J. L. and Attisano, L.** (2000). The Smad pathway. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**, 5-13.
- Xu, X., Cai, J., Fu, H., Wu, R., Qi, Y., Modderman, G., Liu, R. and Qiu, M.** (2000). Selective Expression of Nkx-2.2 Transcription Factor in Chicken Oligodendrocyte Progenitors and Implications for the Embryonic Origin of Oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* **16**, 740-753.
- Yamada, T., Pfaff, S. L., Edlund, T. and Jessell, T. M.** (1993). Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell* **73**, 673-86.
- Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J. and Jessell, T. M.** (1991). Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* **64**, 635-47.
- Yamamura, T., Konola, J. T., Wekerle, H. and Lees, M. B.** (1991). Monoclonal antibodies against myelin proteolipid protein: identification and characterization of two major determinants. *J Neurochem* **57**, 1671-80.
- Ying, Q.-L., Nichols, J., Chambers, I. and Smith, A.** (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with Stat3. *Cell* **115**, 281-92.
- Yu, W. P., Collarini, E. J., Pringle, N. P. and Richardson, W. D.** (1994). Embryonic expression of myelin genes: evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube. *Neuron* **12**, 1353-62.
- Zhou, Q. and Anderson, D. J.** (2002). The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* **109**, 61-73.
- Zhou, Q., Choi, G. and Anderson, D. J.** (2001). The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2. *Neuron* **31**, 791-807.
- Zhou, Q., Wang, S. and Anderson, D. J.** (2000). Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* **25**, 331-43.
- Zhu, G., Mehler, M. F., Mabie, P. C. and Kessler, J. A.** (1999a). Developmental changes in progenitor cell responsiveness to cytokines. *J Neurosci Res* **56**, 131-45.

- Zhu, G., Mehler, M. F., Mabie, P. C. and Kessler, J. A.** (2000). Developmental changes in neural progenitor cell lineage commitment do not depend on epidermal growth factor receptor signaling. *J Neurosci Res* **59**, 312-20.
- Zhu, G., Mehler, M. F., Zhao, J., Yung, S. Y. and Kessler, J. A.** (1999b). Sonic Hedgehog and BMP2 Exert Opposing Actions on Proliferation and Differentiation of Embryonic Neural Progenitor Cells. *Developmental Biology* **215**, 118-129.
- Zwijnen, A., Verschueren, K. and Huylebroeck, D.** (2003). New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades. *FEBS Lett* **546**, 133-9.

RESUME

Dans la moelle épinière embryonnaire, les oligodendrocytes, cellules myélinisantes du système nerveux central, dérivent de cellules précurseurs situées dans un domaine restreint du neuroépithélium ventral. Cette localisation reflète l'influence inductrice des structures axiales ventrales, chorde et *floor plate*, qui sécrètent le morphogène Sonic Hedgehog (SHH) dont l'activité est nécessaire à la détermination des oligodendrocytes (Orentas *et al.*, 1999).

La compétence des cellules neuroépithéliales à adopter le destin oligodendrogial n'est, quant à elle, pas limitée à la région ventrale puisque la moelle épinière dorsale peut générer des oligodendrocytes dans certaines conditions (Poncet *et al.*, 1996). Nous avons alors supposé l'existence de signaux inhibiteurs de l'oligodendrogenèse produits localement, susceptible d'expliquer l'absence de précurseurs dans le neuroépithélium dorsal en situation normale. Nous avons mis en évidence la présence d'une activité inhibitrice de la spécification des oligodendrocytes dans la région dorsale de la moelle épinière embryonnaire de poulet, grâce à l'ablation *in ovo* de ce territoire. Dans ces conditions, des précurseurs oligodendrocytaires ectopiques apparaissent en position dorsale dans le neuroépithélium. Nous avons montré que les *bone morphogenetic proteins* (BMPs), exprimées dorsalement, contrôlent négativement l'émergence des précurseurs des oligodendrocytes en culture et *in vivo*, en greffant des cellules exprimant BMP2 ou Noggin (un antagoniste naturel de certaines BMPs) contre la paroi de la moelle épinière. Nous avons observé que BMP4 antagonise l'effet inducteur de SHH sur la détermination des oligodendrocytes dans des cultures de neuroépithélium ventral réalisées en présence de ces deux protéines. Enfin, nous avons étudié l'effet des BMPs sur l'expression de facteurs de transcription présents dans le neuroépithélium ventral, *in vitro* et *in vivo*, et montré que ces protéines répriment l'expression de Olig2, un facteur essentiel pour les étapes précoces de l'oligodendrogenèse (Lu *et al.*, 2002).

Nous proposons que les BMPs font partie des signaux inhibiteurs de la spécification des oligodendrocytes révélés par l'excision de la région dorsale du tube neural et qu'elles fixent la limite dorsale du domaine oligodendrogénique, au moins *via* la régulation de l'expression de Olig2. Ainsi, la position selon l'axe dorso-ventral de la région productrice des oligodendrocytes, comme celle des domaines de progéniteurs des divers types neuronaux de la moelle épinière, dépendrait de l'intégration des activités dorsalisante et ventralisante qui établissent la polarité dorso-ventrale du névraxe.

Mots clés : Oligodendrocytes, BMPs, SHH, détermination cellulaire, moelle épinière, développement, embryon de poulet