



**HAL**  
open science

# Le tégument des vertébrés et la spécification de l'épithélium cornéen

Elodie Collomb

► **To cite this version:**

Elodie Collomb. Le tégument des vertébrés et la spécification de l'épithélium cornéen. Embryologie et organogenèse. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT: . tel-00723949

**HAL Id: tel-00723949**

**<https://theses.hal.science/tel-00723949>**

Submitted on 15 Aug 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE**

Spécialité : **Biodiversité du développement - Oncogénèse**

Présentée et soutenue publiquement par

**Elodie Collomb**

Le 17 Décembre 2010

# **Le tégument des vertébrés et la spécification de l'épithélium cornéen**

**Thèse préparée sous la direction du Pr Danielle DHOUAILLY**

Équipe Ontogénèse et Cellules Souches du Tégument

Institut Albert Bonniot-Centre de Recherche INSERM/UJF U823-Grenoble I

- *École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant* -

*Composition du Jury:*

Pr François BOUCHER

Pr Anne-Hélène MONSORO-BURQ

Dr Benoit ROBERT

Dr Muriel PERRON

Pr Danielle DHOUAILLY

Pr Michel MOUILLON

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Invité



# REMERCIEMENTS

A l'issue de cette étape importante qu'est la thèse, je tiens à remercier un certain nombre de personnes qui ont fait de cette extraordinaire aventure scientifique, une magnifique aventure humaine.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse : Anne-Hélène Monsoro-Burq et Benoit Robert, mes rapporteurs; Muriel Perron, mon examinatrice et François Boucher, qui a accepté de présider mon jury de thèse. Je tiens également à remercier Michel Mouillon de me faire l'honneur de sa présence lors de ma soutenance et je le remercie pour nos échanges scientifiques et son soutien durant ma thèse.

Je ne saurais trouver les mots pour exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance à Danielle Dhouailly, ma directrice de thèse. Je la remercie pour m'avoir acceptée en thèse dans un domaine qui m'était inconnu et de m'avoir transmis sa passion de la biologie du développement. Je la remercie également pour la liberté qu'elle m'a laissée dans la conduite de mes recherches, me permettant même d'entreprendre des projets risqués. J'ai apprécié la relation de confiance qui s'est installée entre nous au fil des années et nos échanges au quotidien. Merci de n'avoir jamais cessé de croire en moi et à l'aboutissement de mes travaux, même dans les grosses périodes de doute. Je suis très honorée d'être la dernière thésarde d'une grande dame de la science.

Je remercie Doulaye Dembele pour sa collaboration sur l'analyse statistique des données transcriptomiques.

Je tiens à remercier très chaleureusement Ingrid Fliniaux avec qui j'ai partagé une année merveilleuse, aussi bien scientifiquement, qu'amicalement. Cette rencontre avec une personne si gentille, généreuse et passionnée a rendu ma deuxième année de thèse plus légère. A la fois, notre entente et notre complémentarité « à la paillasse » ainsi que nos fous rires constituent des supers souvenirs. Cette année fut le début d'une longue amitié. Bonne route à toi, ma Ch'ti biloute.

Je voudrais remercier Sabrina avec qui j'ai partagé ces années de thèse. Toutes les deux dans le même bateau, nous avons su nous soutenir mutuellement et affronter les tourments, mais toujours en gardant le sourire. Notre amitié n'en est ressortie que plus renforcée.

Je remercie chaleureusement les personnes qui m'ont quotidiennement facilité la vie au laboratoire: Jacqueline, pour sa gentillesse et sa douceur; Charlotte, pour sa bonne humeur et sa disponibilité; Brigitte, pour sa joie de vivre et nos discussions interminables; Martine, pour sa grande attention pour mes souris et pour son amitié; Dalenda, pour son accueil chaleureux tous les matins et sa bienveillance et Michail, pour sa bonne humeur et sa gentillesse. Je remercie Sébastien avec qui j'ai partagé pendant quatre ans le bureau ainsi que les hauts et les bas d'une thèse.

Que serais-je devenue sans mes deux mamans : Christiane et Sandra? Nos fous rires, nos rigolades et tous les moments partagés ensemble ont rendu le quotidien très joyeux. Vous avez su prendre soin de moi et être là dans les bons comme dans les moins bons moments. A tous nos moments partagés et surtout à tous ceux qu'il reste à vivre.



J'aimerais remercier toutes les personnes avec qui j'ai partagé de merveilleux moments au sein de l'institut et qui, un jour ou l'autre, m'ont forcément aidé ou dépanné pour une technique ou un produit : l'ensemble de l'équipe 1, Sandrine B, Sandrine M, Sam, Geneviève, Catherine, Aude, Edwige, Clothilde.

Un grand merci à tous mes collègues de la plateforme cytométrie, pour l'entraide qui s'est installée entre nous et pour la bonne ambiance malgré les déboires techniques : Christian le grand chef, Sandrine D, Rachel, Heidi, Juliana.

Je tiens également à remercier tous ceux en dehors du laboratoire qui m'ont soutenu et qui ont finalement vécu avec moi cette aventure, bien malgré eux : Tony, Audrey, Mélanie, Julien, Anne, Patrick, Sébastien, Albin, les grimpeurs du GAN et les collègues d'ESSEP-8, avec un grand merci à Gaëlle pour la relecture du manuscrit.

Enfin, je ne peux conclure ces remerciements sans une énorme pensée à mes parents et à Papou, sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Une immense merci également à Samuel, pour son soutien et son réconfort quotidiens, surtout pour la dernière ligne droite qui a été particulièrement mouvementée. Merci de m'avoir encouragée, mais surtout supportée.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1. LE TÉGUMENT DES OISEAUX ET DES MAMMIFÈRES</b>	<b>3</b>
<b>2. STRUCTURES DE LA PEAU ET DE LA CORNÉE CHEZ L'ADULTE</b>	<b>3</b>
2.1. LA PEAU ET LES PHANÈRES	3
2.1.1. La peau	3
2.1.2. Les phanères	7
2.1.2.1. Le follicule pileux	8
2.1.2.2. Le follicule plumaire	11
2.2. LA CORNÉE	12
<b>3. LES CELLULES SOUCHES DU TÉGUMENT</b>	<b>18</b>
3.1. DÉFINITION ET CARACTÉRISTIQUES D'UNE CELLULE SOUCHE	18
3.2. LES CELLULES SOUCHES DE LA COMPOSANTE MÉSENCHYMATEUSE DE LA PEAU ET DE LA CORNÉE	22
3.3. LES CELLULES SOUCHES ÉPIDERMIQUES ET FOLLICULAIRES	23
3.3.1. Leur localisation	23
3.3.2. Les marqueurs moléculaires potentiels	26
3.3.3. Le maintien de l'état de cellule souche par la niche	27
3.4. LES CELLULES SOUCHES CORNÉENNES	29
3.4.1. Les processus de renouvellement de l'épithélium cornéen	29
3.4.2. Le réservoir limbique ou niche des cellules souches cornéennes	33
3.4.3. Les marqueurs des cellules souches cornéennes	34
3.4.4. Le maintien à l'état souche dans la niche	34
<b>4. FORMATION DE LA PEAU DORSALE ET FACIALE AINSI QUE DES PRIMORDIA DE PHANÈRES</b>	<b>37</b>
4.1. ORIGINE EMBRYONNAIRE DE LA PEAU	37
4.2. LA MORPHOGENÈSE DU PHANÈRE	38
4.2.1. Événements morphologiques lors de la formation du follicule pileux	38
4.2.2. Événements morphologiques lors de la formation du follicule plumaire	40
4.3. INTERACTIONS TISSULAIRES À L'ORIGINE DE LA FORMATION DU PRIMORDIUM	42
4.4. LES SIGNAUX MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA FORMATION DES PRIMORDIA DE PHANÈRES	42
4.4.1. Expression et rôle des Wnt et de la $\beta$ -caténine	42
4.4.2. Expression et rôle des FGFs	45
4.4.3. Expression et rôle des BMPs	47
4.4.4. Expression et rôle de la voie de signalisation de l'ectodysplasine (EDA)	49
4.4.5. Expression et rôle du système Notch / Delta	51
4.4.6. Expression et rôle de Shh	51
4.4.7. Synthèse des principales interactions conduisant à la formation d'un primordia de phanère	52
4.5. LA SÉGRÉGATION DES CELLULES SOUCHES ÉPIDERMIQUES	52

<b>5. FORMATION DE L'ŒIL</b> .....	<b>54</b>
5.2. LES PRINCIPALES ÉTAPES DE LA MORPHOGENÈSE DE L'ŒIL .....	54
5.3. LE JEU D'INDUCTIONS ENTRE LES DIFFÉRENTS TISSUS EMBRYONNAIRES .....	56
5.4. LE DOMAINE PRÉ PLACODAL .....	56
5.5. LE MASTER GÈNE DE L'ŒIL : PAX6 .....	62
5.6. LES PRINCIPAUX ÉVÉNEMENTS MOLÉCULAIRES DU DÉVELOPPEMENT DU CRISTALLIN.....	63
5.7. LE DÉVELOPPEMENT DES VÉSICULES OPTIQUES ET LA DIFFÉRENCIATION RÉTINIENNE .....	66
5.8. LA MORPHOGENÈSE DE LA CORNÉE .....	67
<b>6. LA REPROGRAMMATION DE L'ÉPITHÉLIUM CORNÉEN ADULTE</b> .....	<b>68</b>
6.1. COMPORTEMENT DU DERME EMBRYONNAIRE .....	68
6.2. COMPORTEMENT DE L'ÉPITHÉLIUM CORNÉEN .....	68
 <b>OBJECTIFS DE LA THESE</b>	 <b>73</b>
 <b>RESULTATS</b>	 <b>75</b>
<b>1. L'EXPRESSION DE BMP7 ET DE BMP2 EST REQUISE POUR L'ORGANISATION DU DERME</b> .....	<b>75</b>
 <b>2. LA SPÉCIFICATION DE L'ÉPITHÉLIUM CORNÉEN</b> .....	<b>77</b>
2.1. ÉTUDE TRANSCRIPTOMIQUE COMPARATIVE ENTRE LE PROGRAMME CORNÉEN ET LE PROGRAMME ÉPIDERMIQUE.....	77
2.1.1. PROBLÉMATIQUE .....	77
2.1.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	77
2.1.2.1. Dissection tissulaire et dissociation cellulaire .....	77
2.1.2.2. Isolation des cellules souches par tri cellulaire .....	80
2.1.2.3. Hybridation sur puces Affymetrix .....	80
2.1.2.4. Analyse statistique des données.....	80
2.1.2.5. Validation des données par PCR quantitative.....	81
2.1.3. RÉSULTATS .....	81
2.1.4. CONCLUSION.....	82
2.2. LA SPÉCIFICATION DE L'ÉPITHÉLIUM CORNÉEN INTERVIENT AVANT LE STADE DE LA VÉSICULE CRISTALLINIENNE, SA LABILITÉ DÉPENDANT DE SA CAPACITÉ À DESACTIVER PAX6 (PUBLICATION 2) .....	85
2.3. LE STROMA JOUE UN RÔLE TRÈS LIMITÉ DANS LA DIFFÉRENCIATION DE L'ÉPITHÉLIUM CORNÉEN (PUBLICATION 2) .....	86
2.4. L'ABLATION CHIRURGICALE DE LA PLACODE CONDUIT À LA RÉGÉNÉRATION DU CRISTALLIN (PUBLICATION 3) .....	87
2.5. LA SPÉCIFICATION DE L'ÉPITHÉLIUM CORNÉEN : LA DERNIERE ÉTAPE DU PROGRAMME CRISTALLINIEN (PUBLICATION 4) .....	88
2.6. PUBLICATIONS .....	90

<b>DISCUSSION</b>	<b>93</b>
1. Les BMPs jouent un rôle positif lors de l'organisation du derme. ....	93
2. Le stroma jouerait un rôle limité, lors de la détermination du programme de l'épithélium cornéen. ....	93
3. Contrairement au derme, le stroma ne peut induire la spécification du programme de l'épithélium cornéen dans un ectoderme banal. ....	94
4. La spécification de l'épithélium cornéen intervient dans l'ectoderme dès le stade neurula, lors de la spécification du domaine préplacodal. ....	95
5. Lors de sa formation embryonnaire, le stroma, ou plutôt les cellules des crêtes neurales qui le constituent, stabiliseraient la spécification du programme cornéen, provoquant sa détermination. ....	96
6. Les cellules souches cornéennes, localisation et différences avec les cellules souches épidermiques du bulge. ....	96
 <b>PERSPECTIVES</b>	 <b>99</b>
 <b>BIBLIOGRAPHIE</b>	 <b>101</b>



## INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX

<b>Figure 1</b> : Les principaux dérivés du feuillet embryonnaire ectodermique.....	2
<b>Figure 2</b> : Comparaison entre la peau de souris et la peau de poulet. ....	6
<b>Figure 3</b> : Macropattern et micropattern chez la souris et le poulet. ....	9
<b>Figure 4</b> : Structure d'un follicule pileux mature. ....	10
<b>Figure 5</b> : Morphologie de l'œil et de la cornée. ....	13
<b>Figure 6</b> : Les différents types de cellules souches. ....	19
<b>Figure 7</b> : Les cellules souches épidermiques interfolliculaires. ....	24
<b>Figure 8</b> : Les rôles des cellules souches épidermiques interfolliculaires et des cellules du bulge.....	25
<b>Figure 9</b> : Localisation et caractérisation des cellules épithéliales limbiques. ....	30
<b>Figure 10</b> : Le renouvellement de l'épithélium cornéen à partir du limbe. ....	32
<b>Figure 11</b> : Les principales étapes de la morphogenèse du follicule pileux chez la souris. ....	39
<b>Figure 12</b> : Les principales étapes de la formation de la plume de duvet (plume néoptile) chez le poulet. ....	41
<b>Figure 13</b> : Voies de signalisation médiées par les Wnts. ....	44
<b>Figure 14</b> : Voies de signalisations médiées par le FGF. ....	46
<b>Figure 15</b> : Voies de signalisation médiées par les BMPs. ....	48
<b>Figure 16</b> : Voie de signalisations médiées par l'Ectodysplasine. ....	50
<b>Figure 17</b> : Synthèse du dialogue moléculaire entre les principales voies de signalisation impliquées dans la mise en place du primordium de phanère. ....	53
<b>Figure 18</b> : Les différentes étapes de la morphogenèse de l'œil. ....	55
<b>Figure 19</b> : La compétence ectodermale et sa capacité à répondre à son inducteur, la vésicule optique chez le Xénope : expériences de Spemann et Lewis. ....	57
<b>Figure 20</b> : L'induction du domaine préplacodal et des placodes sensorielles. ....	59
<b>Figure 21</b> : Modèle de répression du devenir cristallin pour la formation des placodes sensorielles et de leurs dérivées.....	61
<b>Figure 22</b> : Les facteurs Pax6 et Sox2 coopèrent pour induire la dernière étape de la différenciation du cristallin. ....	65
<b>Figure 23</b> : La signalisation Wnt inhibe le programme cornéen au profit du programme épidermique.....	70
<b>Figure 24</b> : Les différentes étapes de la reprogrammation d'un épithélium cornéen adulte par un derme embryonnaire.....	71
<b>Figure 25</b> : Schéma des différentes étapes de l'étude transcriptomique comparative entre les cellules souches épidermiques et les cellules souches limbiques. ....	78
<b>Figure 26</b> : De la dissection tissulaire à l'enrichissement en cellules souches.....	79
<b>Figure 27</b> : Listes des gènes communs et différenciellement exprimés dans les cellules souches du limbe et de l'épiderme. ....	83
<b>Figure 28</b> : Comparaison du niveau d'expression relative des gènes différenciellement exprimés dans les cellules souches cornéennes par rapport aux cellules souches épidermiques, en utilisant deux techniques : les puces transcriptomiques et la PCR quantitative.....	84
<b>Figure 29</b> : Trois programmes de différenciation issus de l'ectoderme. ....	98
<b>Tableau 1</b> : Le profil d'expression des différentes kératines dans les épithélia.....	4
<b>Tableau 2</b> : Liste des cristallines présentes dans le cristallin et dans la cornée. ....	17
<b>Tableau 3</b> : Liste des principaux marqueurs potentiels des cellules souches du bulge. ....	28
<b>Tableau 4</b> : Liste des principaux marqueurs potentiels des cellules souches cornéennes.....	35



# **INTRODUCTION**





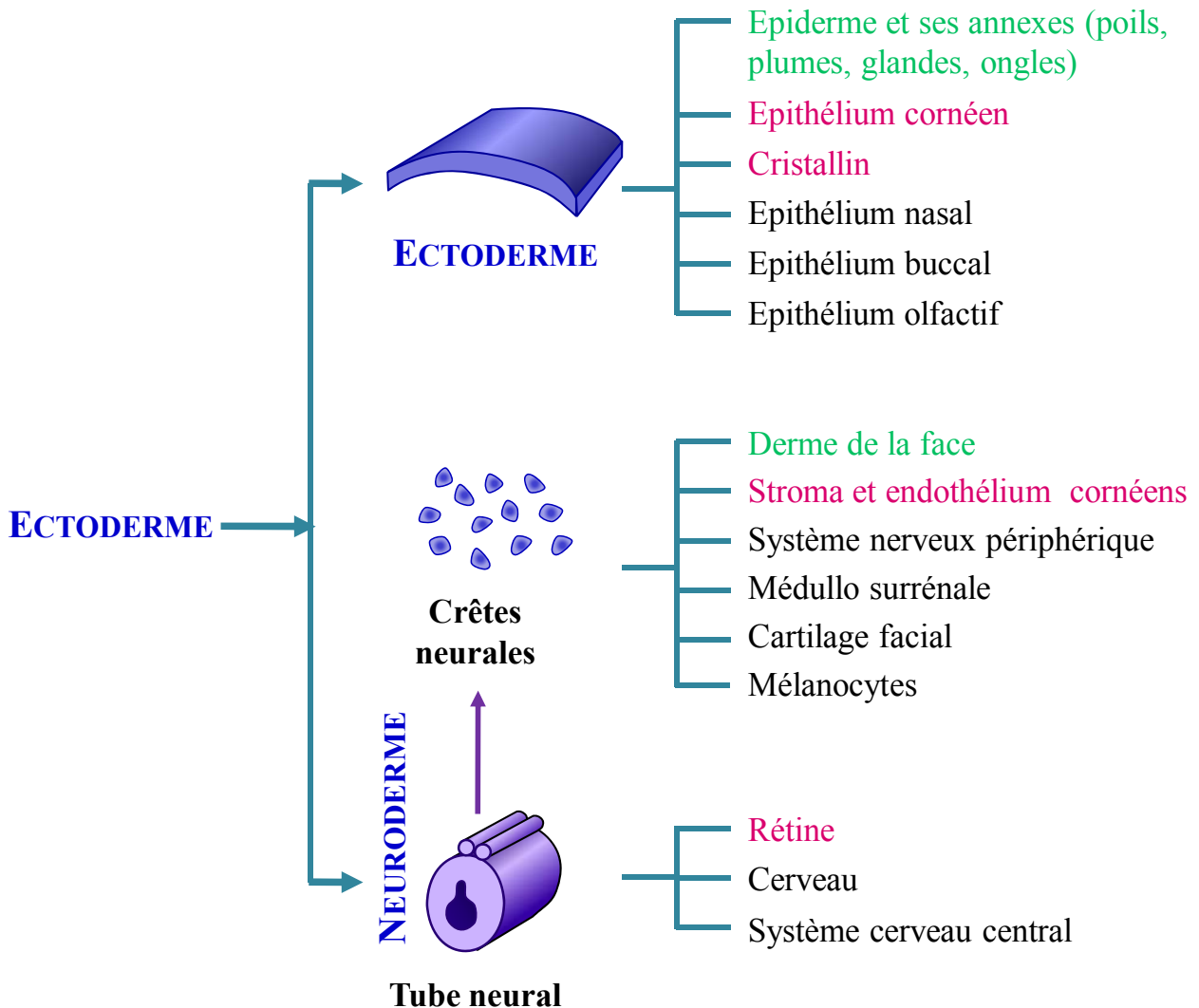
# INTRODUCTION

Au cours de l'organogenèse, les différents organes se distribuent selon les positions relatives des feuillet embryonnaires, dont ils sont issus. Ainsi, à partir de l'ectoderme formant l'enveloppe externe de l'embryon, se différencient divers épithélia comme l'épiderme et l'épithélium cornéen assurant le revêtement externe du futur organisme, alors que l'endoderme sera à l'origine des tissus épithéliaux de l'appareil digestif, donc du revêtement interne. La constitution d'un organe fait appel à un assemblage de différents éléments tissulaires constitués à partir d'un des trois types de feuillet embryonnaires que sont l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme. Les organes épithélio-mésenchymateux sont constitués d'un mésenchyme issu du mésoderme ou des crêtes neurales et d'un épithélium d'origine ectodermique ou endodermique.

Le feuillet ectodermique, outre sa destinée épidermique, est également le feuillet embryonnaire à partir duquel se différencie le neuroderme à l'origine du système nerveux et des cellules des crêtes neurales (Fig. 1). L'ectoderme restant, dit « de surface », va former les structures épithéliales de la peau et de ses annexes, l'épithélium de la cornée et le cristallin, l'épithélium buccal, l'épithélium nasal... Toutes ces structures permettent à l'individu d'interagir avec son environnement, en lui assurant une protection et l'information permettant à l'organisme de communiquer par le toucher, la vue, l'ouïe et l'odorat. L'ectoderme céphalique va étroitement s'associer et interagir avec le neuroderme pour former les organes visuels, auditifs et olfactifs. Les cellules dérivées des crêtes neurales forment non seulement le derme facial mais participent également à la formation des organes des sens. En ce qui concerne l'œil, elles forment les composants mésenchymateux, le stroma cornéen et la sclérotique.

Au cours de sa vie, l'enveloppe externe de l'organisme est soumise à de nombreuses agressions. La peau et la cornée sont des organes qui jouent un rôle essentiel, non seulement sur la protection, mais aussi sur le plan sensoriel. L'intégrité et le maintien de l'homéostasie de ces tissus sont donc primordiaux pour l'organisme. Les pathologies issues d'un défaut lors de la morphogenèse de ces organes ou les pathologies perturbant le renouvellement de ces organes en touchant les cellules souches sont donc très graves. La compréhension des mécanismes moléculaires conduisant à la morphogenèse de ces tissus présente à la fois un grand intérêt scientifique et un grand intérêt thérapeutique. En effet, il est primordial de parvenir à reconstruire artificiellement une peau complète pourvue d'annexes cutanées afin de remplacer les lésions subies par les grands brûlés. D'autre part, afin de palier au manque de donneurs de cornée, l'utilisation de cellules souches adultes épidermiques transformées représenterait un grand progrès thérapeutique.

**Mon travail de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux du laboratoire, visant à clarifier les mécanismes impliqués dans la morphogenèse des épithélia du tégument.** J'ai collaboré à l'identification des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la différenciation du derme (publication 1 : Michon, Forest, Collomb et al., 2008). Cependant, mon but principal a été de comprendre comment se déroule la spécification, puis la détermination et la différenciation de **l'épithélium cornéen**. La morphogenèse cornéenne n'avait pas fait l'objet de travaux récents et était considérée comme résultant d'une induction par le cristallin, bien



**Figure 1 :** Les principaux dérivés du feuillet embryonnaire ectodermique (modifié d'après Scoot F. Gilbert, Developmental Biology (6th edition)). L'ectoderme se divise en trois principales structures: l'ectoderme de surface qui va former l'épiderme et les épithélia de la face; le tube neural qui est à l'origine du cerveau et du système nerveux central; les crêtes neurales, dont le système nerveux périphérique et de nombreuses structures sont issus. *En vert, les composants de la peau; en rose, les composants de l'œil.*

que ce dogme ait soulevé des contestations dès 1973 (pour une revue : Hay, 1980). De plus, comme nous le verrons par la suite, la formation de l'épithélium cornéen étant étroitement liée à celle du cristallin, cet autre dérivé ectodermique a également fait l'objet de mes travaux.

Pour répondre à chaque problématique, j'ai utilisé alternativement le modèle souris et le modèle poulet, chacun présentant des intérêts distincts et complémentaires en termes d'expérimentation et d'accessibilité. Ce passage d'une espèce à une autre n'altère en rien la compréhension globale des mécanismes, puisque étant des étapes clés de l'organogenèse, les facteurs moléculaires principaux mis en jeu sont probablement conservés.

Avant d'exposer les résultats obtenus, je présente ci-après une revue bibliographique sur le tégument, regroupant les connaissances que j'ai acquises au cours de la préparation de ma thèse et qui étaient requises pour l'élaboration des hypothèses de travail et l'analyse des résultats.

## **1. LE TÉGUMENT DES OISEAUX ET DES MAMMIFÈRES**

Le tégument, qui forme le revêtement externe de l'organisme, comprend la peau et la cornée, deux organes épithélio-mésenchymateux. La peau, qui recouvre la plus grande partie de l'organisme, est l'organe le plus lourd du corps. Elle est formée par l'association de l'épiderme et du derme. A ces deux tissus, s'ajoutent les annexes cutanées que sont les glandes et les phanères (poils, plumes, cheveux, ongles, écailles), formés exclusivement par des cellules épidermiques, mais sous le contrôle du derme sous-jacent. Les fonctions de la peau sont multiples et indispensables à la vie. Elle a un rôle de protection contre la pénétration de substances ou d'agents infectieux. Elle permet les échanges avec l'extérieur, nécessaires à la thermorégulation. De plus, elle permet à l'organisme de percevoir son environnement, par la présence d'un grand nombre de terminaisons nerveuses. La cornée est la partie transparente du tégument, la fenêtre de l'œil. Elle est formée de l'association de l'épithélium cornéen et du stroma cornéen. La cornée permet à l'organisme d'interagir avec son environnement, en permettant à l'influx lumineux de pénétrer dans l'œil et d'être transformé par la rétine en influx nerveux. Elle est également la barrière de protection des autres structures oculaires contre les agressions extérieures. Dans les paragraphes suivants seront présentées en détail la morphologie et la composition de ces deux organes.

## **2. STRUCTURES DE LA PEAU ET DE LA CORNÉE CHEZ L'ADULTE**

### **2.1. LA PEAU ET LES PHANÈRES**

#### **2.1.1. La peau**

La peau comprend deux couches principales. La partie superficielle, la plus mince, est formée par un tissu épithélial pluristratifié d'origine ectodermique, l'**épiderme**. La partie la plus profonde, et la plus épaisse, est formée par un tissu conjonctif, le **derme**. L'origine de ce dernier varie selon les différentes régions du corps. Les différentes origines seront détaillées

Kératines de type I	Kératines de type II	Distribution
<b>K5</b>	<b>K14, K15 K19</b>	Couche basale des épithélia stratifiés dont l'épiderme et le limbe Couches différenciées suprabasales de l'épiderme
<b>K1 K2e</b>	<b>K10  K9</b>	Couches différenciées suprabasales de l'épiderme Couches les plus différenciées de l'épiderme Couches différenciées suprabasales plantaires et palmaires
<b>K3</b>	<b>K12</b>	Couches différenciées suprabasales de la cornée centrale et du limbe Couche basale de la cornée centrale
<b>K4, K2p</b>	<b>K13</b>	Couches différenciées suprabasales des muqueuses orales
<b>K6a-f</b>	<b>K16, K17</b>	Couches différenciées suprabasales des épithélia hyperprolifératifs
<b>K8, K7</b>	<b>K18 / K20</b>	Epithélia simples
<b>Ha1-7</b>	<b>Hb1-7</b>	Cheveux, ongles, papilles filiformes de la langue

**Tableau 1 :** Le profil d'expression des différentes kératines dans les épithélia (modifié d'après Bousquet and Coulombe, 2002).

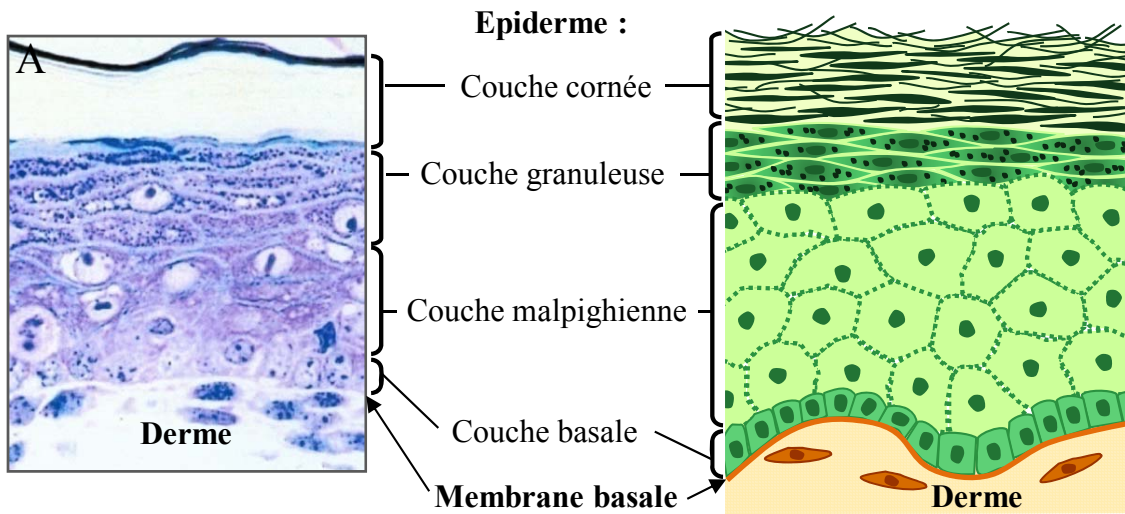
par la suite. En dessous du derme se trouve la couche sous-cutanée, l'**hypoderme** qui n'appartient pas à la peau proprement dite. Elle se compose de tissu aréolaire et de tissu adipeux.

L'**épiderme** est un épithélium stratifié pavimenteux kératinisé. Les kératinocytes constituent environ 90% des cellules épidermiques. Le nombre de strates épidermiques varie selon les classes de vertébrés et à l'intérieur d'une même espèce selon la localisation corporelle. Les cellules nouvellement formées à partir de la couche basale migrent tout en se différenciant vers la surface.

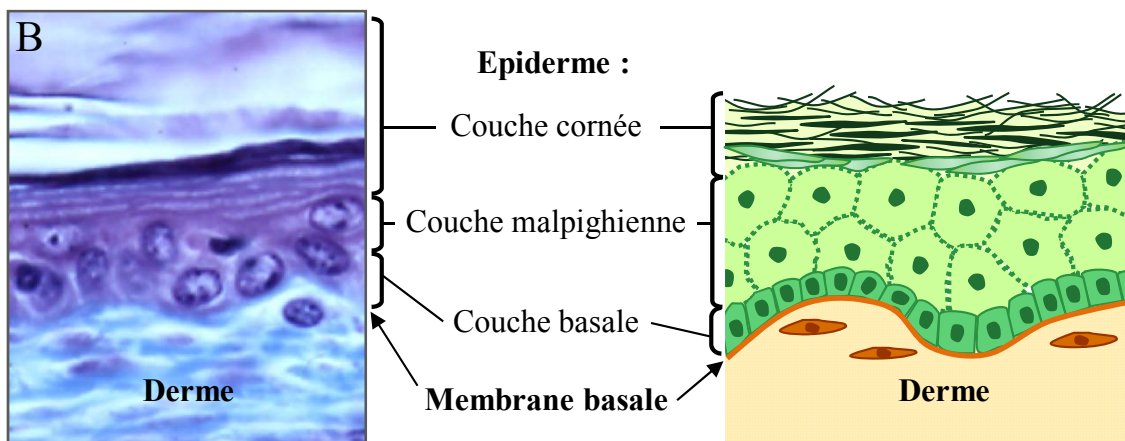
Synthétisées par les kératinocytes au cours de leur différenciation, les **kératines** sont des protéines fibreuses. Deux principales formes de kératine existent. L'alpha-kératine, la plus couramment désignée par le simple terme de kératine, n'est pas spécifique de l'épiderme, mais est caractéristique de tous les épithélia des vertébrés depuis la lamproie. Elle est constituée de polypeptides de structure hélicoïdale, qui, exprimés par paires, forment des hétérodimères type I-type II, qui s'associent en s'enroulant les uns sur les autres pour former les filaments intermédiaires de kératine de 10 nm de diamètre. Au sein des alpha-kératines, il existe deux catégories, les kératines de type I (acides), comprenant principalement les kératines K1 à K9 et les kératines de type II (basiques), comprenant les kératines K10 à K19 (Moll et al., 1982). D'autres kératines ont été découvertes ultérieurement. Principalement les alpha-kératines des phanères des mammifères, poils, griffes, nommées Ha1-a4, Hb1-b4... L'expression des kératines varie en fonction du degré de maturation des cellules épithéliales et également selon le type d'épithélium, cela permet d'utiliser les kératines comme marqueur histochimique de différenciation (Tableau 1). Au sein des sauropsidés, qui regroupent les oiseaux et les reptiles, est apparue une nouvelle forme de kératine, la bêta-kératine. Celle-ci est une innovation de l'évolution car elle ne présente clairement pas d'homologie de séquence avec l'alpha-kératine et forme des structures tertiaires totalement différentes, en feuillets plissés. Chez ces espèces, l'alpha-kératine est présente au niveau des différents épithélia, dont l'épiderme, alors que la bêta-kératine est exclusivement présente dans les phanères (plumes, écailles, bec et griffes).

Chez les mammifères, l'épiderme est formé de cinq couches superposées de kératinocytes présentant des degrés de différenciation croissants. Chaque assise cellulaire se distingue des autres par des propriétés biochimiques et morphologiques propres (Fig. 2). La couche basale ou *stratum basale*, la couche la plus profonde de l'épiderme, est composée d'une seule strate de kératinocytes prismatiques ancrés à la membrane basale sous-jacente par des hémidesmosomes. Ces kératinocytes présentent un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Les mélanocytes, les macrophagocytes intraépidermiques et les cellules de Merkel (avec leurs corpuscules tactiles non capsulés) sont disséminés parmi les kératinocytes de la couche basale. Le couple de kératine K5/K14 est présent dans la couche basale de l'épiderme, comme dans la couche basale de tous les épithélia pluristratifiés. Son expression au sein de l'épithélium cornéen sera abordée par la suite. Au sein de la couche basale, sont présentes des cellules souches qui assurent le renouvellement de l'épiderme. Ces cellules sont peu nombreuses: un faible pourcentage des cellules basales exprime la kératine 15, considérée

## Peau de souris



## Peau de poulet



### **Figure 2 :** Comparaison entre la peau de souris et la peau de poulet.

La peau est composée d'un épithélium pluristratifié et kératinisé, l'épiderme, et d'un tissu mésenchymateux, le derme. L'épiderme de poulet est plus fin et est dépourvu de la couche granuleuse qui est seulement présente dans l'épiderme de mammifères. Les autres couches épidermiques communes aux deux espèces sont la couche basale, la couche malpighienne et la couche cornée. La couche basale épithéliale repose sur une membrane basale qui la sépare du derme sous-jacent. *Iconographie : E. Collomb*

**A:** Coupe semi-fine transversale de la peau dorsale de souris de nouveau-né avec une coloration au bleu de toluidine. **B:** Coupe transversale de la peau de l'aptérie médio-ventrale de poulet avec une coloration de Mallory.

comme un marqueur des cellules souches (Whitbread and Powell, 1998; Kaur, 2006). La mise en évidence de ces cellules souches épidermiques basales sera présentée dans le paragraphe 3.

La couche spineuse ou *stratum spinosum* est située au-dessus de la couche basale et est formée de kératinocytes polyédriques (à plusieurs facettes) comportant un large cytoplasme et serrés les uns contre les autres. Elle est caractérisée par les nombreuses interdigitations membranaires qu'établissent entre eux les kératinocytes voisins, reliées par des desmosomes. Avec l'initiation du programme de différenciation, dès la première couche suprabasale, sont synthétisées les kératines spécifiques de différenciation terminale : K1, K2 et K10 (Moll et al., 1982).

La couche granuleuse ou *stratum granulosum* est formée de kératinocytes aplatis en apoptose. Dans les strates inférieures de cette couche, les noyaux et les organites des kératinocytes commencent à dégénérer. Aux filaments de kératine vont s'associer des grains de kératohyaline constitués de profilagrine, présente sous forme de polymère. Celle-ci sera ensuite clivée en filagrine dans la couche cornée.

La couche cornée ou *stratum corneum* est constituée de nombreuses strates de kératinocytes anucléés et aplatis. Leur cytoplasme est rempli de trousseaux fibrillaires formés de kératine et de filagrine ainsi que d'autres protéines amorphes associées. Les membranes plasmiques sont devenues très denses et épaisses et les desmosomes sont profondément modifiés. En surface, les cellules se desquament et sont remplacées par des cellules des couches plus profondes.

Chez les oiseaux, l'épiderme est plus mince, il ne comporte que quatre couches cellulaires (la couche granuleuse n'étant pas présente) et il ne comporte que trois à cinq assises cellulaires vivantes recouvertes d'une couche cornée (Fig. 2).

La jonction dermo-épidermique est constituée d'une **lame basale** élaborée conjointement par les kératinocytes basaux et les fibroblastes dermiques. La lamina lucida contient les laminines 1, 5 et 6 alors que la lamina densa comprend en majeure partie les collagènes IV et VII (Chan, 1997).

D'origine diverse en fonction de sa localisation sur le corps, le **derme** est un tissu conjonctif résistant et élastique. Il est constitué des fibroblastes, cellules spécialisées dans la synthèse de la matrice extracellulaire. Cette matrice extracellulaire comporte des fibres de collagène de type I et III, de l'élastine, divers protéoglycanes et des protéines à fonction adhésive, telle que la fibronectine et la laminine. Le derme contient de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques qui permettent de nourrir l'épiderme avasculaire, ainsi que des nerfs et des terminaisons nerveuses.

### **2.1.2. Les phanères**

À partir de l'épiderme et sous le contrôle du derme (voir le paragraphe 4) se différencient deux types d'annexes cutanées : les glandes cutanées, des annexes à activité sécrétrice et les phanères, des formations saillantes kératinisées (poils et griffes chez les mammifères, plumes, écailles et griffes chez les oiseaux). Les glandes cutanées, bien ancrées dans le derme, ne sont



bien développées que chez les mammifères. Ces derniers en possèdent trois types : les glandes sébacées, les glandes sudoripares et les glandes mammaires. La peau des oiseaux ne possède pas de glandes, hormis la glande uropygienne, bien développée chez les espèces aquatiques et qui sécrète le sébum.

La localisation des différents phanères sur le corps est organisée et délimitée en champs cutanés phanérogènes, dont la disposition est invariable d'un individu à l'autre dans une même espèce (Fig. 3). Le "**macropattern**" représente la façon dont sont organisés les différents champs cutanés les uns par rapport aux autres, alors que le "**micropattern**" qualifie le motif de distribution des phanères au sein d'un champ cutané phanérogène (Sengel and Mauger, 1976; Chuong, 1998b; Sengel, 1976).

#### 2.1.2.1. Le follicule pileux

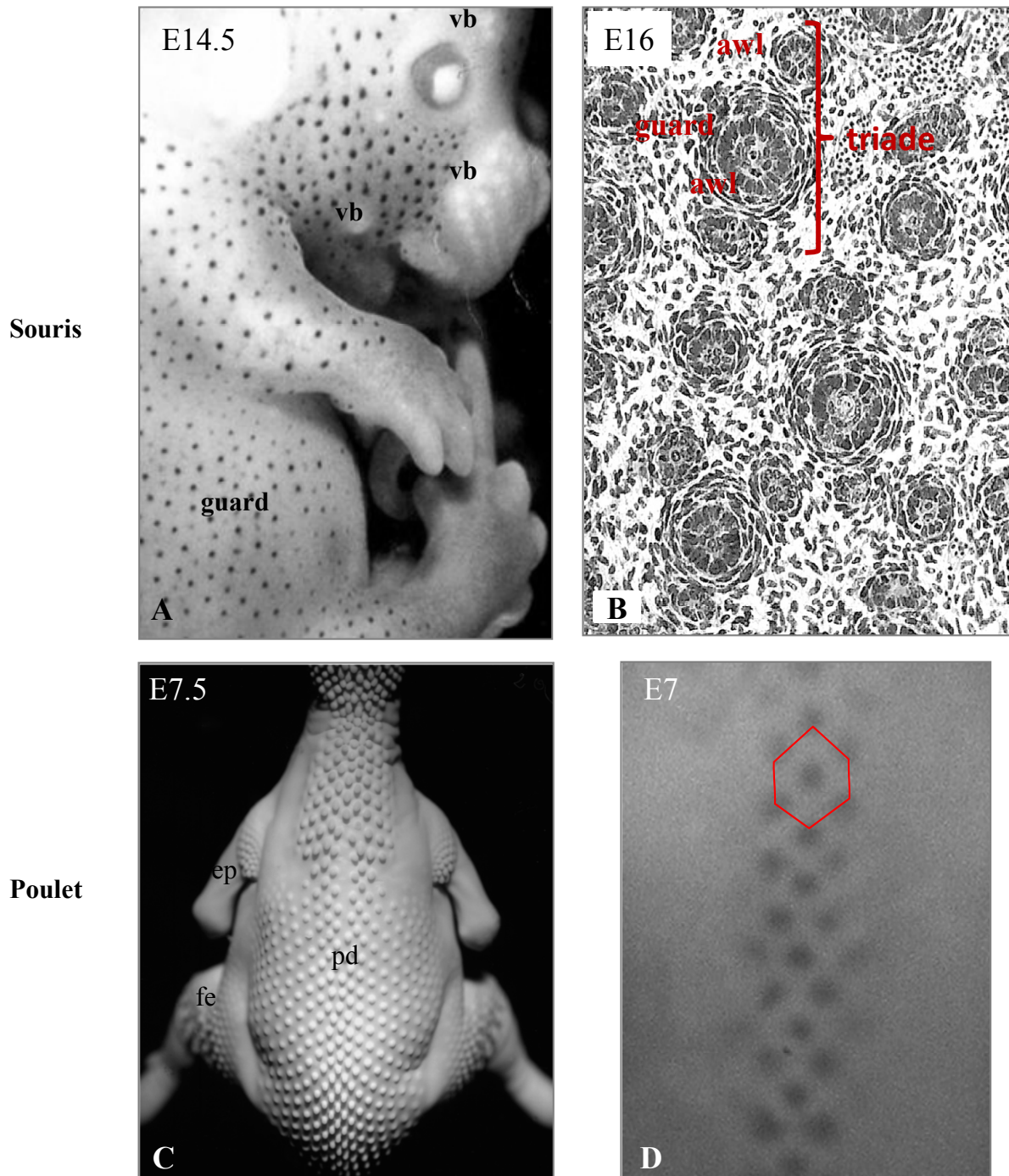
Chez les mammifères, le **follicule pileux** est une annexe cutanée qui produit le poil. Il existe principalement deux types de poils : les vibrisses, qui sont les poils tactiles du museau et les poils du pelage, comprenant différents sous-types (poils jarres, les plus larges ; poils awls, larges et courts; poils auchènes, longs et fins ; poils zigzag, plus fins). Chez la souris, le nombre de champs cutanés est relativement réduit. Le corps est recouvert de poils de pelage et sur la face ventrale, s'ajoute le champ des glandes mammaires. Au niveau de la face, en plus des poils de pelage, on retrouve les vibrisses principalement regroupées au niveau de la lèvre supérieure. La peau des pelotes plantaires est dépourvue de poils, mais contient des glandes sudoripares.

L'apparition des différentes catégories de poils de pelage se fait successivement par vagues synchrones. Leur mise en place suit un patron morphogénétique, dit en triade, caractérisé par un follicule primaire central, accompagné d'un follicule primaire latéral et d'un follicule secondaire. Sur la lèvre supérieure, les primordia de vibrisses apparaissent séquentiellement du côté oculaire vers le côté nasal et sont au final disposées en cinq rangées. Quatre autres vibrisses, formant une "colonne" située du côté le plus oculaire, sont placées en quinconce entre ces cinq rangées.

Le follicule pileux peut être divisé en trois régions allant de la partie la plus ancrée dans le derme à la partie la plus superficielle (Fig. 4). Le bulbe, la partie renflée la plus profonde du follicule, comprend la matrice pilaire qui encapsule la papille dermique. Il se termine au niveau de l'insertion du muscle érecteur du poil. La zone comprise entre l'insertion du muscle pilo-érecteur et l'association de la glande sébacée annexée au poil s'appelle l'isthme. Il comprend une partie renflée au niveau de l'insertion du muscle érecteur du poil qui constitue le réservoir des cellules souches folliculaires, le bulge (voir paragraphe 3.3). L'infundibulum pilaire constitue la partie superficielle la plus distale du follicule qui est en continuité directe avec l'épiderme interfolliculaire. L'isthme, comprenant le bulge, et l'infundibulum forment la partie du follicule dite permanente, car elle reste présente durant le cycle du poil, alors que la

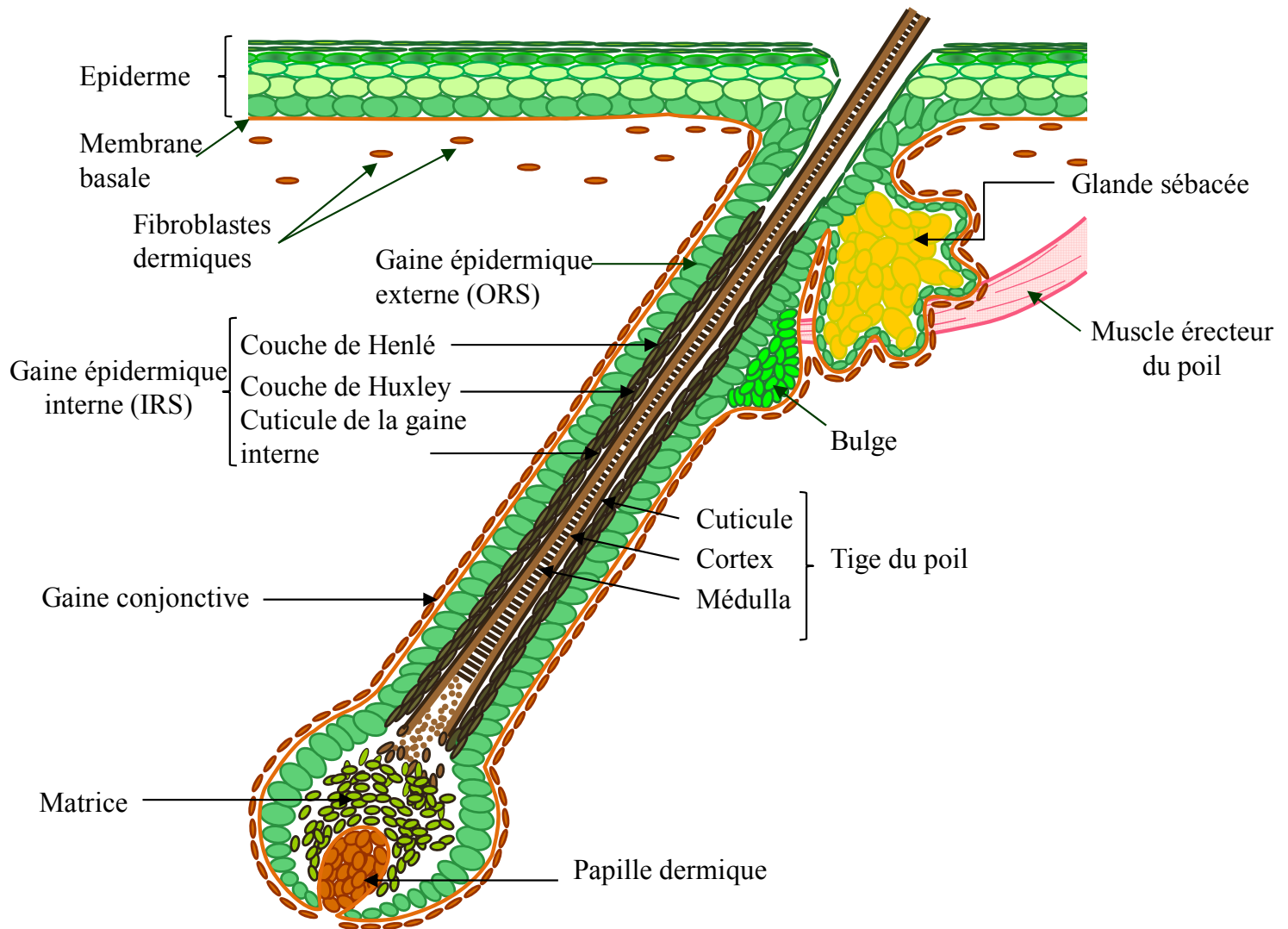
« MACROPATTERN »

« MICROPATTERN »



**Figure 3 : Macropattern et micropattern chez la souris et le poulet.**

A : Embryon de souris à E14.5 montrant les placodes des « guard » ainsi que les bourgeons de vibrisse (vb). B : Coupe histologique tangentielle de la peau dorsale d'un embryon de souris de 16 jours montrant le détail des triades (t) formées par un guard et 2 awls (aw.). C : Embryon de poulet à E7.5, vue dorsale du corps, montrant les ptéryles dorsales (pd), de l'épaule (ep) et fémorale (fe). D : Détail du dos à E7 montrant les 3 premières rangées de placodes en quinconce produisant un micropattern hexagonal.



**Figure 4 : Structure d'un follicule pileux mature.**

Le follicule est composé de sept couches concentriques. La composante épithéliale la plus externe du follicule est la gaine épidermique externe (ORS-Outer Root Sheath) qui est en continuité avec la couche basale de l'épiderme interfolliculaire. La gaine épidermique interne (IRS-Inner Root Sheath) composée de trois couches (la couche de Henlé, la couche de Huxley et la cuticule de la gaine interne) entoure la tige du poil, elle-même constituée d'une cuticule, d'un cortex pileux et d'une médulla. Le renflement présent dans la gaine folliculaire externe au niveau de l'insertion du muscle érecteur du poil et en dessous de la glande sébacée est le bulge, réservoir des cellules souches. La papille dermique est en contact avec les cellules de la matrice du poil. *Iconographie : E. Collomb*

partie proximale du follicule pileux va disparaître par apoptose et se reformer de façon cyclique.

La structure histologique du follicule pileux est complexe et constituée de deux compartiments : épithélial et mésenchymateux. D'origine dermique, la gaine conjonctive entoure l'extérieur du follicule pileux et se prolonge à la base du follicule par la papille dermique. Le compartiment épithélial du follicule pileux est composé de sept couches concentriques. La gaine épidermique externe (ORS-Outer Root Sheath) est en continuité avec l'assise basale de l'épiderme interfolliculaire. Plus centrale, la gaine épidermique interne (IRS-Inner Root Sheath) est composée des trois couches cellulaires que sont la couche de Henlé, la couche de Huxley et la cuticule de la gaine interne. Cette gaine entoure la tige du poil constituée d'une cuticule, d'un cortex pileux et d'une médulla. À la base du follicule et entourant la papille dermique se trouve la matrice pileuse, siège de l'activité mitotique. Lors de la phase de croissance ou anagène du cycle pileux, cette matrice produit, avec des programmes de différenciation spécifiques, les couches concentriques de la tige et de l'IRS. En plus des structures décrites pour le poil du pelage, le follicule de vibrisse comporte certaines caractéristiques propres à sa fonction de senseur de l'environnement : une innervation et une vascularisation conséquentes.

Le renouvellement du follicule se déroule au cours de cycles de croissance qui comprennent trois phases successives (Stenn and Paus, 2001). Au cours de la première phase dite de croissance, la phase anagène, le poil croît de façon continue et est caractérisé par une intense activité mitotique dans le bulbe. Cette phase de croissance active est suivie d'une phase de transition, la phase catagène qui est caractérisée par la régression du follicule pileux. La partie proximale entre en mort cellulaire programmée jusqu'à ce que la papille dermique qui accompagne le raccourcissement du bulbe soit au niveau du bulge. La phase de repos, période pendant laquelle la matrice est inactive et le follicule s'atrophie, est appelée phase télogène. Après la phase de repos, la matrice se réactive et forme un nouveau poil qui remplacera celui qui est tombé ou qui le délogera s'il est encore présent. Au moment où le poil entre dans un nouveau cycle de croissance, les cellules souches épithéliales du follicule sont stimulées afin qu'elles se divisent grâce à un signal provenant de la papille dermique (Fuchs et al., 2001). La première phase catagène débute chez la souris dans la région de la tête lors de la troisième semaine postnatale.

#### 2.1.2.2. Le follicule plumaire

Chez les oiseaux, le corps est délimité en champs cutanés bien organisés les uns par rapport aux autres (Fig. 3) et caractérisés par la présence ou l'absence d'un ou plusieurs annexes cutanées spécifiques. Les ptéryles ou zones ptilogènes (plumaires), dont la plus grande est la ptéryle dorsale, sont séparées les unes des autres par les semi-aptéries et les aptéries (zones comportant peu ou pas de plumes). Les zones lépidogènes (à écailles) sont localisées sur la partie distale des pattes. Au sein des ptéryles, les follicules plumaires s'organisent les uns par rapport aux autres. Chez le poulet, l'apparition des plumes au sein de la ptéryle dorsale se fait par rangées successives de façon symétrique et en quinconce de part et d'autre d'une rangée initiale qui se forme au-dessus du tube neural (Mayerson and Fallon,

1985). Chaque plume est ainsi entourée de six autres plumes, l'ensemble formant un motif hexagonal (Linsenmayer, 1972; Novel, 1973). Ce « micropattern » hexagonal se retrouve dans toutes les ptéryles du corps du poulet.

La **plume** est l'annexe cutanée kératinisée la plus complexe qui existe (Fig. 12). Elle se compose d'un axe central, creux à sa base, le calamus ancré dans l'épiderme, et plein dans sa partie principale, le rachis. Le rachis porte des barbes insérées en deux séries de part et d'autre de l'axe dans un seul plan et qui sont pourvus de barbules perpendiculaires munis d'innombrables crochets minuscules, les barbicelles. La base inférieure du rachis peut comporter une plume secondaire, appelée hyporachis (Lucas and Stettenheim, 1972). On distingue plusieurs types de plumes : les pennes, plumes les plus longues des ailes (appelées rémiges) et de la queue (appelées rétrices); les tectrices, plumes courtes de couverture qui forme entre autres le duvet dont les barbes ne sont pas enchevêtrées; et enfin les plumes sensibles (les filoplumes et les plumes sétiformes) qui sont des récepteurs sensoriels chez les oiseaux comme les poils de vibrisse le sont pour les mammifères.

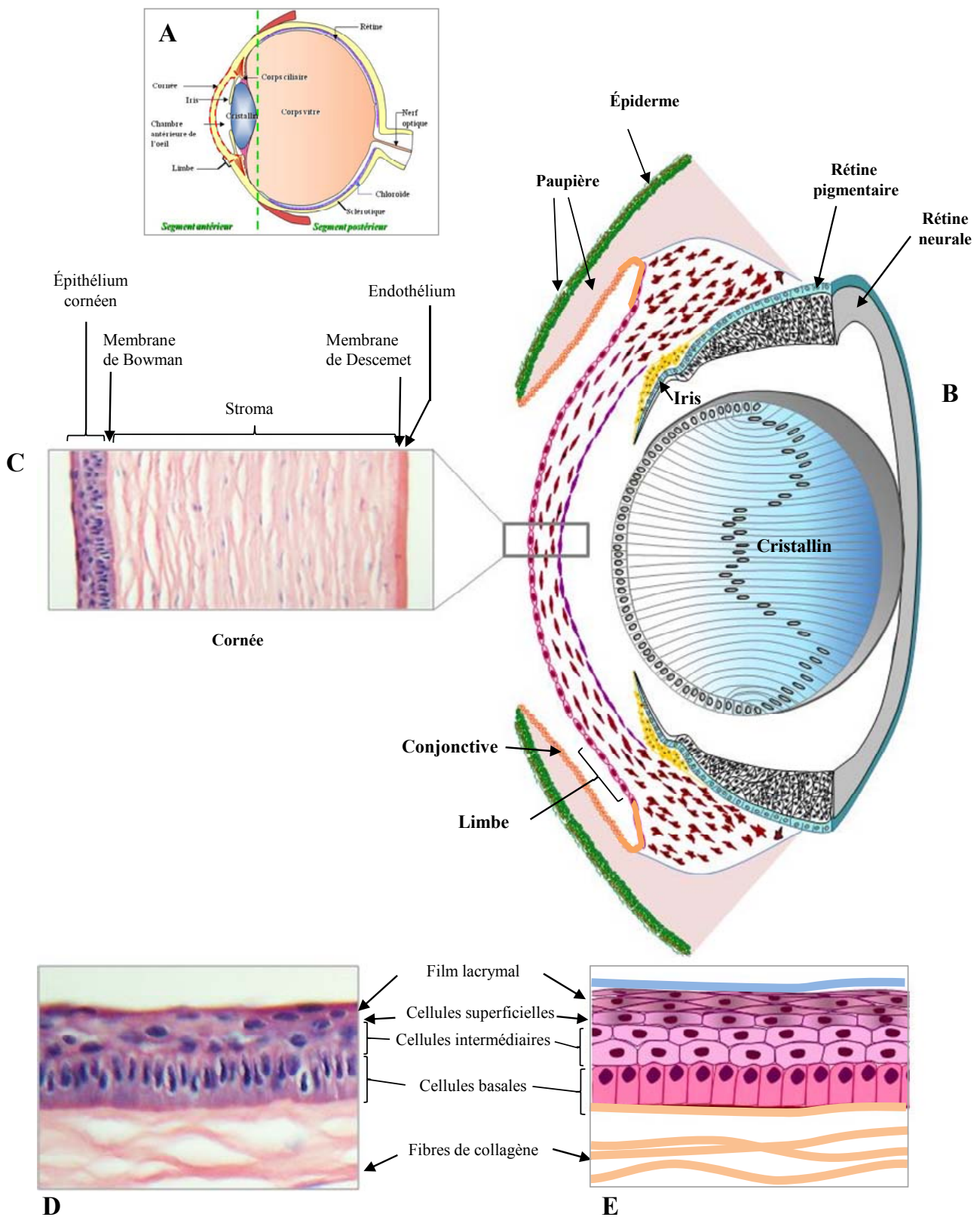
Le renouvellement des plumes est périodique et s'effectue lors des périodes de mue. La plume ancienne se décolle de sa gaine et tombe. Elle est remplacée par une nouvelle plume qui peut pousser en s'engageant dans le calamus de l'ancienne plume. La formation d'une plume résulte de la reprise d'activité de la papille plumaire mise en place lors de l'embryogenèse, qui comme lors du cycle du poil chez les mammifères, rentre en contact avec la partie pérenne du follicule plumaire, contenant les cellules souches (Yue et al., 2005). Le déterminisme de la mue est complexe et n'est pas encore élucidé. La description de la formation des follicules pileux et plumaires au cours de l'embryogenèse se fera dans le paragraphe 4.2.

## 2.2. LA CORNÉE

L'**œil** est l'organe de la vision grâce à la présence de photorécepteurs rétiniens. Pour atteindre la rétine, les rayons lumineux doivent traverser les milieux transparents formant le segment antérieur de l'œil ; ce sont successivement: la cornée, l'humeur aqueuse, le cristallin et le corps vitré (Fig. 5A). L'ajustement de la formation de l'image sur la rétine est réalisé par le jeu du diaphragme irien (dont l'ouverture va s'accommoder au flux lumineux) et du cristallin (dont la courbure va permettre de focaliser les rayons lumineux sur la rétine). L'ensemble du globe oculaire est limité par une coque de tissu conjonctif fibreux, dense, opaque et vascularisé : la sclérotique. Elle est ouverte en avant au niveau de la cornée, avec laquelle elle se continue, et prolongée en arrière par la dure-mère du nerf optique.

La cornée est la membrane transparente, orientée, avasculaire, située dans la partie antérieure de l'œil. Pour remplir sa fonction optique, elle doit rester humide en permanence, elle est donc recouverte de larmes alimentées en continu par les glandes lacrymales qui sont réparties par les battements des paupières. De plus, ce film lacrymal renferme une grande variété de substances favorisant la croissance cellulaire (Nishida and Tanaka, 1996). Tout comme la peau, la cornée est un organe épithélio-mésenchymateux. Elle se divise en cinq





**Figure 5 : Morphologie de l'œil et de la cornée.**

A. Schéma représentant les différents composants de l'œil. B. Schéma de la région antérieure de l'œil montrant la localisation de la cornée (C) par rapport au cristallin et aux paupières. D et E: photographie et schéma de l'épithélium cornéen. *Iconographie : E. Collomb*

couches distinctes : l'épithélium, la membrane de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium.

L'**épithélium cornéen** représente seulement 10% de l'épaisseur totale de la cornée mais son rôle est fondamental. Toute atteinte traumatique ou génétique conduit à l'opacité cornéenne et à la perte de la vision. On distingue l'épithélium de la cornée centrale de l'épithélium limbique, situé à la périphérie (Fig. 5, B-C). Le limbe est la zone de transition entre la cornée centrale et la conjonctive. Il est communément considéré comme le réservoir des cellules souches épithéliales de la cornée, bien que d'autres théories soient émises. L'épithélium cornéen central comporte cinq à huit couches cellulaires alors que l'épithélium limbique en comporte davantage. Tous les deux sont des épithélia stratifiés et squameux mais non-kératinisés (Kinoshita et al., 2001). Au sein de l'épithélium cornéen central, trois assises cellulaires sont distinguables en fonction de leur morphologie (Fig. 5, D-E).

Les cellules basales sont des cellules cuboïdales ancrées sur une mince lame basale par des hémi-desmosomes. Cette lame basale est un enchevêtrement constitué principalement de collagène de type IV, de laminine, et de fibronectine (Timpl 1996; Tuori, Uusitalo et al. 1996; Lu, Reinach et al. 2001). L'épithélium cornéen, comme l'épiderme, est un tissu en continuel renouvellement qui fait intervenir des phénomènes, de division et de migration, cellulaires qui seront détaillés par la suite (paragraphe 3.4). Comme l'assise basale de l'épiderme, les cellules basales de l'épithélium cornéen expriment la paire de kératines 5 et 14. En contraste avec l'épiderme, dont les cellules basales n'expriment pas les kératines de différenciation (K1, K2 et K10), les cellules basales cornéennes expriment une paire qui constitue un marqueur de différenciation épithéliale de type cornéen, constituée de la kératine 3 (K3) et la kératine 12 (K12) (Chaloin-Dufau et al., 1990; Kinoshita et al., 1983; Sun et al., 1985). Au niveau de la cornée, seules les cellules basales de l'épithélium limbique n'expriment pas la paire de kératines 3 et 12, mais expriment uniquement les kératines 5 et 14. Bien que présente chez tous les autres vertébrés étudiés, notamment l'homme, le lapin et le poulet, la kératine 3 n'existe pas chez la souris (Chaloin-Dufau et al., 1993).

Les cellules ailées font la transition entre les cellules basales et superficielles. Elles sont plus aplaties et ont une forme courbée caractéristique qui leur a valu ce nom. Les cellules ailées sont étroitement connectées entre elles par des desmosomes et des jonctions lacunaires (gap junctions). Elles continuent à exprimer la paire de kératines 3 et 12 tout au long de leur différenciation.

Les cellules de la couche superficielle ou cellules squameuses sont beaucoup plus aplaties et plus denses. Ces cellules hautement différenciées perdent progressivement leurs différentes organelles. Elles présentent à leur surface des «formations digitées» qui permettent une bonne adhérence du film lacrymal. Les cellules superficielles subissent une desquamation après leur mort pendant laquelle les desmosomes sont rompus. Leur desquamation crée des dépressions, à la surface de l'épithélium, que les larmes doivent combler. Les cellules superficielles qui meurent sont remplacées par les cellules des couches sous-jacentes.

L'épithélium cornéen et la membrane basilaire reposent sur une mince membrane, la **membrane de Bowman**. Cette membrane n'est pas une membrane basale typique, mais une

couche de plusieurs fibrilles désorganisées de collagène de type V, VI, VII ainsi que le collagène IV, principal constituant des membranes basales (Linsenmayer et al., 1998). Très développée chez les primates, elle est absente ou peu développée chez les autres espèces. Elle n'est pas régénérée après une blessure.

Le **stroma cornéen**, situé entre l'épithélium et l'endothélium, constitue environ 90% de l'épaisseur de la cornée. Il se compose majoritairement de collagène de type I et de type V (Linsenmayer et al., 1998). Les fibres de collagène sont alignées en lamelles au sein desquelles les microfibrilles de collagène sont toutes parallèles entre elles et chaque lamelle est empilée sur la suivante de façon perpendiculaire (Hay, 1980). Cet arrangement régulier et uniformément espacé des lamelles de collagène, maintenues par des protéoglycanes, permet une bonne transparence de la cornée, ainsi qu'une résistance mécanique à la pression intraoculaire.

Les kératocytes, qui sont les fibroblastes issus de la migration des cellules des crêtes neurales présentes dans le stroma, sont éparpillés entre les lamelles de collagène (Hay et al., 1979). Malgré la faible densité cellulaire des kératocytes dans le stroma, ils forment un réseau complexe connecté par des extensions cytoplasmiques (Nishida et al., 1988; Jester et al., 1994). Ils sont normalement quiescents et synthétisent le collagène à un taux très lent. En cas de blessure du stroma, les kératocytes quiescents sont activés en fibroblastes qui synthétisent alors une nouvelle matrice extracellulaire, mais de composition différente et non organisée. Afin de permettre une contractilité de la plaie, les fibroblastes peuvent, à leur tour, se différencier en myofibroblastes. Cependant, cette transformation est irréversible. Tous ces facteurs contribuent à la formation de cicatrices opaques, fréquentes dans des cas de blessures au stroma (Fini, 1999).

La **membrane de Descemet** est une couche acellulaire qui sert de membrane basilaire aux cellules endothéliales qui la synthétisent. Elle est principalement composée de fibrilles de collagène de type IV, de fibronectine et de laminine. Avec l'âge, elle peut perdre son apparence homogène au profit d'une apparence plus fibreuse et amener différentes anomalies visuelles (Kurpakus-Wheater et al., 2001).

L'**endothélium cornéen**, pavimenteux simple, est la couche la plus postérieure de la cornée, c'est une couche fragile et en contact direct avec l'humeur aqueuse (Imanishi et al., 2000; Kurpakus-Wheater et al., 2001). Le nom d'endothélium est dû à l'aspect morphologique de ses cellules, mais fonctionnellement, il se rapproche beaucoup plus des couches cellulaires tapissant les cavités internes de l'organisme que d'un véritable endothélium. Ses cellules contiennent les kératines 8 et 18. La fonction de cet endothélium est de maintenir le taux d'hydratation du stroma cornéen et par conséquent, sa transparence. En effet, le niveau d'hydratation de la cornée maintient la distance entre les fibres de collagène, constante. En absence d'endothélium, l'eau présente dans l'humeur aqueuse s'infiltrerait dans la cornée provoquant un œdème du stroma (Joyce, 2005). Une trop faible densité cellulaire au niveau de l'endothélium, comme dans la dystrophie de Fuchs, donne le même résultat. Une fois l'organogenèse de l'œil achevée, l'endothélium reste en place durant toute la vie de l'individu. Ses cellules ne sont en effet pas renouvelées.



**La cornée et le cristallin** sont deux organes qui permettent la réfraction de la lumière dans l'œil. Leur pouvoir réfractif et leur transparence sont dus à leur composition et à leur arrangement cellulaire particulier. En effet, alors qu'au niveau du stroma cornéen, l'organisation très régulière des fibres de collagène contribue à ses propriétés optiques; au niveau du cristallin, ce sont les fibres du cristallin tassées les unes contre les autres qui sont des cellules différenciées ayant perdues leurs organites, y compris le noyau. Le cytoplasme cristallin est constitué d'une solution protéique extrêmement concentrée de protéines globulaires spécifiques appelées les **cristallines** (Cross and Mercer, 1995) (Tableau 2). Elles se présentent, en microscopie électronique, sous forme de microfilaments. Chez les vertébrés, il en existe trois classes principales : alpha, bêta et gamma, certaines étant présentes dans d'autres tissus. Leur importance dans le cristallin vient du gel optiquement très homogène qu'elles forment et qui assure la totale transparence de cet organe. Leur concentration élevée confère au cytoplasme un indice de réfraction quasi identique à celui de la membrane cellulaire. Cet indice est par ailleurs supérieur à celui de l'eau, ce qui permet au cristallin de focaliser les rayons lumineux sur la rétine. Parallèlement à ce rôle structural, les cristallines assurent également une fonction essentielle de stabilisation de la structure des autres protéines. Les  $\alpha$  et les  $\beta$  cristallines sont en effet des protéines dites «chaperonnes». En se liant à des protéines déstructurées, elles leur redonnent leur structure tridimensionnelle d'origine, et évitent ainsi qu'elles ne précipitent et opacifient le cristallin. Ces protéines particulières ne sont pas spécifiques du cristallin. Pour qu'une protéine soit une cristalline, elle doit être produite en grande quantité sans s'agréger, être résistante et être transparente, c'est à dire avoir un indice de réfraction inférieur à celui de la lumière (Delaye and Tardieu, 1983). La cornée (cellules épithéliales et kératocytes) exprime abondamment des enzymes cytosoliques qui ont été classées comme **cristallines cornéennes**. Bien que la fonction exacte des cristallines de la cornée reste à préciser, elles jouent un rôle dans le développement et / ou le maintien de la transparence des tissus grâce à leurs effets sur la diffusion de lumière et de l'absorption. Contrairement à la fonction de chaperonne des principales cristallines présentes dans le cristallin, les cristallines cornéennes sont principalement des enzymes, qui jouent des rôles métaboliques dans l'atténuation des effets du stress oxydatif et de la lumière UV. Parmi les plus abondamment exprimés, l'aldéhyde déshydrogénase classe 3 (ALDH3A1) représente de 20% à 40% des protéines solubles dans l'eau extraite de la cornée bovine. Les autres cristallines cornéennes identifiées comprennent principalement la transkétolase (TKT) chez la souris, le lapin et l'homme ; l'aldéhyde déshydrogénase 1A1 (ALDH1A1) chez le lapin; l' $\alpha$ -énolase chez l'homme, la souris et le poulet et l'argininosuccinate dans la cornée de poulet. La prédominance de l'expression de TKT et des ALDH1A1/3A1 dans les cornées des mammifères contraste avec leur absence chez d'autres espèces, comme le poulet et le poisson, suggérant des profils d'expression taxon-spécifiques (pour revue: (Jester, 2008).

**En résumé**, plusieurs facteurs rendent compte de la **transparence** de la cornée et sont importants pour le maintien de sa fonctionnalité. La régularité et la finesse de l'épithélium antérieur non kératinisé (i.e. ne comprenant pas de couche cornée) est primordial ainsi que

LES CRISTALLINES DU CRISTALLIN		
Vertébrés		
$\alpha$ A	Molécule chaperonne	Tous les vertébrés
$\alpha$ B	Petite protéine hsp (heat shock protein)	Tous les vertébrés
$\beta\gamma$	(Protéine S; spheruline 3A; EDSP; AIM1)	Tous les vertébrés
$\varepsilon$	Lactate déhydrogénase B	Canards, crocodiles
$\delta$ 1	(Argininosuccinate lyase)	Oiseaux, reptiles
$\delta$ 2	Argininosuccinate lyase	Oiseaux, reptiles
$\tau$	$\alpha$ -enolase	Tortues, canards autres
$\zeta$	NADPH: quinone reductase	Cochons d'Inde, lamas, autres
$\mu$	(Ornithine cyclodéaminase)	Marsupiaux d'Australie
$\eta$	Retinaldéhyde déhydrogénase	Musaraignes-éléphant
$\rho$	(Aldo-keto-réductases)	Grenouilles
$\rho$ B	(Aldo-réductase)	Grenouilles
$\lambda$	(Hydroxyl CoA déhydrogénase)	Lapins, lièvres
$\pi$	(Glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase)	Geckos
Invertébrés		
SL11/Lops4	Glutathione S-transférase	Calmars, poulpes
S	(Glutathione S-transférase)	Céphalopodes
$\Omega$ /L	(Aldéhyde déhydrogénase)	Céphalopodes
J	(nouvelles protéines)	Méduses
LES CRISTALLINES DE LA CORNÉE		
Vertébrés		
Aldéhyde déhydrogénase Class 3		Mammifères
Aldéhyde déhydrogénase Class 1/2		Certains poissons
BCP 11/24		Bovins
Transketolase		Mammifères
$\alpha$ -enolase		Poulets
Peptidyl-propyl cis-trans isomérase (aussi connu comme cyclophiline)		Poulets
$\delta$ 1-cristalline		Poulets
Invertébrés		
S-cristallines		Calmars
Drosocristalline		Drosophiles

**Tableau 2 :** Liste des cristallines présentes dans le cristallin et dans la cornée.

Les références: Piatgorsky and Wistow, 1991; Wistow, 1995; Tomarev and Piatgorsky, 1996; Roll et al. 1995.

l'absence de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Après une plaie de la cornée, le développement d'une vascularisation est un mécanisme de défense qui a comme effet négatif majeur d'être responsable d'altérations de la transparence de la cornée. L'organisation très régulière du stroma cornéen et, en particulier, de ses microfibrilles de collagène est également essentielle pour maintenir la transparence de la cornée et est étroitement liée au maintien d'un taux d'hydratation constant par l'endothélium cornéen, de même que le bon état de l'endothélium. Toute perturbation ou dysfonctionnement d'un de ces tissus entraîne une opacité irréversible de la cornée conduisant à une perte de la vision. Parmi les traitements possibles, la thérapie cellulaire qui désigne la greffe de cellules visant à restaurer les fonctions d'un tissu lorsqu'elles sont altérées par un accident, une pathologie ou le vieillissement reste très prometteuse. Cette thérapie devrait bénéficier des avancées scientifiques sur les cellules souches. Un résumé des principales découvertes réalisées sur les cellules souches du tégument sont présentées dans le paragraphe suivant.

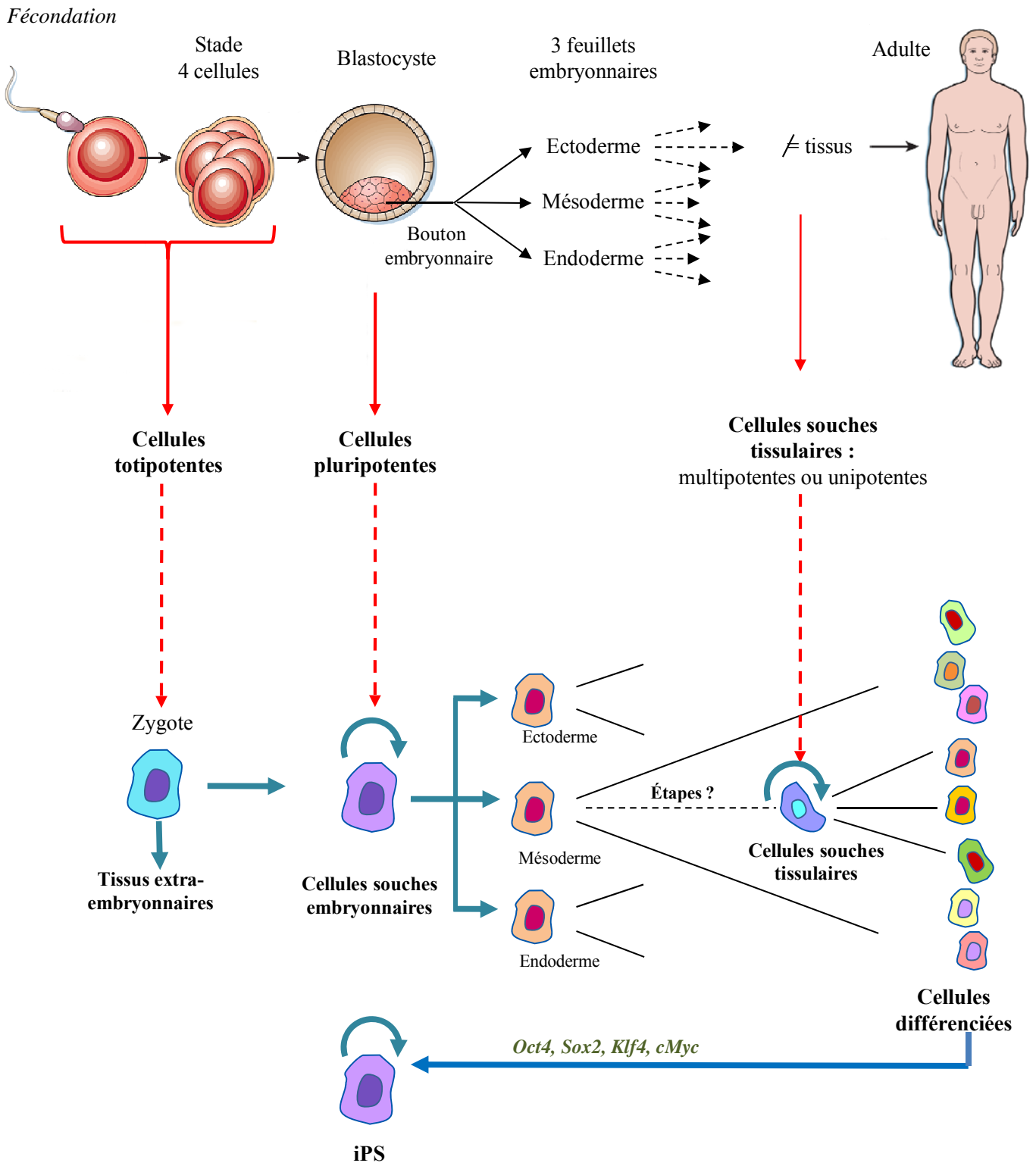
### **3. LES CELLULES SOUCHES DU TÉGUMENT**

La peau et la cornée sont des organes protecteurs directement en contact avec le milieu extérieur et donc soumis en continu à de nombreuses agressions. L'épiderme et l'épithélium cornéen qui forment la partie superficielle de ces organes nécessitent un constant et rapide renouvellement afin de conserver leur intégrité. Les cellules souches adultes de ces deux épithélia sont localisées dans des niches ou réservoirs. La mise en évidence et l'étude de ces cellules, de leur localisation et de leurs marqueurs ont été réalisées grâce à différentes techniques qui servent maintenant de référence. Ces sujets sont détaillés dans les paragraphes suivants.

#### **3.1. DÉFINITION ET CARACTÉRISTIQUES D'UNE CELLULE SOUCHE**

Les **cellules souches** partagent un ensemble de propriétés communes, que sont l'autorenouvellement et la capacité de donner naissance à une descendance cellulaire qui va se différencier (Lajtha, 1979).

On distingue les différentes cellules souches en fonction de leur capacité de différenciation (Fig. 6). Les seules cellules souches **totipotentes** sont celles qui constituent l'embryon jusqu'au stade huit cellules : elles sont les seules à pouvoir donner naissance à un organisme entier. Les cellules souches embryonnaires qui proviennent de la masse cellulaire interne du blastocyste ont la capacité de se différencier en cellules de n'importe lequel des trois feuilletts embryonnaires, y compris les cellules germinales. Elles sont dites **pluripotentes**. Cependant, elles ne sont plus capables à elles seules d'aboutir à la formation d'un organisme entier, elles ne peuvent pas donner les annexes embryonnaires. Cette pluripotentialité a été démontrée lors de la réimplantation de cellules souches embryonnaires cultivées *in vitro* dans un blastocyste hôte. Le suivi des cellules implantées exprimant un gène marqueur (LacZ ou GFP) montre que celles-ci participent à la formation des différents tissus du souriceau chimère, y compris la lignée germinale (Bradley et al., 1984). Implantées dans un blastocyste, elles intègrent et



**Figure 6 : Les différents types de cellules souches.**

Les cellules souches embryonnaires sont pluripotentes. À l'âge adulte, les cellules souches tissulaires, dont les étapes conduisant à leur mise en place restent à étudier, présentent une potentialité restreinte. Un nouveau type de cellule souche a fait récemment son apparition, les iPS, qui sont des cellules souches multipotentes générées par transfection génique à partir de cellules différenciées. *Iconographie : E. Collomb*

participent en étant partie prenante des différents jeux d'interactions cellulaires embryonnaires. Par contre, la greffe de cellules souches embryonnaires chez une souris adulte où elles ne vont pas subir ces interactions, produit un tératocarcinome. Cette tumeur renferme des tissus divers, souvent bien différenciés, mais organisés d'une manière anarchique, représentant les trois feuillets embryonnaires qui coexistent avec des cellules de type embryonnaire (Thomson et al., 1998).

Les cellules souches présentes dans l'organisme adulte sont **multipotentes** ou **unipotentes**, c'est-à-dire qu'elles sont capables de produire un ou plusieurs types cellulaires dérivés d'un même feuillet embryonnaire. Elles sont déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique. Des approches *in vivo* et *in vitro* ont abouti à des résultats contradictoires concernant la plasticité des cellules souches adultes, ne permettant pas toujours de savoir s'ils provenaient d'une transdifférenciation ou d'un phénomène de fusion cellulaire (Jang et al., 2004; Frisen, 2002). La transdifférenciation des cellules basales de l'épithélium cornéen (Pearson et al., 2005) sera abordée en détails dans le paragraphe 6.

Les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes, aux potentialités différentes, permettent d'envisager une utilisation dans une perspective de médecine régénératrice. Les cellules souches embryonnaires avec un potentiel régénératif très important et une capacité à se différencier dans tous les tissus de l'organisme, présentent le plus fort potentiel thérapeutique. Cependant, leur instabilité lorsqu'elles sont injectées dans un organisme adulte et qui conduit à leur transformation en cellules tumorales, le problème immunologique, ainsi que le problème éthique de l'obtention de ces cellules, rendent leur utilisation en thérapie difficile. Les cellules souches adultes, quant à elles, peuvent être obtenues sans porter préjudice ou nuire à l'intégrité physique de l'individu. Cependant, elles ont une potentialité beaucoup plus restreinte que les cellules souches embryonnaires. Les cellules souches adultes ont déjà fait l'objet de greffes autologues limitant ainsi les risques de rejet (Koc et al., 2000; Koc et al., 2002; Le Blanc et al., 2004).

Depuis 2006, une nouvelle catégorie de cellules souches est apparue, les **cellules iPS** ou cellules souches pluripotentes induites (*induced pluripotent stem cells*, iPS). Les cellules iPS sont des cellules adultes déprogrammées et présentant les caractéristiques et un potentiel similaires aux cellules souches embryonnaires. La déprogrammation de cellules adultes différenciées (fibroblastes) s'effectue par l'introduction de quatre gènes définis qui sont Sox2, Oct4, cMyc et Klf4 grâce à des rétrovirus (Wernig et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006). Ces cellules deviennent capables de s'autorenouveler indéfiniment et de se métamorphoser à la demande en toute autre cellule de l'organisme. Les cellules souches iPS pourraient donc constituer une révolution pour l'utilisation thérapeutique de cellules souches, permettant de s'affranchir des limites éthiques des cellules souches embryonnaires. Bien que prometteuse, cette méthode dont le potentiel est encore très théorique pose un problème sanitaire pour une application médicale par l'utilisation de rétrovirus et d'oncogènes. Cependant, l'intérêt des cellules iPS reste majeur, non seulement en raison de leur intérêt potentiel en thérapie cellulaire, mais aussi comme outils de criblage pharmacologique ou toxicologique, ou comme modèles de pathologies humaines. On peut en effet déprogrammer des cellules somatiques de patients atteints de maladies génétiques variées (Hanna et al., 2007; Ebert et al., 2009). Elles vont en particulier permettre de disséquer les mécanismes

génétiques et épigénétiques établissant l'état de pluripotence d'une cellule, et sa transition vers l'état différencié.

Si les cellules souches embryonnaires servent au développement de l'embryon, les cellules souches adultes ont une fonction de maintien physiologique et structural d'un tissu. Cette fonction est rendue possible par les capacités d'autorenouvellement et de différenciation des cellules souches adultes. Le maintien d'un tissu se fait par division asymétrique des cellules souches en une cellule fille qui garde le phénotype cellule souche et une autre cellule fille au phénotype d'amplification transitoire, appelée aussi cellule TA (*Transient Amplifying cells*). Ces cellules TA, aussi appelées, suivant leur stade, cellules progénitrices puis cellules précurseurs, possèdent des propriétés intermédiaires entre les cellules souches adultes et les cellules différenciées : elles ont un potentiel de division limité, une absence de capacité à l'autorenouvellement et donnent naissance progressivement aux cellules différenciées.

**Plusieurs techniques** basées sur leurs propriétés de faible division et d'autorenouvellement ont été mises en place afin d'identifier les cellules souches tissulaires (pour revue : (Alonso and Fuchs, 2003). L'expérience de « *pulse chase* » met en avant le cycle de division extrêmement lent des cellules souches et permet de localiser celles-ci dans un tissu. L'administration continue (*pulse*) d'analogues de nucléotides (comme le BrdU ou la thymidine tritiée) qui s'intègrent dans l'ADN en phase de réplication, permet de marquer l'ensemble des cellules ayant traversé la phase S du cycle cellulaire, y compris les cellules souches. Après une période d'attente (*chase*) plus ou moins longue après le sevrage en analogues de nucléotides, les cellules en phase active de prolifération auront perdu leur marquage par dilution et seules les cellules souches dont la division est plus lente, retiennent le marquage. Elles sont pour cette raison appelées LRC pour Label-Retaining-Cells (Bickenbach, 1981; Bickenbach and Mackenzie, 1984; Potten et al., 1974).

Dans le cadre des expériences *in vitro*, la clonogénicité des cellules souches est testée afin d'évaluer leur potentiel de prolifération, leur capacité d'autorenouvellement et leur potentiel de différenciation. D'autre part, les cellules souches peuvent être mises en évidence lors d'analyse en cytométrie en flux après un marquage au colorant Hoechst 33342 (Challen and Little, 2006). Les cellules souches expriment le transporteur ABCG2, une protéine transmembranaire, qui leur permet d'éliminer activement le colorant. Les cellules négatives pour ce marquage se regroupent sur le diagramme en une population séparée, éloignée du reste des autres cellules.

Une autre méthode consiste à marquer, par un rétrovirus porteur de la  $\beta$ -galactosidase par exemple, une population de cellules et de les utiliser pour reconstituer un tissu épidermique *in vivo*. Le tissu marqué est alors greffé à des souris et la peau nouvellement reconstituée va ensuite exprimer des gènes rapporteurs incorporés. Au final une colonne de cellules clonales apparaît exprimant le marqueur (Fig. 7). Il suffit ensuite de calculer la taille de la colonne en comparaison avec la taille du reste du tissu pour évaluer la quantité de cellules souches présentes dans l'assise basale et capables de générer une population clonale (Mackenzie, 1997).

Cependant, parmi **les techniques d'investigation des cellules souches**, nombreuses sont celles qui conduisent à **perturber** le système, comme par exemple le fait de les isoler de leur tissu et de les mettre en culture. **En effet, les cellules souches ne doivent pas être**

**considérées comme un type cellulaire mais, comme un état fonctionnel dont le maintien implique un environnement particulier.** Il est donc important d'interpréter les approches expérimentales en fonction du modèle qu'il représente, homéostatique ou cicatriciel.

L'étude des cellules souches est à présent facilitée par l'identification de marqueurs et leur utilisation dans l'isolation des cellules souches par une méthode puissante, la cytométrie en flux, comme nous le verrons par la suite (page 25).

La question de l'**origine des cellules souches adultes** ou cellules souches tissulaires reste en suspens (Fig. 6). Sont-elles définies comme cellules souches au cours de l'organogenèse ou leur ségrégation est-elle plus tardive? A l'inverse, présentent-elles une filiation directe avec les cellules souches embryonnaires? La mise en place du pool des cellules souches commence à être étudiée grâce à la découverte de leurs marqueurs dont on peut suivre l'expression au cours du développement. Ainsi dans le cas du follicule pileux, ces cellules sont ségréguées précocement au cours de son organogenèse (Nowak et al., 2008), plus précisément dans la couronne périphérique de la placode pileuse (Thèse Sébastien Cadau, notre équipe, Octobre 2010).

Les cellules souches adultes résident dans un micro environnement particulier appelé « **niche** » (Schofield, 1983). Ces niches sont situées dans des zones abritées des agressions extérieures les plus superficielles. De plus, dans cette niche, les cellules souches sont entourées de cellules de soutien et de facteurs solubles, et dans le cas des épithélia, d'une membrane basale. La proximité cellulaire favorise les interactions des cellules entre elles et avec la matrice extracellulaire. L'ensemble de ces différents facteurs permet le maintien de l'état de cellule souche en contrôlant la prolifération, la migration et la différenciation, donc le passage à l'état de cellule transiente.

### **3.2. LES CELLULES SOUCHES DE LA COMPOSANTE MÉSENCHYMATEUSE DE LA PEAU ET DE LA CORNÉE**

Contrairement aux cellules souches épithéliales du tégument, peu de choses sont connues sur les **cellules souches de la composante mésenchymateuse**, c'est-à-dire du derme, du stroma et de l'endothélium cornéens. Étant des compartiments cellulaires moins soumis aux agressions, leur renouvellement, plus lent voire inexistant, rend leur étude difficile.

Des travaux ont montré que la gaine conjonctive constitue un réservoir de cellules de la papille dermique lors du cycle du follicule pileux (Tobin et al., 2003). Il a été émis l'hypothèse que les cellules souches dermiques résideraient dans la gaine conjonctive de la même manière que le réservoir épithélial est dans la gaine folliculaire externe, comme cela sera décrit plus en détails par la suite (Ito et al., 2005). Les cellules dermiques de la gaine conjonctive partagent les mêmes caractéristiques que celles de la papille dermique et sont capables d'en régénérer une nouvelle en absence de celle-ci (Horne and Jahoda, 1992; Reynolds et al., 1999; McElwee et al., 2003). Chez le rat, l'ablation de la partie basse du follicule pileux de vibrisse conduit à la régénération de la papille dermique vraisemblablement à partir des cellules dermiques de la gaine. Cependant, cette régénération n'a pas lieu lorsque l'ablation comprend le renflement (Oliver, 1966) où nous savons à

présent qu'est localisé le réservoir des cellules souches épithéliales. Cette étude suggère une éventuelle localisation, au même niveau du follicule pileux, de part et d'autre de la membrane basale, des cellules souches dermiques dans la gaine conjonctive et des cellules souches épithéliales dans la gaine épithéliale externe.

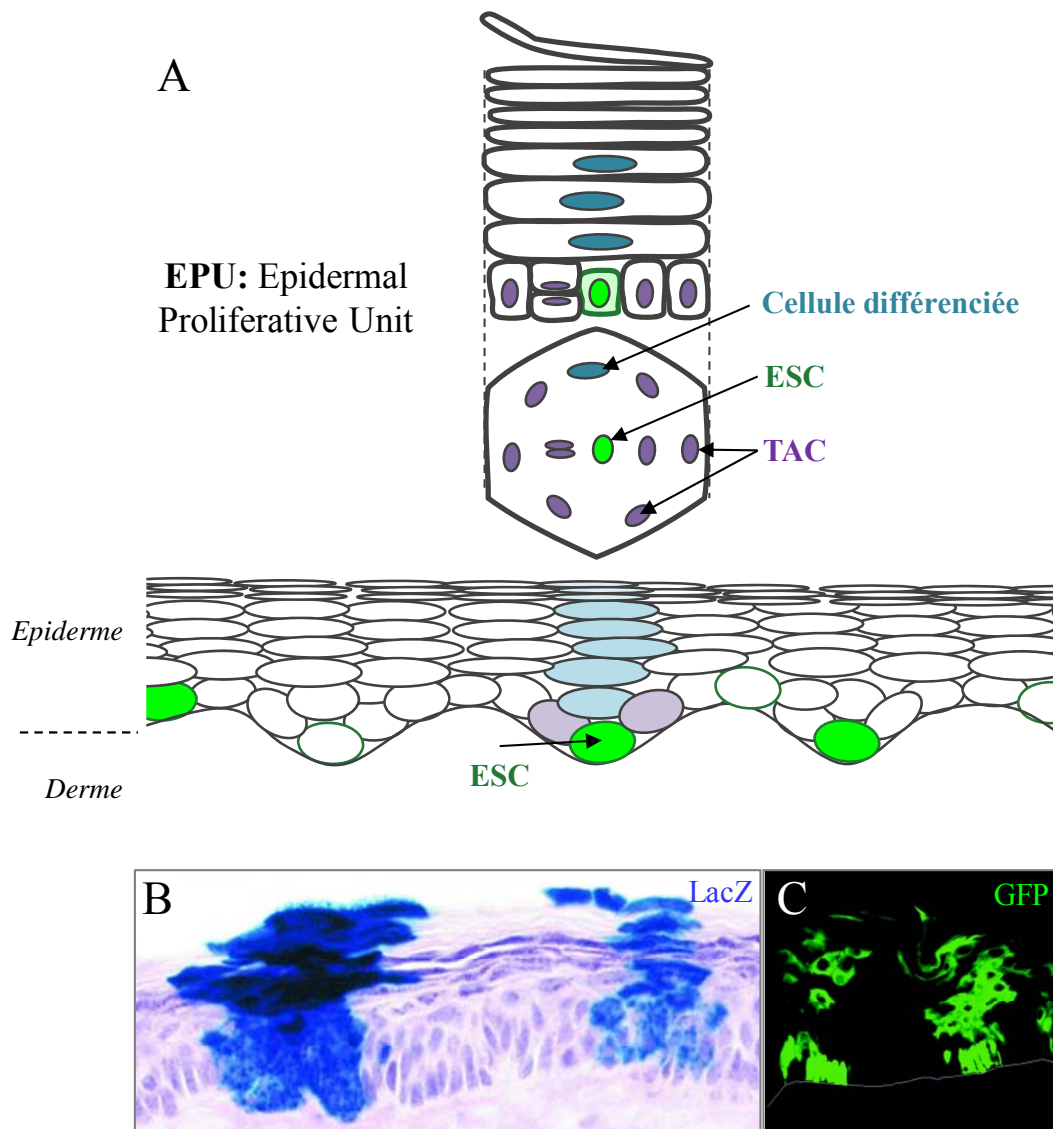
En ce qui concerne la composante mésenchymateuse de la cornée, la présence de cellules souches stromales et endothéliales reste incertaine. Des études récentes indiqueraient cependant leur présence. En 2005, différents groupes ont isolé et identifié des cellules souches stromales à partir de cornée murine, bovine ou humaine, par l'expression de marqueurs de cellules souches comme le transporteur ABCG2 (ATP-binding cassette sub-family G member 2) et par leur capacité à former des colonies dont les cellules différenciées expriment des marqueurs kératocytaires, chondrogéniques et neurogéniques (Funderburgh et al., 2005; Yoshida et al., 2005; Du et al., 2005). Bien que les cellules endothéliales humaines soient capables de croître en culture, on pensait que les cellules endothéliales *in vivo* n'étaient plus capables de se diviser après l'âge de 20 ans (Engelmann et al., 1988). Cependant, l'incorporation de BrdU se produit dans les cellules endothéliales cornéennes périphériques, indiquant une activité mitotique avec une augmentation du nombre de cellules incorporant le BrdU en cas de blessure (Whikehart et al., 2005). De plus, des cellules endothéliales isolées dans la périphérie montrent une plus grande capacité à former des colonies comparées aux cellules centrales et expriment des marqueurs de cellules souches puis des marqueurs de différenciation après blessure (Amano et al., 2006; McGowan et al., 2007). Bien que des cellules souches stromales et endothéliales ont donc été mises en évidence, principalement à la périphérie de la cornée, peu de choses restent cependant connues sur le comportement de ces cellules en conditions physiologiques ou pathologiques. De même, les facteurs qui empêchent *in vivo* la prolifération des cellules endothéliales ne sont pas encore totalement établis, bien que l'inhibition de contact et le facteur diffusible TGF $\beta$ -2 semblent jouer un rôle (Joyce et al., 2002). Les cellules souches stromales et endothéliales seraient des outils potentiels pour l'ingénierie tissulaire dans le cadre des thérapies régénératives des ulcères de la cornée ou suite à la perte des cellules endothéliales, ou encore pour réaliser des cornées artificielles.

### **3.3. LES CELLULES SOUCHES ÉPIDERMIQUES ET FOLLICULAIRES**

#### **3.3.1. Leur localisation**

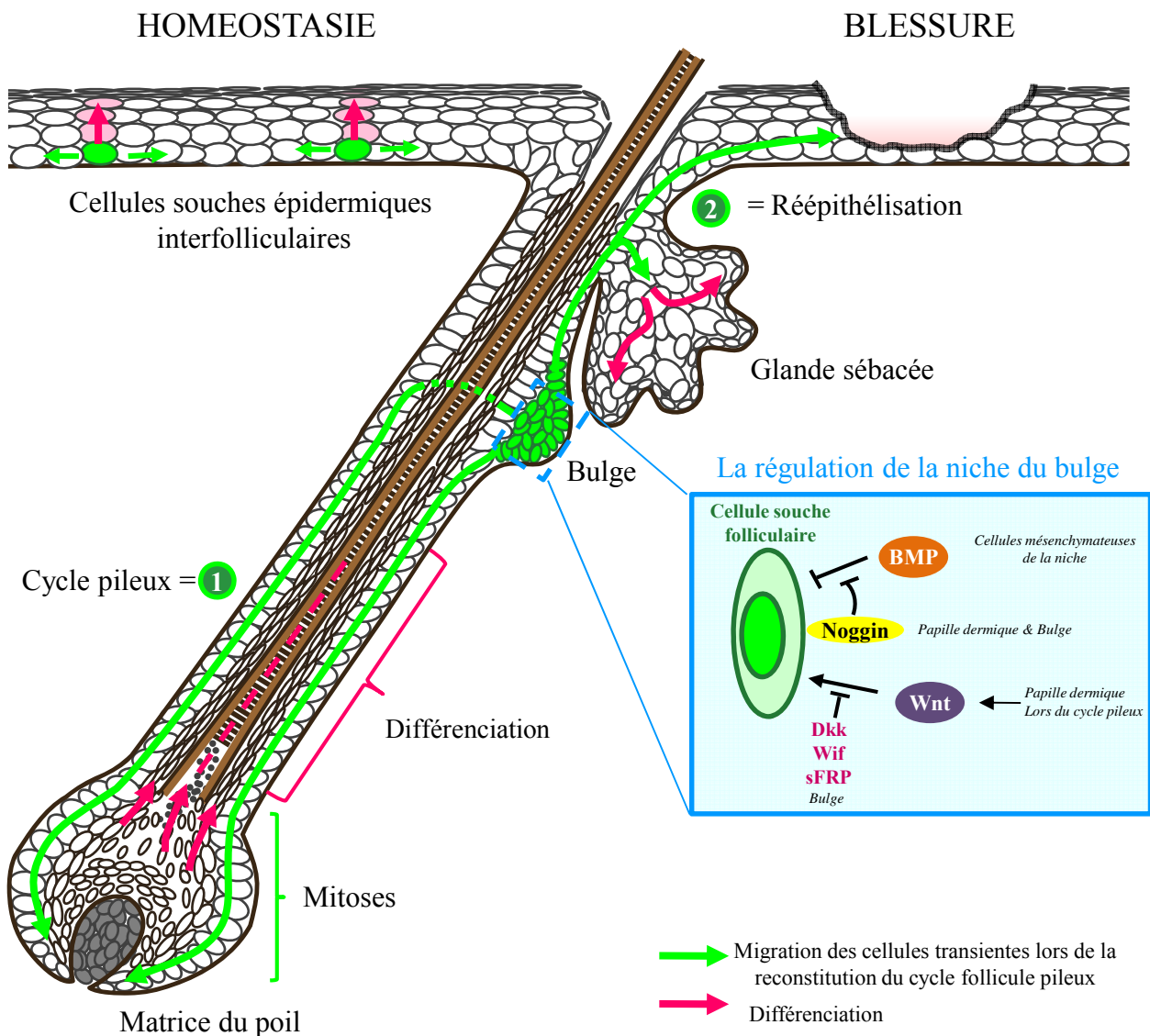
L'existence des cellules souches épidermiques dans l'assise basale de l'épiderme interfolliculaire a été démontrée dès les années 70 (Potten, 1974; Potten and Hendry, 1973) (Fig. 7). Des expériences de marquage à la thymidine tritiée ont mis en évidence de rares cellules quiescentes parmi les cellules basales (Potten, 1981; Potten et al., 1982). Elles se localisent principalement en profondeur des crêtes épidermiques (Ghazizadeh and Taichman, 2005). L'observation histologique des structures hexagonales dans la couche basale des épidermes fins, notamment la peau des oreilles et du dos de souris, a conduit à l'hypothèse des unités prolifératives épidermiques ou EPU (*Epidermal Proliferative Units*) par Potten. Ces structures sont constituées d'une dizaine de cellules basales correspondant à une cellule souche entourée de sa progéniture directe, les cellules transientes ou TA (Potten and Morris, 1988). Surplombant ce regroupement de cellules, s'en suit l'empilement hexagonal de la





**Figure 7 : Les cellules souches épidermiques interfolliculaires.**

(A) L'homéostasie de l'épiderme interfolliculaire est maintenue grâce à la présence au niveau de la couche basale de l'épiderme de cellules souches, principalement au creux de crêtes épidermiques. Le renouvellement de l'épiderme repose sur l'hypothèse des unités de prolifération épidermique (EPU) formulée par Potten (1974), contenant une cellule souche, ESC (Epidermal Stem Cell) (en vert) et sa progéniture: les cellules transientes, TAC (en violet) et les cellules différenciées (en bleu). La mise en évidence des EPU se fait par traçage de lignage cellulaire après injection d'un rétrovirus recombinant contenant (B) soit le gène bactérien LacZ dans l'épiderme interfolliculaire de souris (Mackenzie, 1997, Ghazizadeh and Taichman, 2001), (C) soit le gène codant pour la GFP dans l'épiderme interfolliculaire humain (Ghazizadeh and Taichman, 2005). *Iconographie : E. Collomb*



**Figure 8 : Les rôles des cellules souches épidermiques interfolliculaires et des cellules du bulge (modifié d'après Cotsarelis, 2006 et d'après Li and Xie, 2005).**

Alors que les cellules souches épidermiques interfolliculaires assurent le renouvellement continu de l'épiderme en situation physiologique, les cellules du bulge sont sollicitées à chaque cycle pileux pour donner naissance à un nouveau follicule pileux (1). En cas de blessure, les cellules du bulge constituant un réservoir migrent et régénèrent l'épiderme lésé (2). Les cellules folliculaires sont ensuite remplacées par les cellules souches épidermiques au niveau de la blessure. Ces cellules sont également capables de donner naissance aux cellules de la glande sébacée. La zone de renflement est un environnement qui limite la croissance et la différenciation cellulaires des cellules souches folliculaires en exprimant des inhibiteurs de Wnt (Dkk, Wif, et sFRP) ainsi que BMP. Pendant la phase anagène précoce, les Wnts de la papille dermique ainsi que Noggin (issu de la papille dermique et du renflement) vont se coordonner pour surmonter les restrictions imposées, ce qui conduit à l'activation des cellules souches et la régénération du follicule pileux. *Iconographie : E. Collomb*

progéniture de kératinocytes différenciés, organisée en colonnes distinctes. La présence d'une seule cellule souche au sein de chaque EPU a été mise en évidence par des expériences de traçage de lignées cellulaires (Fig. 7) (Mackenzie, 1997; Ghazizadeh and Taichman, 2001; 2005). Elles sont responsables du maintien continu de l'homéostasie épidermique en situation physiologique. Malgré une potentialité qui semble restreinte des cellules souches kératinocytaires, le contact de l'épiderme interfolliculaire avec une papille dermique est capable d'induire la formation d'une structure de type folliculaire (Reynolds and Jahoda, 1992).

Dans les années 90, l'existence d'une population de cellules souches a été mise en évidence au niveau du follicule pileux (Cotsarelis et al., 1990; Morris and Potten, 1994). Les cellules souches folliculaires sont situées dans une niche privilégiée, le bulge, région renflée de la gaine épithéliale externe située sous la glande sébacée. En situation physiologique, elles donnent naissance à une population de cellules transientes qui renouvellent le poil en régénérant sa matrice lors du cycle pileux, participant ainsi à la formation de tous les compartiments épithéliaux du follicule pileux. En cas de blessure, elles sont également capables de coloniser et participer à la formation des glandes sébacées et l'épiderme interfolliculaire. La transplantation des cellules de bulge exprimant le marqueur de la  $\beta$ -galactosidase, au niveau de la région du bulge de souris receveuses, montre la colonisation par ces cellules de tous les compartiments épithéliaux, y compris les glandes sébacées et l'épiderme interfolliculaire (Oshima et al., 2001) (Fig. 8). Ces travaux de l'équipe de Y. Barrandon ont non seulement mis en évidence le fort potentiel clonogénique et donc d'autorenouvellement des cellules issues du bulge, mais également leur multipotence, constituant ainsi un réservoir essentiel en cas d'atteintes profondes de l'épiderme interfolliculaire.

Chez le poulet, la localisation des cellules souches épithéliales de la plume a été réalisée par l'équipe de Chuong, en utilisant des approches de rétention du marquage afin de mettre en évidence les LRCs, ainsi que des approches de transplantation et de traçage cellulaire par l'utilisation de DiI (Yue et al., 2005). Les LRCs sont enrichies dans une niche au niveau du collier appelée le bulge du collier, située dans la partie médiane de la gaine folliculaire. La transplantation de LRCs issues de plumes de caille dans des embryons de poulet a démontré leur multipotentialité en participant au bourgeon plumaire, à la formation des barbes et des barbules, ainsi qu'à l'épiderme interfolliculaire.

### **3.3.2. Les marqueurs moléculaires potentiels**

L'inventaire des marqueurs moléculaires qui caractérisent les cellules souches de la couche basale de l'épiderme et du bulge a été facilité par une technique puissante, la cytométrie en flux. La caractérisation des cellules souches s'effectue grâce à deux catégories de marqueurs: les marqueurs positifs et les marqueurs négatifs. Les cellules souches épidermiques et folliculaires n'expriment pas les marqueurs de différenciation terminale que sont les kératines K1, K10 et K2. Elles expriment les kératines K14, K15 et K5. Les cellules souches épidermiques et folliculaires se distinguent des cellules transientes lors d'un marquage

conjoint des intégrines  $\alpha 6$  et des récepteurs de la transferrine CD71 (Tani et al., 2000). Les cellules exprimant plus fortement  $\alpha 6$  et très faiblement ou pas CD71 (notées  $\alpha 6^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{dim}}$ ) ont été identifiées comme des cellules souches par leur prolifération lente. Ensuite, les cellules exprimant à la fois fortement  $\alpha 6$  et CD71 (notées  $\alpha 6^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{bri}}$ ) ont été identifiées comme des cellules transientes, par un comportement prolifératif très actif, en combinant cette étude à une analyse cinétique de la prolifération cellulaire basée sur l'utilisation de thymidine tritiée. Les cellules souches sont donc caractérisées par l'absence spécifique de certaines molécules, comme CD71 mais également la connexine 43. De plus, des cultures *in vitro* de clones issus de cellules épidermiques ont permis d'identifier de nombreux marqueurs, enrichis dans la plupart des cellules clonales, considérées comme des cellules souches, tels que l'intégrine  $\beta 1$  (Jones and Watt, 1993) ou Lrig-1, un antagoniste du récepteur à l'EGF (Jensen and Watt, 2006).

Les marqueurs des cellules souches folliculaires présentes au niveau du bulge ont été également très étudiés (Tableau 3). Les cellules du bulge de souris expriment un certain nombre de marqueurs incluant la kératine K15 et CD34 (Lyle et al., 1998; Trempus et al., 2003; Morris et al., 2004). Les marqueurs exprimés par les cellules souches de bulge humain incluent également CD200 et le récepteur Frizzled homologue 1 (Ohyama et al., 2006a).

### 3.3.3. Le maintien de l'état de cellule souche par la niche

Les cellules souches sont situées dans des endroits privilégiés ou « niches » leur fournissant l'environnement adéquat et leur permettant de conserver leur caractère « souche » (Barrandon, 1998). Parmi les différentes molécules de signalisation présentes dans l'environnement du bulge, deux voies jouent un rôle important dans le contrôle du comportement des cellules souches (Fig. 8). La première est **la voie de signalisation Wnt** qui, par la régulation de l'activité de la  $\beta$ -caténine, induit l'activation des cellules souches, la détermination de leur lignage et leur différenciation (Gat et al., 1998; Huelsken et al., 2001; Merrill et al., 2001; Niemann et al., 2002). La deuxième voie de contrôle est **la voie de signalisation BMP** (Hogan, 1996). Bien qu'elle soit également nécessaire à la différenciation du follicule pileux à un stade ultérieur, la signalisation BMP, avec la coopération des inhibiteurs de la voie Wnt, dont Dkk, Wif, et sFRP, limite l'activation des cellules souches et les maintient au stade quiescent (Botchkarev et al., 2001; Kulesa et al., 2000). Une coordination entre Wnt et Noggin (en inhibant temporairement la signalisation BMP sur les cellules souches) est nécessaire pour l'activation des cellules souches et la régénération du follicule pileux à chaque cycle (Jamora et al., 2003). Les voies FGF et Notch sont également impliquées dans la fonction inductrice de la papille dermique sur la prolifération des cellules de la matrice et la détermination du lignage cellulaire (Blanpain et al., 2004), mais leur influence sur les cellules souches n'est pas encore élucidée.

Au niveau de l'épiderme interfolliculaire, **la voie de signalisation issue du récepteur à l'EGF** serait le déclencheur de la différenciation des cellules souches épidermiques Lrig1, un antagoniste de ce récepteur, permettant de maintenir la quiescence des cellules souches épidermiques (Jensen and Watt, 2006).

Marqueurs	Bulge	Références
<b>Kératines</b>		
K1/K10	-	Trempus et al, 2003
K5/K14	+	Trempus et al, 2003
K15	+	Lyle et al.1998
K19	+	Michel et al, 1996
K6	+	Trempus et al, 2003
<b>Intégrines</b>		
Intégrine $\beta$ 1	+	Watt et al, 1993
Intégrine $\alpha$ 6	+	Blanpain et al, 2004
<b>Régulateurs de voies de signalisation</b>		
Dickkopf 3	+	Cotsarelis, 2006; Ohyama et al., 2006
Wnt-inhibiting factor 1	+	Cotsarelis, 2006; Ohyama et al., 2006
Follistatin		Ohyama et al., 2006
<b>Récepteurs</b>		
Récepteur à la transferrine ( CD71)	-	Tani, et al. 2000
CD34	+	Trempus et al., 2003
CD200	+	Cotsarelis, 2006; Ohyama et al., 2006
Frizzled homolog1	+	Ohyama et al., 2006
CD31	-	Trempus et al, 2003
<b>Facteurs de transcription</b>		
Sox9	+	Vidal et al, 2005
Lhx2	+	Rhee et al, 2006
<b>Autres</b>		
p63	+	Pellegrini et al., 2001
BMI1 (B-lymphoma Mo-MLV insertion region 1)	+	Claudinot et al, 2005; Ohyama et al., 2006
ZFP145 (promyelocytic leukaemia zinc finger protein 145)	+	Claudinot et al, 2005; Ohyama et al., 2006
Lgr5	+	Jacks et al, 2008
Loricrine	-	Trempus et al, 2003
Vimentine	-	Trempus et al, 2003

**Tableau 3 : Liste des principaux marqueurs potentiels des cellules souches du bulge.**

La présence (+) ou l'absence (-) de ces marqueurs est indiquée.

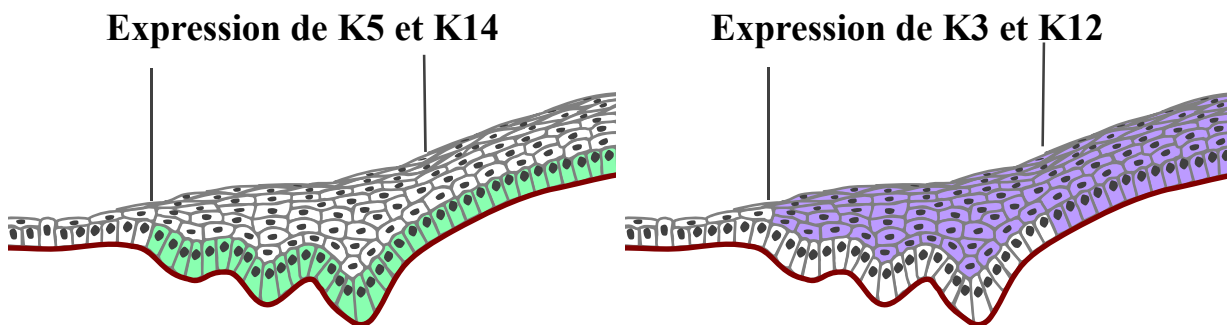
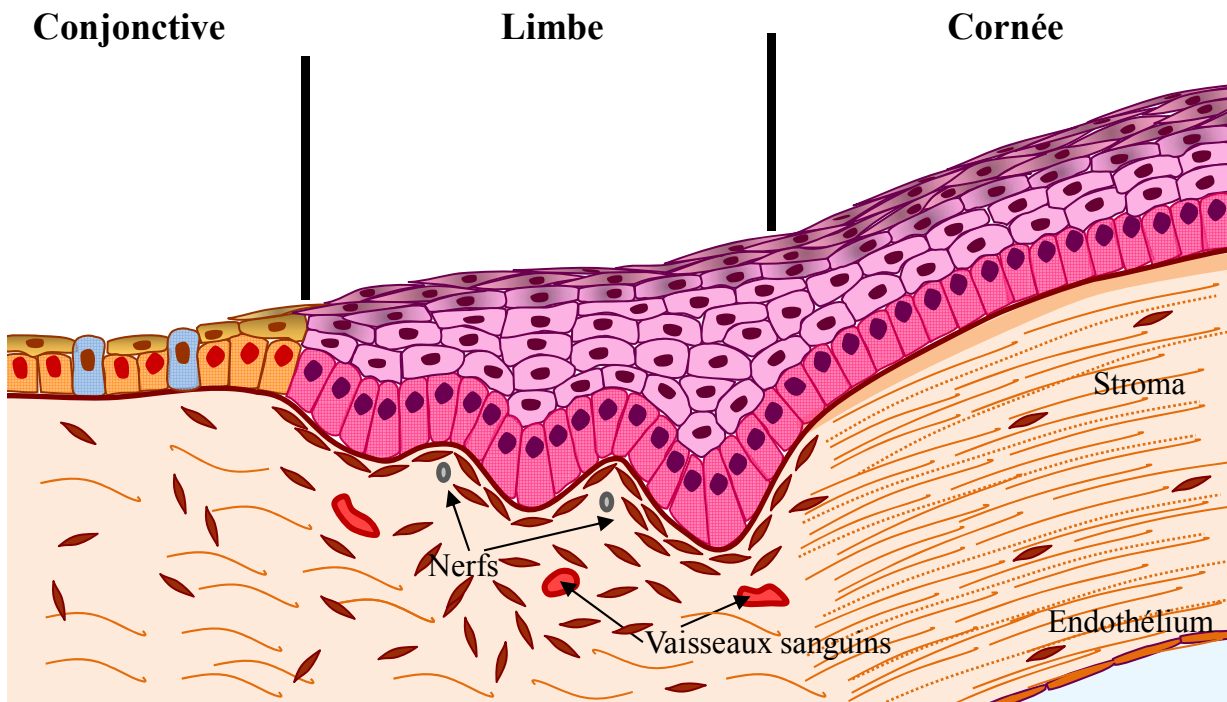
### 3.4. LES CELLULES SOUCHES CORNÉENNES

Les cellules souches sont la clef de l'homéostasie de la cornée qui permet le maintien d'une cornée saine. De nombreux troubles visuels sont engendrés par un déficit en cellules souches de la cornée. L'étude des cellules souches de la cornée a largement été inspirée par les études antérieures sur les cellules souches de la peau et les cellules souches hématopoïétiques.

#### 3.4.1. Les processus de renouvellement de l'épithélium cornéen

Le renouvellement constant de l'épithélium cornéen suppose l'existence de phénomènes de division, de migration et différenciation cellulaire. **Plusieurs théories** ont été proposées pour expliquer le renouvellement de l'épithélium cornéen sur la base d'observations cliniques et expérimentales. La première hypothèse, émise par Shapiro et ses collaborateurs en 1981, est une **origine conjonctivale** de l'épithélium cornéen, fondée sur l'observation des phénomènes de cicatrisation de la surface cornéenne après abrasion totale de l'épithélium cornéen chez le lapin (Shapiro et al., 1981). Cette théorie, reprise par Tholf, implique un flux centripète constant de cellules épithéliales depuis la conjonctive vers la cornée centrale. Quand les cellules conjonctivales atteignent la membrane de Bowman, le microenvironnement cornéen induirait la transdifférenciation en épithélium de cornée (Thoft and Friend, 1983). La transdifférenciation conjonctivale est contestée par Kruse, qui observe une cicatrisation cornéenne normale après l'application de n-heptanol pendant deux minutes sur la surface oculaire du lapin (Kruse et al., 1990). Cet agent chimique, bien que détruisant l'épithélium cornéen et conjonctival, épargne les cellules basales du limbe, en raison de leur situation anatomique profonde, qui sera détaillée dans le paragraphe suivant, et leurs solides structures d'ancrage. Les résultats des travaux antérieurs seraient donc dus à une réépithélialisation suite à une ablation incomplète des cellules limbiques. En effet, après ablation complète des cellules limbiques, la réépithélialisation de la surface cornéenne provient effectivement de la conjonctive, mais s'accompagne toujours d'une vascularisation cornéenne et d'une persistance du caractère conjonctival de cet nouvel épithélium (Dua and Forrester, 1990).

La principale théorie, retenue jusqu'à présent, est celle des **cellules souches limbiques**, localisées dans la couche basale du limbe, et assurant le renouvellement de l'épithélium de cornée. Le limbe est la zone de transition entre la cornée et la conjonctive (Fig.9). Dans cette théorie, toutes les cellules souches de la cornée sont dans la couche basale du limbe et l'épithélium cornéen est uniquement constitué de cellules d'amplification transitoires ou de cellules post-mitotiques (Fig. 9). Cette théorie issue du laboratoire de T.T. Sun s'appuie sur le postulat que les cellules souches n'expriment pas de marqueurs de différenciation (Schermer et al., 1986). Alors que la couche basale de l'épiderme n'exprime pas les kératines K1/2 et K10, celle de l'épithélium cornéen exprime les kératines K3 et K12. Seule la couche basale limbique n'exprime pas les kératines K3 et K12, et constituerait le réservoir des cellules souches cornéennes. Le renouvellement de l'épithélium cornéen peut donc être considéré comme un processus initié à partir de cellules souches indifférenciées situées dans les couches basales du limbe. Ces cellules, en se divisant, donneraient naissance à des cellules amplificatrices transitoires qui migreraient vers le centre de la cornée pour y constituer une



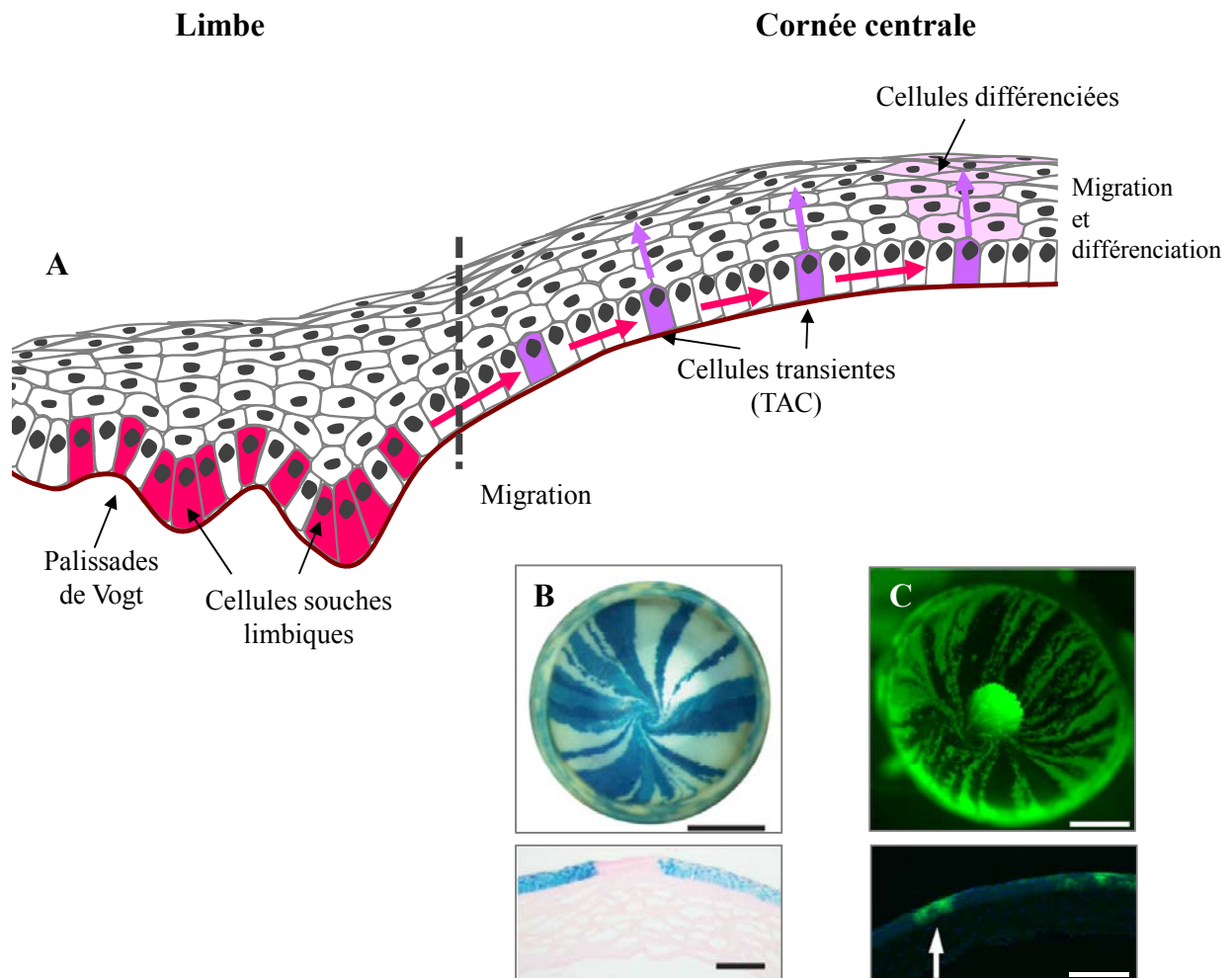
**Figure 9 : Localisation et caractérisation des cellules épithéliales limbiques.**

Le limbe est situé entre la conjonctive et la cornée et comporte, au niveau de sa couche basale, les cellules souches qui constituent le réservoir pour la régénération de l'épithélium cornéen. Les cellules de la couche basale du limbe expriment la kératine 14, comme les cellules de la couche basale de la cornée centrale, mais sont caractérisées par une absence d'expression des kératines 12 et 3. Noter la présence à ce niveau d'une structure de niche caractérisée par la présence de vaisseaux sanguins, de terminaisons nerveuses ainsi que d'une population dense de fibroblastes. *Iconographie : E. Collomb*

assise basale à activité mitotique intense. Ces cellules acquièrent rapidement les caractéristiques phénotypiques des cellules épithéliales cornéennes. Ces dernières migrent alors de façon verticale, avec une activité mitotique décroissante, puis se transforment en superficie en cellules hyperdifférenciées ne se multipliant plus et disparaissent en desquamant dans le film lacrymal. Cette théorie est confortée par de nombreuses observations. Ainsi, la reconstitution complète d'un épithélium cornéen a été obtenue à partir de cellules limbiques transplantées *in vivo* (Kenyon and Tseng, 1989). Des cellules LRC, caractéristiques des cellules qui se divisent rarement, ont été mises en évidence dans la couche basale du limbe, mais pas de la cornée centrale (Cotsarelis et al., 1989). Les cellules basales du limbe montrent, en culture *in vitro*, une prolifération caractéristique des cellules souches démontrant leur potentiel élevé de prolifération (Ebato et al., 1988). La prolifération et la migration des cellules épithéliales de la cornée se feraient selon un mouvement centripète. Initialement observé grâce à la migration de pigments à travers la cornée (Davanger and Evensen, 1971), le mouvement centripète des cellules épithéliales a également été confirmé par des études retraçant la migration des cellules à l'aide de particules d'encre (Buck, 1985; Schwab et al., 2000), ainsi que pour des souris mosaïques XLacZ<sup>±</sup> (Fig. 10) (Collinson et al., 2002).

De façon classique, **le renouvellement de l'épithélium pourrait se faire selon un mode vertical à partir des cellules progénitrices de la couche basale** qui donneraient naissance aux cellules filles différenciées des couches suprabasales et superficielles, comme cela se déroule pour de nombreux épithélia pluristratifiés tels que l'épiderme interfolliculaire et l'épithélium buccal (Haskjold and Nicolaisen, 1988). A l'appui de cette théorie, l'hypothèse que le limbe est la seule localisation de cellules souches de la cornée a récemment été mise en doute par les travaux du laboratoire de Y. Barrandon. Ceux-ci suggèrent que la cornée centrale possède ses propres cellules souches permettant son renouvellement en condition physiologique (Majo et al., 2008). De plus, toute la surface oculaire chez le cochon contiendrait des cellules souches capables de former à la fois des colonies de cornée mais également de conjonctive. Les cellules souches de la cornée et de la conjonctive seraient tripotentes et pourraient constituer le lignage de la cornée et les lignages conjonctivaux. Un autre argument est que la migration centripète des cellules, souvent observée dans un contexte cicatriciel, ne serait pas à confondre avec une migration cellulaire lors d'un processus physiologique. Bien que les travaux de ce laboratoire montrent que quelques cellules cornéennes de cochon possèdent un notable potentiel prolifératif, cette propriété n'est pas restreinte aux cellules souches. Certaines cellules transientes comme les cellules de la matrice du follicule pileux sont connues pour avoir la capacité de se multiplier de nombreuses fois. De plus, la comparaison de la capacité d'autorenouvellement entre les cellules cornéennes et les cellules limbiques, lorsqu'elle est réalisée dans des conditions de culture identiques, établit que les cellules limbiques humaines et de lapin ont un pouvoir de renouvellement bien supérieur à celui des cellules d'épithélium de cornée (Wei et al., 1993; Pellegrini et al., 1999). Un autre argument venant à l'encontre de la théorie de Y. Barrandon est que l'état des cellules de la couche basale de la cornée centrale est fonction de l'âge chez la souris, et que leur disparition est très tardive par rapport à d'autres espèces. Les souris adultes utilisées en laboratoire ont en général entre 3 et 6 mois, et l'âge des souris n'est généralement pas indiqué dans les publications. Or, le laboratoire de W.Y. Kao a montré la présence de cellules basales





**Figure 10 : Le renouvellement de l'épithélium cornéen à partir du limbe.**

(A) Les cellules souches limbiques situées dans la couche basale de l'épithélium limbique, au sein des palissades de Vogt, vont donner naissance à des cellules d'amplification transitoire (TAC) ou cellules transientes, qui en même temps qu'elles prolifèrent vont migrer de façon centripète vers le centre de la cornée. Cette migration centripète est illustrée par la cornée dite en mosaïque provenant de souris X chimère, (B) grâce à un marquage Xgal sur une souris chimère XLacZ+/LacZ- et (C) grâce à un marquage GFP (Collinson et al., 2002). Iconographie : E. Collomb

de la cornée centrale n'exprimant pas K12 chez le nouveau-né et la quantité de ces cellules diminuerait dans les mois post-nataux jusqu'à la maturité de l'épithélium cornéen qui est atteinte seulement entre 3 et 6 mois après la naissance (Tanifuji-Terai et al., 2006). Les cellules n'exprimant pas K12, mais exprimant K14 pourraient être à l'état de cellules souches et la ségrégation de ces cellules aurait lieu dans la région du limbe lors des premiers mois de la vie postnatale. Cette hypothèse est cohérente avec les motifs d'expression en mosaïque de la GFP dans l'épithélium cornéen de jeunes (moins de 3 mois) souris transgéniques X-linked CAG-EGFP et en forme de spirale dans le cas des souris adultes (plus de 3 mois) (Collinson et al., 2002). Ces travaux montrent l'importance de la prise en compte de l'âge des animaux adultes dans les expériences sur l'étude des potentialités des cellules de la couche basale de la cornée centrale.

### **3.4.2. Le réservoir limbique ou niche des cellules souches cornéennes**

Les repères histologiques pouvant être utilisés pour délimiter le limbe de la cornée sont la fin des membranes de Bowman et de Descemet et la désorganisation des fibres de collagène du stroma. La jonction limbo-sclérale permettant de situer la transition entre le limbe et la conjonctive est plus difficile à déterminer avec précision. Elle peut être estimée par la jonction de l'iris et du stroma. De plus, contrairement à la conjonctive, l'épithélium du limbe ne contient aucune cellule muqueuse globulaire.

Au niveau du limbe, l'épithélium cornéen s'épaissit et la couche basale forme des plis, appelées palissades de Vogt, qui ne sont pas présents chez toutes les espèces (Fig. 9). Chez le lapin, elles sont remplacées par des protubérances (Gipson, 1989). Dans ces papilles, formées par le stroma, se localisent des vaisseaux sanguins et des nerfs contribuant à la formation d'un microenvironnement propice et différent de celui de la cornée centrale (Zieske, 1994; Kruse, 1994). De plus, la lame basale sur laquelle repose les cellules limbiques contient du collagène de type IV alors que le collagène de type XII, présent dans celle de la cornée centrale, est absent (Wessel et al., 1997; Kolega et al., 1989). Le mécanisme de régénération de l'épithélium cornéen à partir des cellules souches limbiques suppose l'existence de facteurs régulant l'expression de gènes responsables de la différenciation en épithélium de type cornéen. L'observation de dysfonctionnements limbiques, au cours de certaines pathologies endocriniennes ou neurologiques, accreditte l'hypothèse de la présence de récepteurs pour des facteurs hormonaux et des neuromédiateurs sur les cellules souches du limbe (Puangsricharern and Tseng, 1995). Le limbe réunit donc toutes les caractéristiques idéales d'une niche pour la conservation des cellules souches : le contact étroit avec un réseau vasculaire dense, l'environnement protecteur des palissades de Vogt ainsi que la situation anatomique privilégiée protégée par les paupières (Tseng, 1989; Zieske, 1994).

Le déficit en cellules souches limbiques, qu'il soit congénital (agénésie ou dysgénésie du limbe), fonctionnel (dérégulation neurologique ou endocrinienne) ou encore acquis (destruction par un mécanisme physique, infectieux, inflammatoire...) entraîne une incapacité de l'épithélium cornéen à se régénérer et un envahissement progressif de la surface cornéenne par un épithélium de type conjonctival. La cornée devient alors le siège d'une inflammation

chronique, d'érosions récidivantes, d'ulcères et d'une néovascularisation ; ce qui affectent grandement l'acuité visuelle (Dua et al., 2003). Le traitement de ces pathologies représente un défi thérapeutique important de la chirurgie reconstructrice du segment antérieur de l'œil.

### **3.4.3. Les marqueurs des cellules souches cornéennes**

L'état indifférencié des cellules souches les rend différentes au point de vue moléculaire. Elles expriment certains marqueurs qui peuvent être utilisés pour les reconnaître *in vivo* et *in vitro* (Tableau 4). Malheureusement, aucun marqueur n'est spécifique uniquement aux cellules souches de la cornée. Pour s'assurer du type cellulaire étudié, il faut généralement utiliser une combinaison de marqueurs.

La vimentine et la kératine K19 sont deux types de filaments intermédiaires localisés au niveau des cellules basales du limbe. Plusieurs évidences démontrent que les cellules co-exprimant ces deux filaments intermédiaires sont des cellules souches. La kératine 19 ne peut pas être employée seule comme marqueur spécifique puisqu'elle est également exprimée par les cellules épithéliales de la conjonctive adjacente (Elder et al., 1997). D'autres marqueurs ont également été proposés : l' $\alpha$ -énolase (Zieske et al., 1992), le transporteur ABCG2, un marqueur important des cellules souches hématopoïétiques (Watanabe et al., 2004). Le facteur de transcription p63 (Pellegrini et al., 2001) serait exprimé préférentiellement dans les cellules souches de la cornée humaine, mais pas dans celles de la cornée murine. Les intégrines  $\alpha 9$  et  $\beta 1$  sont également exprimée dans les cellules basales du limbe (Stepp et al., 1995), permettant leur utilisation, comme marqueurs de surface, fort utile en cytométrie en flux. Pour permettre l'identification des cellules souches, il existe également des marqueurs qui sont absents des cellules souches. Comme il déjà mentionné, la paire de kératines 3/12, spécifique à l'épithélium de la cornée, n'est pas exprimée par les cellules basales du limbe (Schermer et al., 1986). De même, la kératine 4, typique de l'épithélium de l'œsophage et de la conjonctive, n'est retrouvée ni dans les cellules limbiques, ni dans les cellules du centre de la cornée (Kurpakus et al., 1994; Elder et al., 1997). Certaines connexines, protéines présentes dans les jonctions communicantes, pourraient également permettre l'identification des cellules souches par leur rôle de marqueur négatif. Ainsi la connexine 43 est absente des cellules basales du limbe alors que son expression s'intensifie avec la différenciation cellulaire dans le centre de la cornée (Matic et al., 1997).

Les marqueurs membranaires sont très utiles pour trier les cellules souches à partir d'échantillons tissulaires par cytométrie en flux, une méthode très puissante que j'ai utilisée au cours de ma thèse comme cela sera décrit dans la deuxième partie de mes résultats.

### **3.4.4. Le maintien à l'état souche dans la niche**

Les cellules souches doivent communiquer avec leur environnement ou niche afin de maintenir leur auto-renouvellement et/ou leur activation dans la production de leur descendance en cellules transientes. Ce dialogue avec la niche implique des interactions cellule-cellule, cellule-matrice ainsi que des facteurs paracrines et leurs récepteurs. Différentes études ont montré que les signaux tels que les voies de signalisation Sonic hedgehog (Shh), Wnt/ $\beta$ -caténine, Notch, et TGF- $\beta$ /BMP jouent un rôle important dans le contrôle des niches des différents types de cellules souches.

Marqueurs	Limbe	Références
<b>Kératines</b> K3/K12	-	Schermer et al., 1986; Kurpakus et al., 1990; Pearton et al., 2004
K5/K14	+	Pearton et al., 2004
<b>Protéines de gap jonction</b> Cx43 Cx50	- -	Matic et al., 1997 Matic et al., 1997
<b>Intégrines</b> Intégrine $\beta$ 1 Intégrine $\beta$ 4 Intégrine $\alpha$ 6 Intégrine $\alpha$ 9	+ + + +	Stepp et al., 1995; Stepp, 1999; Stepp and Zhu, 1997 Pajooohesh-Ganji et al., 2004 Pal-Ghosh et al., 2004
<b>Enzymes métaboliques</b> $\alpha$ -enolase Cytochrome oxydase Anhydrase carbonique	+ + +	Zieske et al., 1992 Hayashi and Kenyon, 1983 Steuhl and Thiel, 1987
<b>Transporteurs</b> Transporteur du glucose I Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase ABCG2	+ + +	Chen et al., 2004
<b>Récepteurs aux facteurs de croissance</b> Récepteur à l'EGF Récepteur I/II au TGF $\beta$	+ +	Zieske et al., 2000, 2001 Zieske et al., 2000, 2001
<b>Régulateurs du cycle cellulaire</b> Cycline D Cycline E	+ +	Joyce et al., 1996 Joyce et al., 1996
<b>Autres</b> p63	+	Pellegrini et al., 2001

**Tableau 4 :** Liste des principaux marqueurs potentiels des cellules souches cornéennes.

La présence (+) ou l'absence (-) de ces marqueurs est indiquée.

La génération d'une souris déficiente pour l'expression de Dickkopf-2, un des inhibiteurs de la voie Wnt, a montré une perte totale de l'identité cornéenne sur la surface oculaire et une différenciation de celle-ci en épiderme. L'inhibition de la voie de signalisation Wnt dans la cornée, ainsi que la capacité de cette voie de signalisation à induire la transdifférenciation de l'épithélium cornéen en épiderme, sont des points importants qui seront abordés en détails par la suite (paragraphe 6.2). L'inactivation conditionnelle de Notch-1 chez la souris adulte induit une hyperplasie et une kératinisation de l'épithélium cornéen, avec activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, imitant la différenciation épidermique (Nicolas et al., 2003). Toutefois, il n'a pas été étudié si la niche limbique est altérée lorsque l'expression épithéliale de Notch-1 est atteinte.

Cependant, peu de choses sont connues sur les interactions entre les cellules souches limbiques et leur niche. Outre une dysgénésie du réseau trabéculaire et des structures de drainage du canal de Schlemm, des cicatrices de la cornée périphérique et une vascularisation ont été observées chez les souris présentant un déficit hétérozygote pour BMP-4 (Chang et al., 2001). Il serait intéressant de savoir si l'anomalie cornéenne est due à un dysfonctionnement de la niche limbique. Un autre facteur de la famille des FGFs (Fibroblast Growth Factors), le facteur de croissance des kératinocytes (KGF ou FGF-7), semble impliqué dans le maintien de la niche. Sa surexpression dans les cellules épithéliales de souris transgéniques conduit à une hyperprolifération des cellules épithéliales cornéennes embryonnaires, et leur différenciation ultérieure en tissus de glandes lacrymales n'exprimant pas la kératine K12 (Lovicu et al., 1999). Ce résultat suggère que la niche limbique n'est plus fonctionnelle pour orienter la différenciation en épithélium cornéen lorsque ces cellules surexpriment KGF. Il reste à déterminer si l'effet de la perturbation de ce facteur et le contrôle de la niche sur le comportement des cellules souches limbiques sont temporellement et spatialement dépendantes.

Le maintien de l'homéostasie de la peau et de la cornée nécessite donc un dialogue complexe entre les tissus afin de maintenir le statut des cellules souches et d'induire le renouvellement des tissus en donnant une progéniture. Ces cellules sont regroupées dans des niches dont la mise en place a lieu au cours de la formation du tégument. Les cellules souches sont-elles présentes dès le début de l'organogenèse du tégument ou bien sont-elles ségréguées dans leur niche une fois chaque tissu formé? Une des questions importantes de l'embryologie est donc de savoir **quand et sous l'influence de quels signaux se met en place la niche des cellules souches au cours du développement**. De façon similaire, l'organogenèse de la peau et de ses annexes ainsi que celle de la cornée impliquent des mécanismes complexes tout au long de la morphogenèse. Les interactions tissulaires impliquées ainsi que les voies de signalisation seront abordées dans les deux prochains paragraphes.

## **4. FORMATION DE LA PEAU DORSALE ET FACIALE AINSI QUE DES PRIMORDIA DE PHANÈRES**

La morphogenèse de la peau est concomitante avec la formation des follicules pileux. Ces derniers sont essentiels à la régénération de l'épiderme après traumatisme, car ils contiennent le réservoir « de secours » de cellules souches kératinocytaires.

La mise en place et la croissance des annexes cutanées requièrent un dialogue, entre le derme et l'épiderme, médié par des mécanismes moléculaires qui seront présentés plus loin. De nombreuses expériences de recombinaisons dermo-épidermiques hétérotopiques, hétérochroniques, et entre différentes espèces (poulet, souris, canard, lézard) ont montré que l'épiderme et le derme contrôlaient chacun des aspects de la morphogenèse des primordia de phanère. Le derme est responsable de l'initiation, du diamètre et du motif de distribution des annexes cutanées (Dhouailly, 1977). L'épiderme possède l'information relative au type d'annexe cutanée spécifique d'une classe (Dhouailly, 1973; Dhouailly and Sengel, 1975), ainsi que l'orientation cranio-caudale des annexes (Sullivan, 1972). Cependant, bien que le derme soit l'initiateur de la formation des phanères, le dialogue entre le derme et l'épiderme ne peut avoir lieu que si l'épiderme est compétent. L'importance de la compétence de l'épiderme a été mise en évidence par des expérimentations de recombinaisons tissulaires utilisant la souche de poulet mutant *Scaleless* qui présente une absence quasi totale de plumes sur le corps et une absence totale d'écaillés sur les pattes (Goetinck and Abbott, 1963). Il a été montré que l'absence de phanères chez ce mutant était due à un défaut de l'épiderme, et que les cellules dermiques de la patte étaient capables d'induire la formation d'écaillés lorsqu'elles étaient associées à un épiderme compétent de souche sauvage (Dhouailly and Sawyer, 1984).

### **4.1. ORIGINE EMBRYONNAIRE DE LA PEAU**

Le derme et l'épiderme proviennent de différents feuilletts embryonnaires, et en fonction de leur localisation sur l'individu, l'origine peut être différente. L'épiderme est issu du **feuillet ectodermique**, à l'exception de la région naso-frontale, où il dérive de la partie antérieure des bourrelets neuraux (Couly and Le Douarin, 1988). Le derme dorsal dérive du **dermomyotome** des somites (Mauger and Sengel, 1970) et plus précisément du dermomyotome médian (Olivera-Martinez et al., 2000). Le derme ventral et le derme des membres proviennent du **mésoderme somatopleural**. Le derme de la face, ainsi que celui du crâne provient des **crêtes neurales céphaliques**, sauf dans les régions occipitale et otique, où il provient du mésoderme céphalique (Couly et al., 1992; Le Douarin et al., 1993). Lorsque les cellules mésenchymateuses issues du mésoderme ou de la crête neurale migrent sous l'ectoderme, elles se différencient en derme; ce qui provoque la différenciation de l'ectoderme en épiderme (Olivera-Martinez et al., 2002). La formation du derme dorsal et du derme ventral a été étudiée dans notre laboratoire sur le plan moléculaire chez l'embryon de poulet. Un signal *Wnt1* issu de la région dorsale du tube neural, ainsi qu'un autre signal dorsal de type *Wnt*, mais ectodermique, sont requis pour la spécification et la migration des futures cellules dermiques à partir du dermomyotome des somites (Olivera-Martinez et al., 2002).

Dans le cas de la formation du derme ventral, la signalisation BMP4 est progressivement inhibée dans la somatopleure par la synthèse de Noggin (Fliniaux et al., 2004).

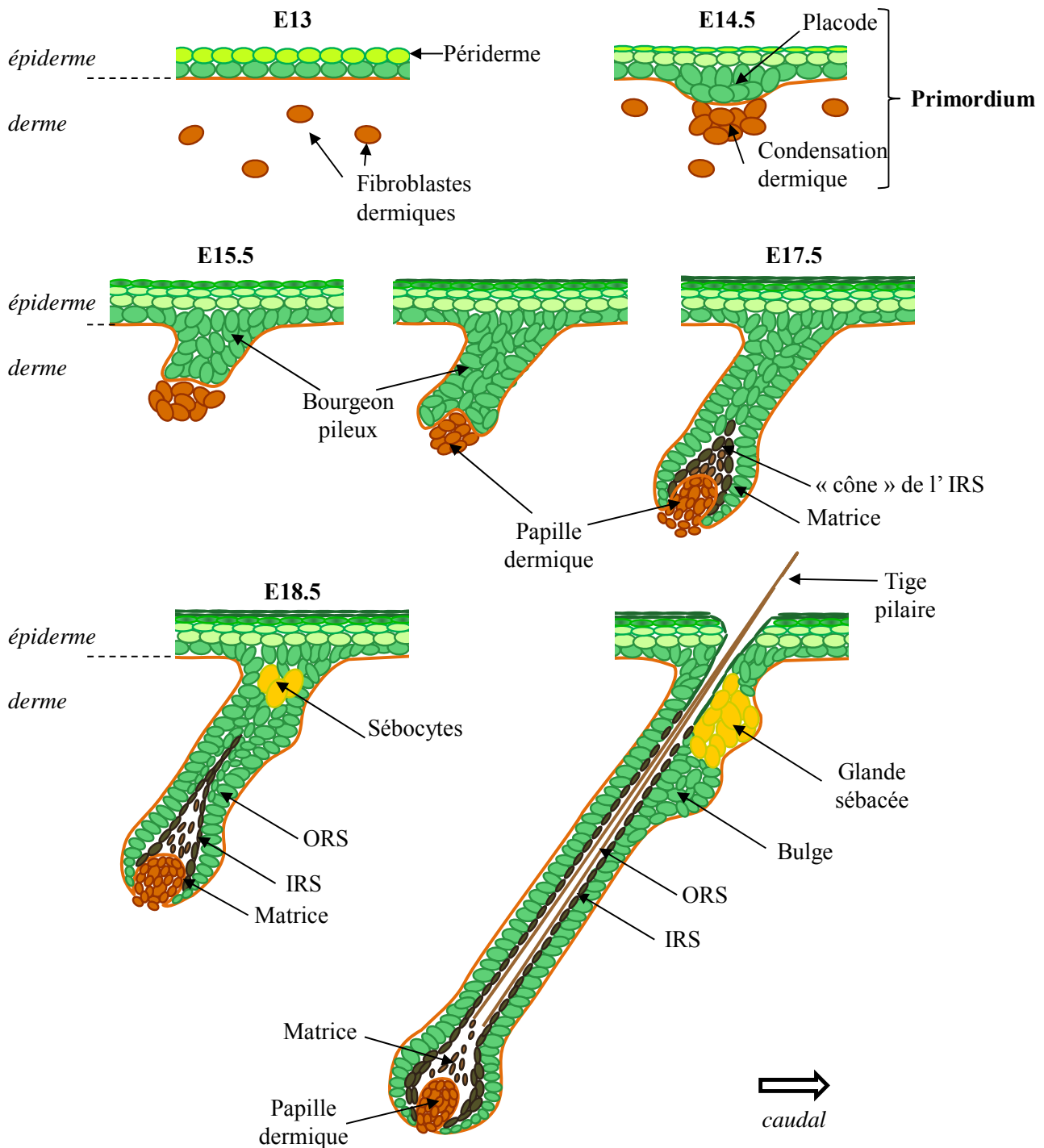
Les **cellules issues des crêtes neurales** participent à l'organogenèse de nombreux organes de la face en formant le derme et le stroma cornéen et la sclérotique de l'œil. La différenciation des cellules de la crête neurale est un **processus en trois étapes** qui commence par la spécification réalisée au niveau des gouttières neurales au cours de la neurulation, puis la délamination permettant l'individualisation des cellules et enfin la migration de celles-ci vers le tissu cible (pour revue : Knecht and Bronner-Fraser, 2002). Elles trouvent leur origine dans la zone frontière, entre la plaque neurale et l'ectoderme de surface, caractérisée par des concentrations élevées en BMP. Les cellules des crêtes neurales se forment à l'endroit où des concentrations élevées de BMP rencontrent des concentrations élevées de Wnt6 (Fig. 19). Ces deux facteurs induiraient dans les cellules des futures crêtes neurales, l'expression de facteurs de transcription particuliers, dont Slug et FoxD3 (Kos et al., 2001; Sasai et al., 2001; Garcia-Castro et al., 2002). FoxD3 semble être l'élément déterminant de la spécification des cellules de crête neurale puisque son inhibition bloque leur différenciation. Inversement, l'expression ectopique de FoxD3 par électroporation dans des cellules de la plaque neurale induit l'expression de protéines caractéristiques de la crête neurale (Kos et al., 2001). Slug, quant à lui, est nécessaire à la migration des cellules de la crête neurale hors de l'épithélium, donc à la transition épithélio-mésenchymateuse qui permet aux cellules de perdre leurs attaches cellulaires et de quitter le feuillet neurodermique natif.

De nombreux travaux ont contribué à préciser la nature des dérivés des crêtes neurales, notamment ceux du laboratoire de N. Le Douarin utilisant des chimères caille-poulet (1980). Ainsi dans la tête, chez l'oiseau, les ébauches squelettiques du viscérocrâne font partie de leurs dérivés. De plus, ces travaux ont mis en évidence les voies précises empruntées par les cellules issues des crêtes neurales, celles-ci se mêlant aux cellules du mésoblaste latéral et paraxial dans la région céphalique (pour revue: Le Douarin et al., 1993). L'organisation des routes migratoires prises par les cellules des crêtes neurales est établie par la présence de protéines de la matrice extracellulaire favorisant la migration (fibronectine, laminine, tennascine, différents collagènes et protéoglycanes) (Newgreen and Erickson, 1986), mais aussi par la présence de molécules inhibant la migration, comme les éphrines (Krull et al., 1997; Wang and Anderson, 1997). Les cellules de la crête neurale sont à l'origine de nombreuses pathologies appelées neurocristopathies, dont la plupart résultent d'un défaut de migration au cours du développement et conduisent à une dysmorphologie crânio-faciale (Poswillo, 1977).

## **4.2. LA MORPHOGENÈSE DU PHANÈRE**

### **4.2.1. Événements morphologiques lors de la formation du follicule pileux**

Chez la **souris**, à 11 jours de gestation pour la lèvre supérieure, à 12,5 jours pour le corps, la peau de l'embryon n'est pas encore formée et l'ectoderme recouvre un mésenchyme épars. Un jour plus tard, la peau est constituée, mais encore homogène. L'épiderme est composé d'une seule couche cellulaire recouverte du périoderme et les fibroblastes régulièrement



**Figure 11 : Les principales étapes de la morphogénèse du follicule pileux chez la souris.**

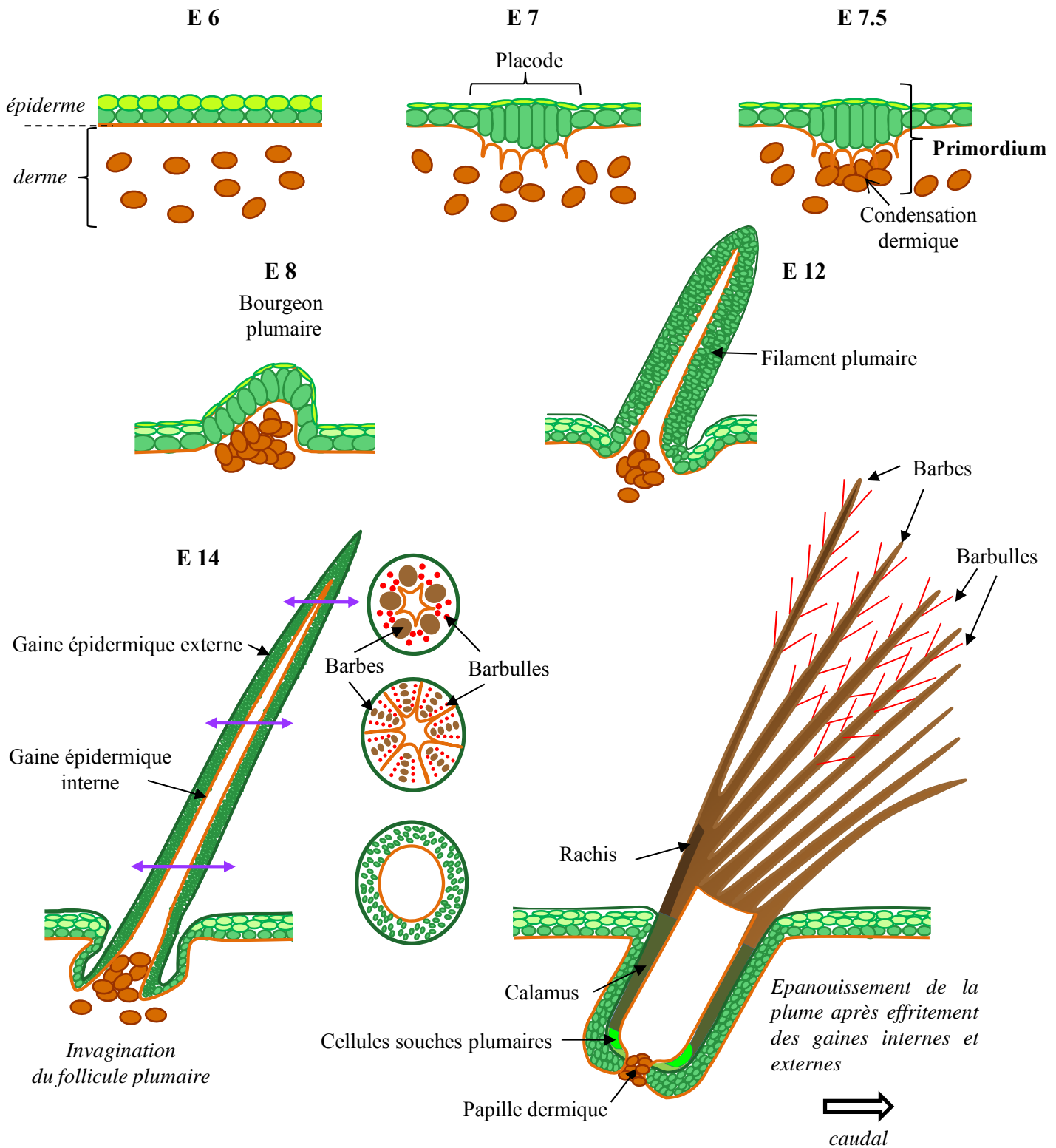
A 14.5 jours de développement, dans la région dorsale de la souris, apparaissent les premiers primordia qui correspondent à l'association d'une placode qui est un épaissement de l'épiderme et d'une condensation dermique. Les cellules de la placode prolifèrent et migrent progressivement en direction du derme. Les cellules épithéliales de l'extrémité proximale du bourgeon pileux s'organisent pour former une cavité à l'intérieur de laquelle s'engouffrent progressivement les cellules de la condensation dermique qui forment la papille dermique. Les kératinocytes du bourgeon pileux s'organisent en plusieurs couches concentriques pour former le follicule pileux mature. *Iconographie : E. Collomb*



répartis forment un derme dense. Les premières ébauches folliculaires à apparaître sont les primordia de vibrisses, à 12 jours de gestation au niveau de la peau faciale. L'apparition des primordia de poils de pelage a lieu dans la région dorsale à partir du 14<sup>ème</sup> jour de gestation. Sous l'influence du derme sous-jacent, l'épiderme s'épaissit localement suite à une prolifération cellulaire pour former une placode épidermique. Pratiquement simultanément, les cellules dermiques vont migrer et se rassembler en condensation dermique sous la placode. L'association d'une placode épidermique et d'une condensation dermique constitue ce qu'on appelle un primordium de phanère (Fig. 11). Les cellules de la placode vont ensuite proliférer et progresser en direction des couches profondes du derme pour former le bourgeon pileux, dont la base va s'incurver autour de la condensation dermique, qui deviendra la papille dermique. Le bourgeon pileux s'organise en couches de cellules concentriques jusqu'à donner, à 17,5 jours, un follicule pileux mature (Fig. 11). Celui-ci est composé d'une tige pileuse entourée de la gaine épidermique interne et de la gaine épidermique externe. La matrice de la tige, zone de prolifération cellulaire, est associée à la papille dermique provenant de la condensation dermique (pour revue : (Paus et al., 1999). Durant le développement du follicule pileux, les mélanocytes provenant de la crête neurale migrent vers ce dernier et se différencient pour produire la mélanine. Ce pigment est ensuite transmis des mélanocytes aux kératinocytes de la tige du poil; ce qui détermine la couleur du poil.

#### 4.2.2. Événements morphologiques lors de la formation du follicule plumaire

Chez le **poulet**, entre 6 et 7 jours d'incubation, préalablement à la formation des ébauches de phanère, le derme des futurs champs phanérogènes voit sa densité cellulaire augmenter jusqu'à atteindre 2,6 cellules/1000 $\mu\text{m}^3$  (Wessells, 1965). La densité cellulaire du derme est requise pour l'acquisition de sa capacité à induire la formation de plumes. En dehors des zones de derme dense, les phanères se développent de façon dispersée (au niveau des semi-aptéries) ou pas du tout (au niveau des aptéries). A 6,5 jours d'incubation, correspondant au stade Hamburger-Hamilton 29 (HH29 (Hamburger and Hamilton, 1992)), la peau est homogène, composée d'un épiderme et d'un derme dense sous-jacent. La formation des primordia plumaires débute par la différenciation histologique de l'épiderme qui précède celle du derme (Dhouailly, 1984; Sengel and Rusaouën, 1969). La placode épidermique, qui résulte d'un allongement de l'axe apico-basal de certaines cellules épidermiques avec la formation d'arches d'actine ancrées dans le derme, se forme avant la redistribution du derme superficiel sous celle-ci en condensation (Fig. 12). À partir du septième jour d'incubation (HH30), les premières ébauches de phanères, composées d'une placode et d'une condensation dermique, sont visibles au niveau de la ligne médiane de la ptéryle spinale, puis apparaissent de nouvelles rangées de primordia de part et d'autre de cette ligne. Les cellules de la placode et de la condensation prolifèrent pour permettre l'élaboration du bourgeon plumaire qui s'évagine. A 8,5 jours d'incubation, le bourgeon plumaire présente une asymétrie : il est orienté de la région céphalique vers la région caudale. Il continue ensuite de s'allonger et forme, à 14,5 jours, le filament plumaire dont la base s'enfonce dans le derme pour former le follicule plumaire. La région de croissance du filament plumaire se situe à sa base. La paroi épidermique se différencie de plus en plus en allant vers l'apex. La couche basale de l'épiderme du filament forme la gaine interne, alors que la plus externe forme la



**Figure 12 :** Les principales étapes de la formation de la plume de duvet (plume néoptile) chez le poulet.

La placode apparaît la première, à 7 jours d'incubation, par allongement des cellules épidermiques. Sous cette placode se regroupent les cellules du derme qui forment la condensation dermique à l'origine de la papille dermique. Le bourgeon plumaire fait protrusion à la surface de la peau et forme un filament plumaire dont la base s'invagine, à 14 jours d'incubation, pour former le follicule plumaire, siège des cellules souches. A ce stade la différenciation et la kératinisation des cellules épidermiques de la future plume se produit de l'apex vers la base. À l'éclosion, l'effritement des gaines épidermiques interne et externe conduit à l'épanouissement de la plume de duvet. *Iconographie : E. Collomb*

gaine externe. La couche épidermique située entre les deux gaines se segmente en crêtes barbares au sein de chacune desquelles se différencient une barbe et ses deux rangées de barbules. Le collier prolifère dans sa région dorsale et s'allonge en une tige pleine, ébauche du rachis, qui entraîne les crêtes barbares à son extrémité. De nouvelles crêtes barbares se différencient à la face ventrale du collier et, subissant le même déplacement, viennent s'ajouter en arrière des précédentes le long du rachis qui s'allonge régulièrement. Il est à noter que le rachis qui sera bien développé dans la plume adulte, ou téléoptile, reste très court dans la plume de duvet présente à la naissance (plume néoptile). Au cours de cette évolution, les crêtes barbares initialement insérées verticalement sur le collier s'insèrent transversalement sur le rachis, en demi-cercles légèrement obliques qui s'affrontent par leurs extrémités le long d'une ligne médio-ventrale. Quand le cylindre plumaire émerge à la surface de la peau, la gaine plumaire se déchire et le cylindre se fend selon cette ligne médio-ventrale, libérant les barbes qui s'étalent de chaque côté du rachis en un étendard. Quand l'étendard principal est achevé, le collier prolifère régulièrement et édifie un cylindre de kératine dure, le calamus.

### **4.3. INTERACTIONS TISSULAIRES À L'ORIGINE DE LA FORMATION DU PRIMORDIUM**

La mise en place de la peau et des primordia de phanères, que sont le follicule pileux et le follicule plumaire, nécessite un dialogue intertissulaire et intratissulaire mettant en jeu des activations et des inhibitions médiées par des protéines diffusibles et transmembranaires. Tout d'abord, un message permissif de l'épiderme vers le derme a été mis en évidence par l'étude de la souche *Scaleless* (Dhouailly and Sawyer, 1984). Une fois que le derme phanérogène est rendu compétent par le message épidermique, il renvoie à son tour une information à l'épiderme qui forme alors des placodes (Dhouailly, 1977). Les cellules de la placode vont ensuite provoquer la migration des cellules dermiques qui s'organisent en condensations dermiques (Cadi et al., 1983). Le derme ainsi organisé va permettre la transformation des placodes en bourgeons de phanères. Le dialogue dermo-épidermique se poursuit lors de la croissance et la morphogenèse des phanères.

L'orchestration des signaux par des gradients d'activateurs et d'inhibiteurs est essentielle à la morphogenèse des phanères et fait intervenir les principales voies de signalisation connues. Les protéines impliquées ont pour la plupart été mises en évidence chez le poulet puis leurs rôles ont été confirmés et précisés par l'utilisation de souris déficientes pour un gène cible (Knock Out) ou transgéniques. Les principales voies mises en jeu et les facteurs découverts sont présentés dans les paragraphes suivants.

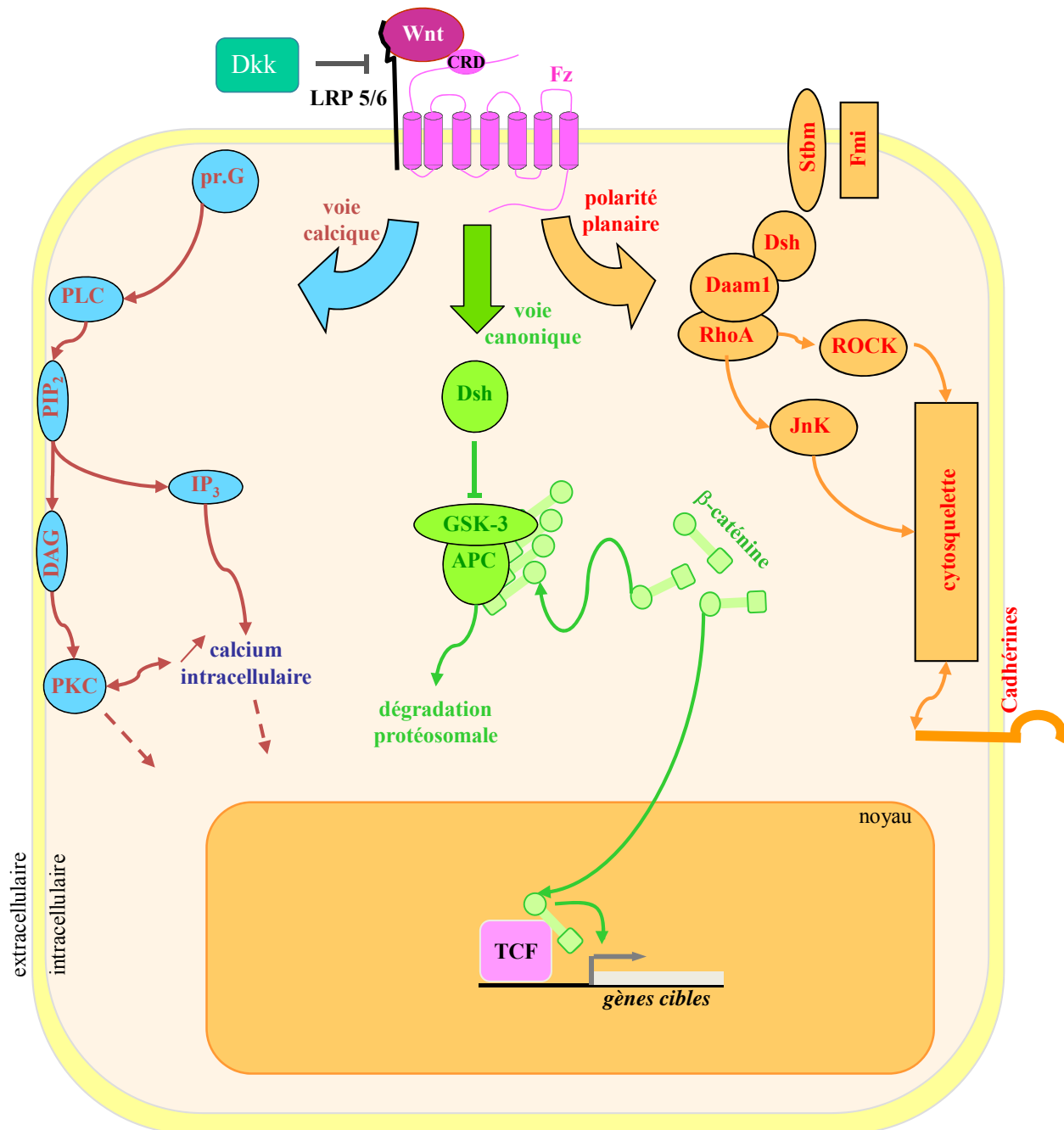
### **4.4. LES SIGNAUX MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA FORMATION DES PRIMORDIA DE PHANÈRES**

#### **4.4.1. Expression et rôle des Wnt et de la $\beta$ -caténine**

La voie de signalisation clé dans l'initiation de la mise en place des phanères est la voie Wnt. Les molécules de la famille Wnt sont des protéines sécrétées qui se fixent sur leurs récepteurs Frizzled. Trois voies de signalisation sont connues et sont présentées en détails

dans la figure 13. La voie de transduction la plus classique est appelée canonique et fait intervenir la  $\beta$ -caténine, une protéine qui joue un double rôle dans la cellule. Elle est un composant des jonctions adhérentes en s'associant au domaine intracellulaire de la E-cadhérine, mais également un facteur de transcription nucléaire (Aberle et al., 1994; McCrea et al., 1991). La dégradation du pool de  $\beta$  caténine libre dans le cytoplasme est finement régulée par son association avec le complexe APC phosphorylé / GSK-3 qui conduit à une rapide dégradation par le protéasome, laissant seules présentes les protéines de  $\beta$  caténine associées aux jonctions. La liaison des Wnts à leur récepteur membranaire entraîne l'inhibition de la dégradation de la  $\beta$ -caténine. Dsh, l'effecteur de la voie Wnt canonique, inhibe la GSK-3, responsable de la phosphorylation et donc de la dégradation de la  $\beta$ -caténine. Elle s'accumule alors dans le cytoplasme et est transférée dans le noyau où elle forme des complexes transcriptionnels actifs avec Lef/Tcf. Une des meilleures façons de détecter, si la voie de signalisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine est activée, est de visualiser la localisation subcellulaire de la protéine  $\beta$ -caténine en immunohistochimie. Chez le poulet, lorsque le derme n'est pas encore condensé au niveau des futures ptéryles, la  $\beta$ -caténine est membranaire dans les cellules ectodermiques (Noramly et al., 1999). Lorsque les primordia plumaires commencent à se former, la  $\beta$ -caténine est cytoplasmique et nucléaire dans l'épiderme aussi bien folliculaire qu'interfolliculaire. Ce marquage cytoplasmique et nucléaire se restreint ensuite aux cellules épidermiques de la placode. Dans la condensation dermique naissante, la  $\beta$ -caténine est présente de façon cytoplasmique, mais non nucléaire. Le marquage devient nucléaire lorsque le bourgeon plumaire commence à présenter un axe antéro-postérieur, dans les cellules les plus antérieures de la placode, et dans les cellules postérieures de la condensation dermique (Noramly et al., 1999). Cette activation d'abord uniforme pourrait être la conséquence du **signal inducteur issu du derme** connu pour précéder la formation des primordia de phanère. Dans l'embryon de souris, Wnt10b est initialement exprimé uniformément dans l'épiderme puis surexprimé dans les placodes (Reddy et al., 2001), alors que chez le poulet Wnt7a joue ce rôle (Widelitz et al., 1999). La surexpression d'une forme constitutivement active de la  $\beta$ -caténine (forme protéique ne contenant pas le site de phosphorylation nécessaire à sa dégradation protéosomique) dans l'ectoderme, grâce au rétrovirus RCAS, conduit à la formation de bourgeons plumaires supplémentaires entre les bourgeons endogènes, ainsi que dans les zones semi-aptériques (Noramly et al., 1999). Cela montre **qu'une activation locale de la  $\beta$ -caténine suffit à générer une placode capable de recruter des cellules dermiques pour former un bourgeon plumaire.**

La présence de protéines régulatrices de la voie de signalisation Wnt lors de la morphogenèse du poil, a été mise en évidence. Parmi eux, les molécules Dickkopf (Dkk) sont des facteurs sécrétés qui inhibent la signalisation Wnt par leur fixation sur le co-récepteur LRP (Nusse, 2001). La surexpression de Dkk-1, dans la peau embryonnaire de poulet, empêche la formation de primordia de phanère (Chang et al., 2004). De même, les souris transgéniques exprimant Dkk-1, sous l'influence du promoteur de la Kératine K14 dans la couche basale de l'épiderme, ne présentent pas de poils de pelage, ni de vibrisses, dès le premier cycle pileux (Andl et al., 2002). Ces résultats confirment **l'hypothèse qu'un message de type Wnt issu du derme pourrait provoquer l'initiation des primordia de phanères.**



**Figure 13 : Voies de signalisation médiées par les Wnts.**

- **La voie canonique.** Sans activation du récepteur Frizzled (Fz), la Glycogène Synthase Kinase-3 (GSK-3) phosphoryle la  $\beta$ -caténine et un complexe  $\beta$ -caténine phosphorylée/GSK-3/APC se forme et est dégradé par voie protéosomale. La fixation d'une protéine Wnt au récepteur Fz, sur le Cystein-Rich Domain (CRD) et au co-récepteur LRP, active la protéine Dishevelled (Dsh) qui inhibe GSK-3. La  $\beta$ -caténine s'accumule dans le cytoplasme et peut être transloquée vers le noyau où elle s'associe au T-Cell Factor (TCF), ce complexe joue un rôle actif sur la transcription.
- **La voie calcique.** Les récepteurs Fz peuvent aussi activer une protéine G à laquelle ils sont associés. Celle-ci active la Phospholipase C (PLC), à l'aide de messagers secondaires (IP<sub>3</sub>, inositol triphosphate, DAG, diacylglycérol PKC, protéine kinase C) la concentration calcique intracellulaire augmentera fortement, modifiant le transcriptome et le comportement cellulaire.
- **La polarité planaire cellulaire (PCP).** Les récepteurs Fz peuvent aussi activer la formation d'un complexe Dsh/Daam1/RhoA qui pourra interagir directement sur les protéines dites « Cadherin-like » telles que Strabismus (Stbm) ou Flamingo (Fmi) ainsi qu'avec le cytosquelette par le biais de RhoA ou des Jun Kinases (JnK).

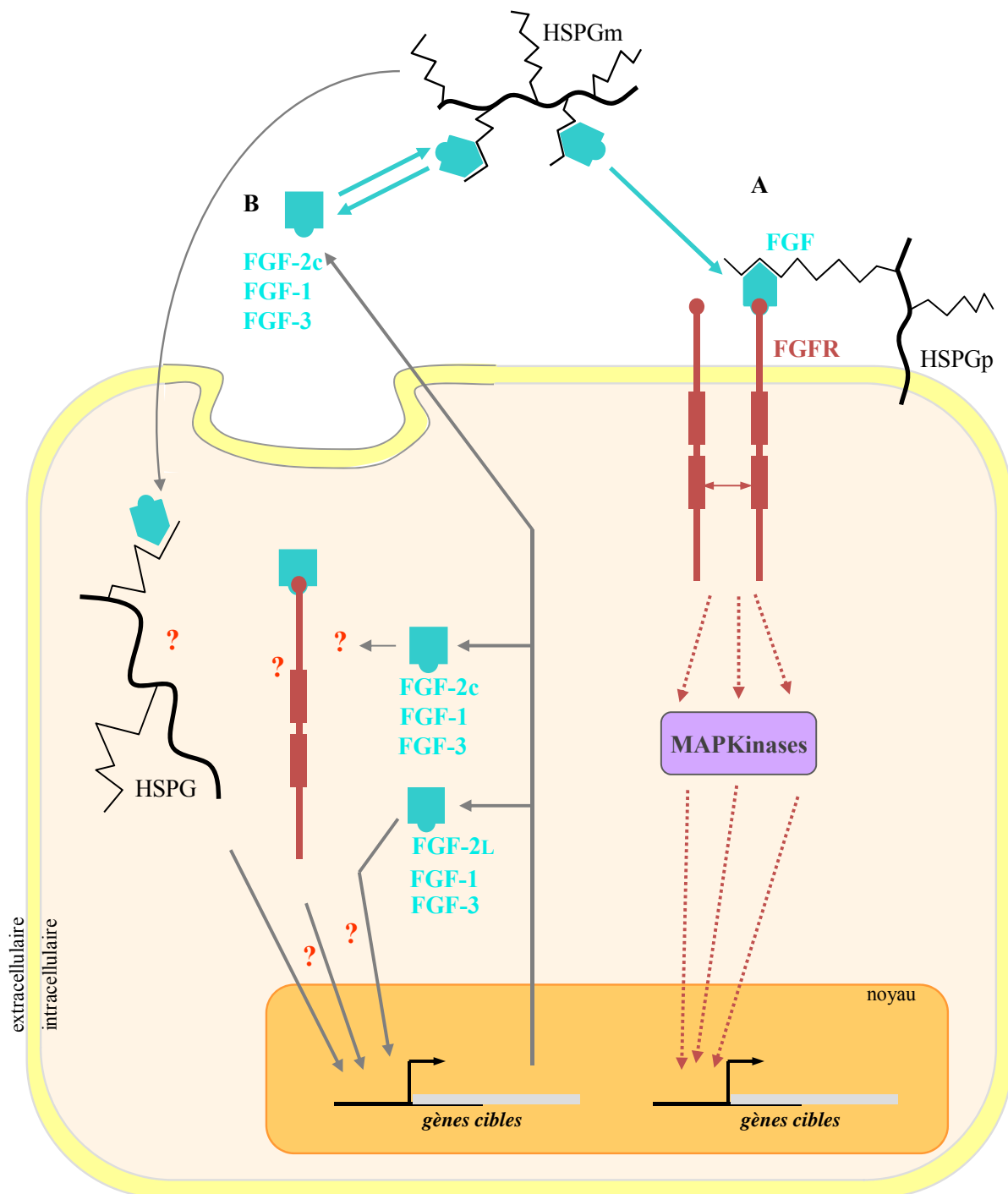
La restriction de l'activation de la  $\beta$ -caténine dans la placode pourrait se faire suite à l'inhibition réciproque de FGF-4 et BMP-2 dans l'épiderme interplacodal. Des systèmes d'interactions identiques entre ces trois types de signaux ont déjà été décrits dans d'autres contextes de développement (LaBonne and Bronner-Fraser, 1998; McGrew et al., 1997; Yang and Niswander, 1995).

#### 4.4.2. Expression et rôle des FGFs

La signalisation par les facteurs diffusibles FGF (Fibroblast Growth Factors) requiert la participation de trois familles de protéines transmembranaires : des récepteurs de forte affinité à activité tyrosine kinase (FGFR), des récepteurs de forte affinité sans activité tyrosine kinase, riches en cystéines (CFR : chicken cystein rich fibroblast growth factor receptor), et des protéoglycanes à sulfate d'héparane (récepteurs de basse affinité, HSPGs) (Fernig and Gallagher, 1994). Les FGFs sont capables de déclencher deux processus de signalisation : l'activation par l'intermédiaire de leurs récepteurs d'une cascade de protéines transductionnelles et de seconds messagers conduisant à l'activation de gènes, et l'activation directe de plusieurs cibles nucléaires par transfert des FGFs dans le noyau (Fig. 14).

Les associations de derme de patte d'embryon Scaleless (souche mutante de poulet présentant une absence totale d'écaillés et presque totale de plumes), de 7,5 jours à 11,5 jours, avec de l'épiderme de souche sauvage ont mis en évidence que le derme ne pouvait acquérir ses capacités inductrices que s'il était rendu compétent par l'épiderme avant le neuvième jour (Dhouailly and Sawyer, 1984). Le rôle précoce de la voie de signalisation FGF a pu être mis en évidence grâce à la restauration de la formation des bourgeons plumaires lors de l'application d'une bille de FGF-2 sur un explant de peau embryonnaire Scaleless (Crowe et al., 1998; Song et al., 1996; Viallet et al., 1998b). Cependant, l'application de FGF-2 n'induit pas la formation de primordia sur un explant de peau d'embryon Scaleless, issu de la zone médioventrale non phanérologène, qui présente un derme à fibroblastes épars (Dhouailly et al., 1998). Inversement, l'application de FGF-1, 2 ou 4 sur une peau de semi-aptérie (présence d'un derme semi-dense) provoque la formation de plumes (Chuong et al., 1996a; Jung et al., 1998a; Widelitz et al., 1996b). Chez la souris une mutation entraînant une perte de la fonction dans le gène du récepteur *fgf2-IIIB* empêche le développement normal de la peau et du follicule pileux (Li et al., 2001).

Chez le poulet, l'un des premiers marqueurs exprimés dans la peau avant la formation des primordia plumaires, est FGF-4, présent tout d'abord dans l'épiderme de façon diffuse, puis cette expression devient périodique dans les placodes qui commencent à se former, et enfin dans les condensations dermiques au moment où elles apparaissent (Chuong et al., 1996b; Jung et al., 1998b; Nohno et al., 1995a; Widelitz et al., 1996a). Les FGFs, exprimés au départ de façon homogène dans l'épiderme (du moins pour FGF-4) ne sont donc pas des "inducteurs de phanère", mais ont un **rôle uniquement permissif** sur la formation de ceux-ci, le derme ayant déjà acquis son identité phanérologène liée à sa densité à un stade antérieur.



**Figure 14 : Voies de signalisations médiées par le FGF.** (Modifié d'après Blanquet, 1995).

- **Activation indirecte.** Les HSPGp stockent et déstockent les FGFs. Les HSPG pourraient agir en modifiant la conformation des FGFs. Cette activation peut entraîner l'activation d'une ou plusieurs cascades interdépendantes de transmission du signal et de messagers secondaires comprenant les MAPKineses.

- **Activation directe.** Certaines formes de FGFs sont sécrétées, d'autres restent dans le cytoplasme et agissent sur des cibles inconnues. Certaines formes sont directement transférées dans le noyau. Les formes extracellulaires sont, soit stockées par les HSPGm, soit internalisées, probablement par les FGFR et les HSPG, et transportées dans le noyau.

FGF-2c, forme courte du FGF-2 ; FGF-2L, forme longue du FGF-2 ; HSPGm, protéoglycane à sulfate d'héparane de la matrice extracellulaire ; HSPGp, protéoglycane à sulfate d'héparane membranaires.

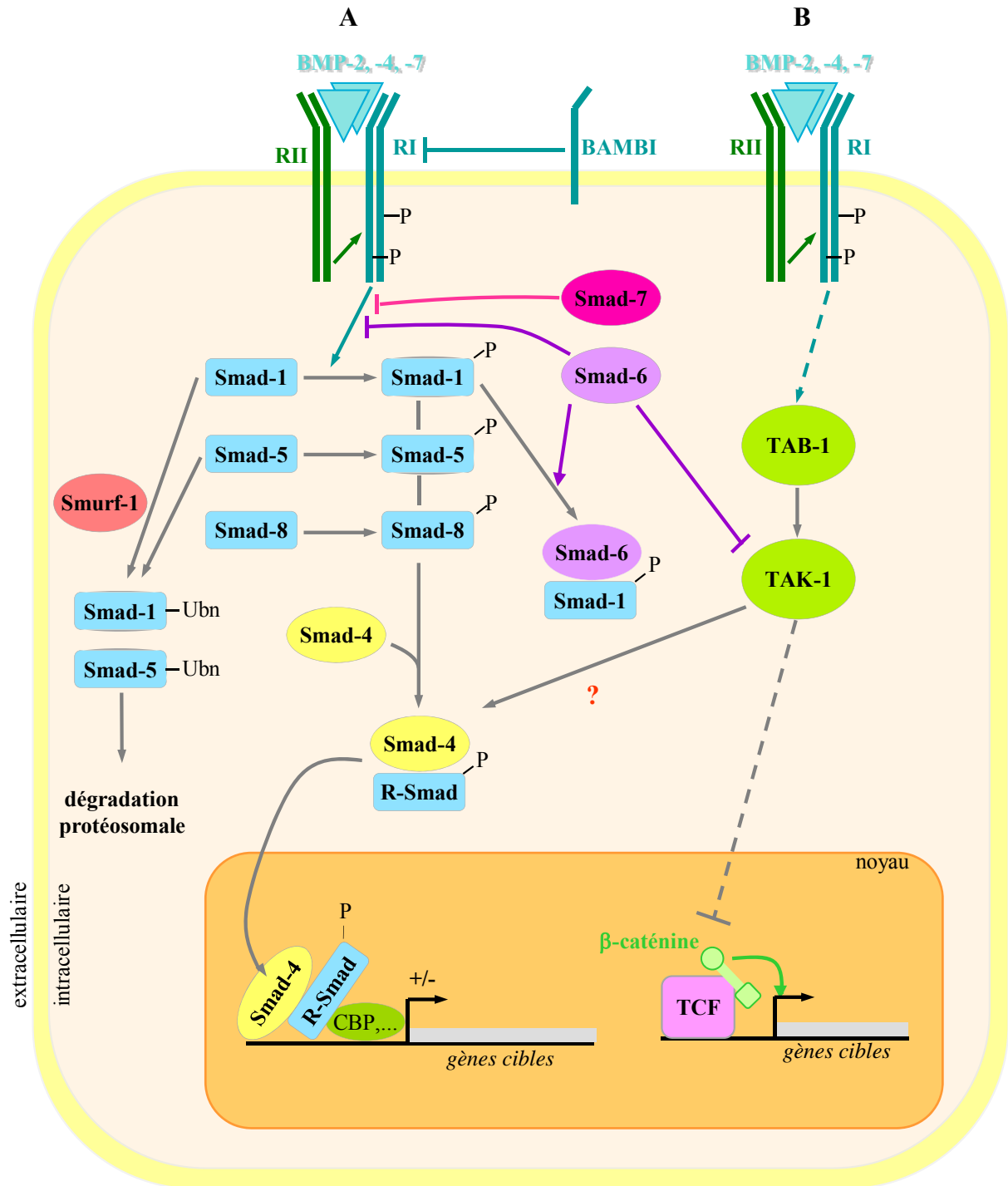
#### 4.4.3. Expression et rôle des BMPs

Les membres de la famille des BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) sont considérés comme des **inhibiteurs de la formation des phanères**, bien qu'ils y soient paradoxalement exprimés (Noramly and Morgan, 1998b). Les BMPs, à l'exception de BMP-1, font partie de la grande famille des « Transforming Growth Factors » (TGF- $\beta$ ), qui comprend également les TGF- $\beta$  et les Activines. La transduction du signal est déclenchée par la fixation de l'homodimère de BMP sur son récepteur de type II, ce dernier recrutant ensuite un récepteur de type I (Fig.15). Ces récepteurs sont des récepteurs transmembranaires sérine /tyrosine kinase qui vont activer soit la voie canonique médiée par les Smads, soit la voie des MAP Kinases, ces deux voies conduisant à la régulation de gènes cibles.

Parmi les nombreux membres de cette famille, BMP-2, BMP-4 et BMP-7 jouent un rôle dans la formation des primordia. Après une expression diffuse dans l'ectoderme préplacodal, l'expression de BMP-2 se restreint dans la placode puis s'étend au mésenchyme (Chuong et al., 1996b; Nohno et al., 1995a; Noramly and Morgan, 1998a). BMP-4 n'est pas exprimé dans la placode mais est présent dans le derme durant les premières étapes de la formation de la condensation (Noramly and Morgan, 1998a; Widelitz et al., 1997). BMP-7, quant à lui, est exprimé dans tout l'épiderme préplacodal puis dans le mésenchyme, avant la formation de la condensation dermique, sous l'induction de la voie Wnt canonique (Harris et al., 2004) et cette expression perdure après la formation du primordium (Patel et al., 1999a). Le rôle d'inhibiteur des BMPs a été attribué après des expériences *in vivo* et *in vitro* montrant que la surexpression de BMP inhibe la formation des primordia de phanère. En effet, la surexpression de l'un des BMP, par infection virale ou par application de billes chargées en BMP, conduit à une inhibition de la formation des placodes au niveau de la peau embryonnaire de poulet (Noramly and Morgan, 1998b; Jung et al., 1998a; Patel et al., 1999a). Paradoxalement à leur rôle d'inhibiteur de la mise en place des phanères qui leur a été attribué, l'application d'une bille faiblement chargée de BMP-2 à un stade précoce chez le poulet conduit à la mise en place d'un derme dense phanèrogène ectopique au niveau d'une semi-aptérie (Scaal et al., 2002). Ce résultat pourrait suggérer un rôle positif sur la maturation du derme. De plus, la perte d'expression de BMP-7 empêche la mise en place du primordium de phanère (Harris et al., 2004).

La formation des primordia de phanère nécessiterait donc l'inhibition de la signalisation BMP grâce à des molécules inhibitrices qui ont la capacité de capter les molécules de BMP et de les empêcher de se fixer à leurs récepteurs. Parmi ces inhibiteurs des BMPs, Noggin et la follistatine sont exprimés au niveau du follicule mais pas dans la partie interfolliculaire. L'expression ectopique de Noggin entraîne la formation de follicules ectopiques chez la souris et chez le poulet (Noramly and Morgan, 1998b). Chez les souris déficientes pour Noggin, un développement anormal des follicules est observé accompagné d'une réduction du nombre total de follicule (Botchkarev et al., 1999). La Follistatine, un inhibiteur direct des BMPs, est exprimée dans la placode en formation en même temps que BMP-2 (Patel et al., 1999b). Son expression est ensuite restreinte aux cellules périphériques de la placode. Les molécules de Follistatine sont capables de se lier aux sulfates d'héparane (Hashimoto et al., 1997) et pourraient être retenues par la matrice extracellulaire au niveau des placodes. Elles





**Figure 15 :** Voies de signalisation médiées par les BMPs (modifiées d'après von Bubnoff, 2001).

- **Voie canonique (A).** Un dimère de BMP se lie aux récepteurs, induisant la phosphorylation du récepteur de type I (RI) par le récepteur de type II (RII). Le RI phosphoryle alors les R-Smads (1, 5, 8) qui s'associent à Smad-4. Le complexe R-Smad/Smad-4 est transloqué dans le noyau où il s'associe à des régulateurs de transcription tels que p300 ou CBP, ce qui conduit à l'activation ou à la répression de la transcription de gènes cibles.

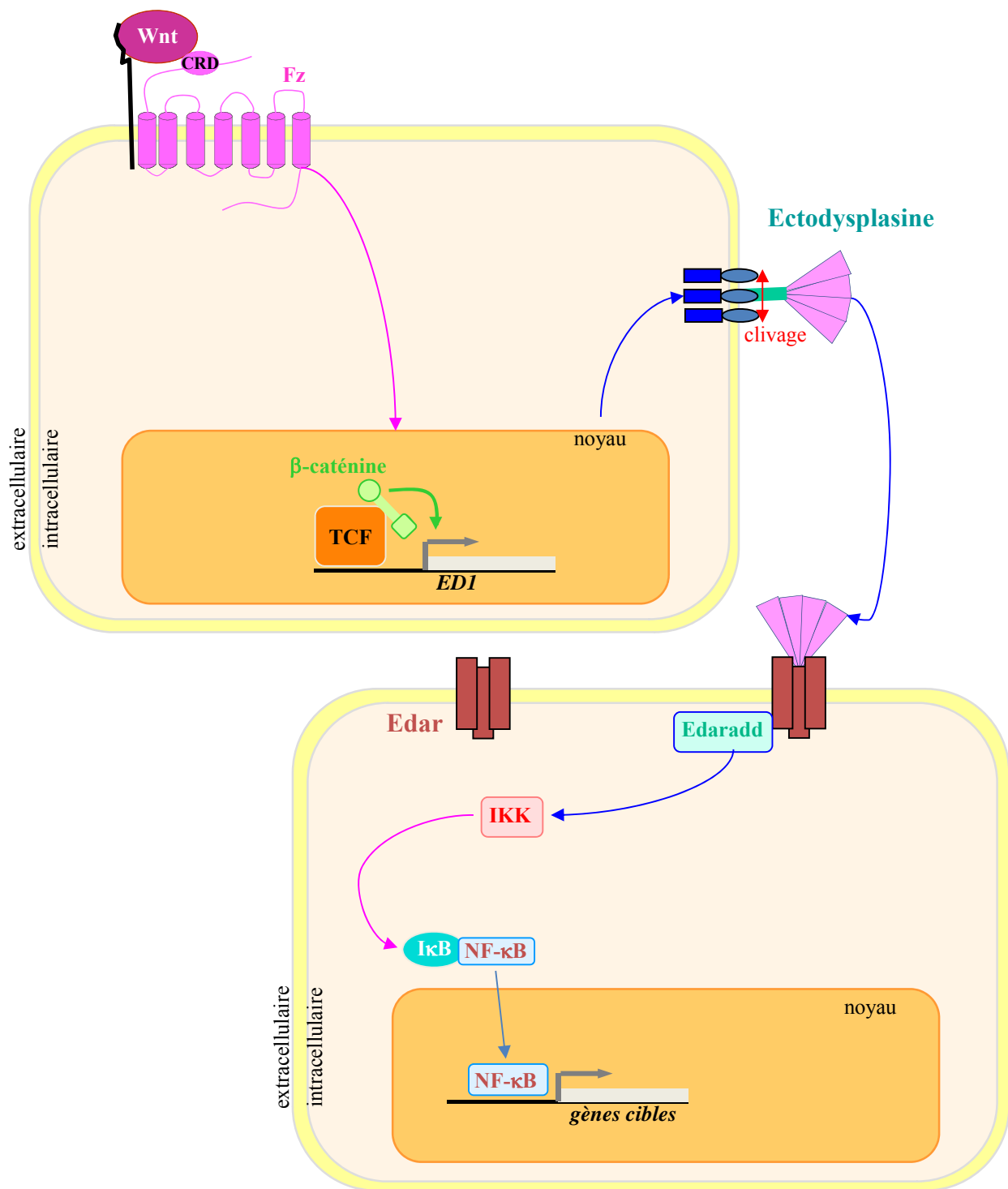
- **Voie des MAP Kinases (B).** L'engagement de RI et RII active la MAPKKK TAK-1 via l'activation de TAB-1, ce qui déclenche une cascade d'activations conduisant à l'inhibition de la capacité de liaison à l'ADN du complexe TCF/b-caténine. TAK-1 activée pourrait interagir avec la voie BMP-Smads (point d'interrogation). Smad-6 et Smad-7 peuvent s'associer à RI et empêcher la phosphorylation des R-Smads et l'activation de TAK-1. Smad-6 peut également entrer en compétition avec Smad-4 et s'associer à Smad-1 phosphorylé pour l'inactiver. Smurf-1 conduit à l'ubiquitination et la dégradation de Smad-1 et Smad-5. BAMBI a la même structure que les récepteurs des BMPs mais n'est pas capable de transduire le signal.

antagoniseraient localement les molécules de BMP-2 qui diffuseraient plus largement et permettraient la formation de la placode.

Les rôles précis de chacun des BMPs, dans la cascade de signalisation induisant la formation d'un follicule pileux ou plumaire, n'étaient donc pas encore bien définis et **certains résultats étaient contradictoires**. Lors de mes premiers travaux de thèse qui seront présentés par la suite, j'ai participé en collaboration avec F. Michon à une meilleure compréhension du rôle des différents BMPs impliqués dans la formation du primordium plumaire. Nous avons montré (Michon, Forest, Collomb et al., 2008) que contrairement au dogme accepté jusqu'alors, ils sont en fait requis pour la formation de la condensation dermique.

#### 4.4.4. Expression et rôle de la voie de signalisation de l'ectodysplasine (EDA)

Une malformation héréditaire affectant à la fois les follicules pileux, les dents et les glandes sudoripares est connue dans l'espèce humaine. Son étude a mené à la découverte d'une autre voie de signalisation principale lors du développement embryonnaire de la peau et des dents. L'ectodysplasine Eda et son récepteur Edar appartiennent à la famille des TNF (Tumor Necrosis Factor). Le facteur Eda est une protéine trimérique transmembranaire dont le clivage de la partie extracellulaire conduit au relargage du ligand (Fig. 16). Sa fixation à son récepteur Edar active les voies de signalisation, dont la plus classique conduit à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Kumar et al., 2001; Yan et al., 2000). Chez la souris, les deux gènes sont exprimés de façon ubiquitaire dans l'épithélium avant la formation de la placode (Mikkola et al., 1999). L'absence de l'un de ces gènes, par knock-out, affecte directement la morphogenèse des follicules pileux et des dents (Headon and Overbeek, 1999; Mikkola et al., 1999; Srivastava et al., 1997). Ces études montrent que cette voie de signalisation serait impliquée très précocement en réponse au premier message dermique ubiquitaire et serait **responsable de la formation de la placode épidermique**. Cette voie de signalisation interagit avec d'autres voies, en particulier la voie Wnt qui serait en amont et régulerait l'expression d'Eda. En effet, l'absence de Lef-1, le facteur de transcription co-activateur avec la  $\beta$ -caténine des gènes cibles induits par la signalisation Wnt, conduit à l'absence d'expression d'Eda dans l'épiderme. Ce résultat suggère que l'expression d'Eda, qui possède un site de liaison de Lef-1 sur son promoteur, est sous le contrôle de la signalisation Wnt (Pinheiro and Freire-Maia, 1994). Wnt-6 serait un candidat potentiel, puisqu'il est capable d'induire sur des explants de peau ou de dent l'expression d'Eda, contrairement aux signalisations BMP, FGF et Shh (Laurikkala et al., 2001; Laurikkala et al., 2002). Parmi les voies de signalisation régulées par la signalisation Eda/Edar, la voie Wnt10b serait induite directement ou indirectement puisque son expression est abolie dans les souris déficientes pour EdaA1 (Andl et al., 2002). De plus, Eda inhibe la signalisation de BMP-4 en induisant l'expression de deux inhibiteurs, Ccn2/Ctgf (CCN family protein 2 / Connective Tissue Growth Factor) et la Follistatine. L'activation de NF- $\kappa$ B induit l'expression de Shh (Pummila et al., 2007). Cependant, les interactions entre Eda et BMP4 sont sans doute encore plus complexes, car il vient d'être montré dans le laboratoire (Thèse S. Cadau, octobre 2010)



**Figure 16 : Voie de signalisations médiées par l'Ectodysplasin** (modifiée d'après Thesleff, 2002).

L'expression du gène ED-1 est induite par la signalisation Wnt. Ce gène code pour un facteur membranaire, l'Ectodysplasin (Eda). Son clivage est requis pour son activité. Une fois sous forme diffusible, Eda pourra se fixer sur son récepteur (Edar). Cette fixation permet le recrutement intracellulaire de la protéine adaptatrice Edaradd. Celle-ci activera la protéine IKK nécessaire à la déséquestration du facteur de transcription NF-κB par I-κB. NF-κB pourra alors se transloquer vers le noyau où il activera la transcription de gènes cibles.

que l'expression de BMP4 à l'emplacement de la future condensation dermique chez l'embryon de souris précède celle du récepteur EdaR dans la placode.

#### 4.4.5. Expression et rôle du système Notch / Delta

Chez la drosophile, la régularité du pattern des soies tégumentaires dorsales résulte d'un mécanisme d'interaction cellule-cellule faisant intervenir des protéines transmembranaires Notch et Delta (Heitzler et Simpson, 1991). Elles sont impliquées dans le déterminisme cellulaire. La voie de signalisation du récepteur Notch est activée lorsque la partie extracellulaire de celui-ci s'associe à ses ligands Delta ou Serrate/Jagged. L'interaction ligand-récepteur entraîne la protéolyse de la partie intracellulaire de Notch, qui est transloquée dans le noyau où elle s'associe au facteur de transcription RBPJk appelé Suppressor of Hairless (Su(H)) chez la Drosophile et le Xénope, Lag-1 chez *C. elegans*, et CBF1/RBP-Jk chez les mammifères, communément appelées les protéines CLS. Elles sont initialement des répresseurs de la transcription et deviennent des activateurs de transcription lorsqu'elles sont associées au domaine intracellulaire de Notch (Hsieh et al., 1996).

Des expérimentations menées dans notre laboratoire ont montré que diverses protéines du système Notch sont exprimées dans le primordium de vibrisse chez l'embryon de souris (Favier et al., 2000). La **ségrégation des cellules de la placode épidermique** est induite par l'expression de Notch-1 et Serrate-2. Le ligand Serrate-2 est exprimé par les cellules de la placode à l'exclusion de celles exprimant Notch-1. Ce dernier étant exprimé par les cellules les plus au centre la placode, mais aussi par les cellules épidermiques du domaine interfolliculaire. De plus, la **ségrégation des cellules de la condensation dermique** implique également l'expression de Notch-1 et de Delta-1 dans la condensation dermique, et du récepteur Notch-2 par les cellules dermiques interfolliculaires. L'expression de Notch-1 dans l'épiderme et le derme, est faible au stade du primordium, puis est renforcée lors de la croissance du bourgeon plumaire (Chen et al., 1997). La voie de signalisation FGF, en particulier FGF-2, contrôlerait l'expression de Delta-1 (Viallet et al., 1998a).

#### 4.4.6. Expression et rôle de Shh

Sonic hedgehog (Shh) fait partie de la famille des protéines sécrétées Hedgehog qui comprend un seul membre chez la drosophile (Hh) et trois chez les mammifères et les oiseaux (Sonic, Indian et Desert hedgehog) (Hammerschmidt et al., 1997). Le facteur Shh peut agir soit à courte distance, soit à longue distance en tant que morphogène diffusible (Chuang and McMahon, 1999; Johnson and Tabin, 1995). Shh, en se fixant à la protéine transmembranaire Patched, empêche cette dernière d'inhiber la protéine transmembranaire Smoothed, lui permettant ainsi d'activer la voie de transduction médiée par les protéines Gli-1 et Gli-3. Ces deux protéines Gli respectivement activent ou répriment la transcription de gènes cibles (Wang et al., 2000). Des études ont montré que l'expression du gène Shh faisait suite à la voie Wnt. Ainsi, des souris KO pour le gène de la  $\beta$ -caténine perdent l'expression du gène Shh au niveau des follicules pileux (Huelsen et al., 2001).

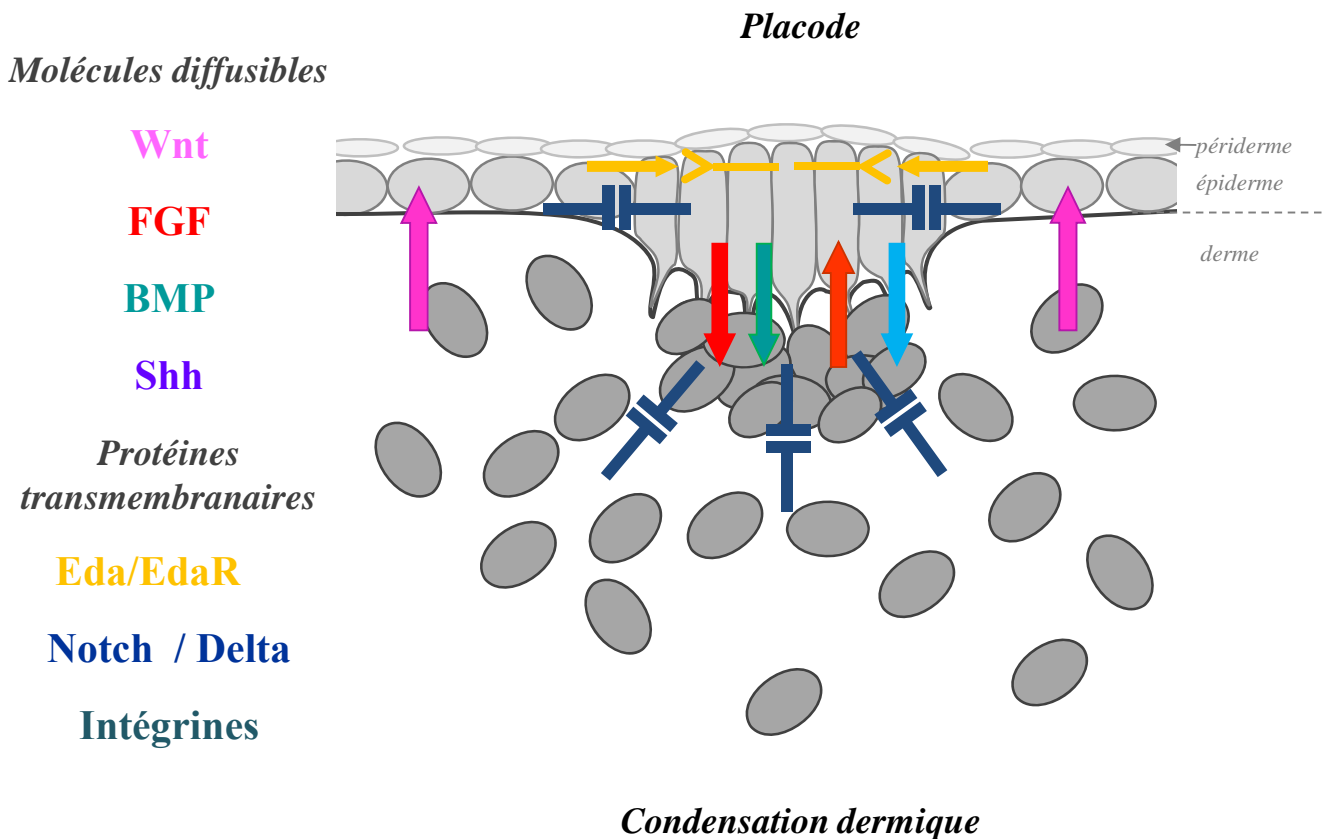
Shh joue un rôle tardif dans la morphogenèse du primodium pileux en n'étant exprimé qu'au centre de la placode une fois le primodium formé (Nohno et al., 1995b). De même, Shh n'est observé dans la peau de poulet qu'après l'activation de BMP-2 dans la placode et celle de BMP-4 dans la condensation dermique (Morgan et al., 1998). Son rôle serait l'induction de la **prolifération cellulaire** conduisant à la formation du bourgeon pileux (McKinnell et al., 2004) ou plumaire. Les souris transgéniques déficientes pour Shh présentent des bourgeons pileux arrêtés, confirmant le rôle de Shh dans l'élongation des bourgeons de phanères (Chiang et al., 1999). La surexpression de Shh dans l'épiderme de l'embryon de poulet, grâce au rétrovirus aviaire RCAS, aboutit à une prolifération anarchique de l'ectoderme (Morgan et al., 1998). Bien que l'expression de Shh se restreigne à l'épiderme folliculaire, son récepteur Patched 1, qui y est exprimé, est également exprimé dans la condensation dermique, suggérant un rôle de Shh dans ces deux structures.

#### **4.4.7. Synthèse des principales interactions conduisant à la formation d'un primordia de phanère**

La formation d'un primodium de phanère fait intervenir des messages intra- et inter-tissulaires (Fig. 17) avec un jeu de balance entre des activateurs et des régulateurs. L'initiation de la formation des placodes au sein de l'épiderme se fait par un premier message inducteur homogène du derme dense, sans doute un Wnt. S'en suit l'expression d'Eda dans l'épiderme qui, interagissant avec Edar, est responsable de la formation de la placode épidermique. L'expression par cette dernière de FGF-4, à destination du derme dense, est un message permissif indispensable à l'organisation dermique. La formation de la condensation dermique fait intervenir différentes voies de signalisation (BMP, Notch...) dont la régulation fine est assurée par la présence d'inhibiteurs. La transformation du primodium en phanère se réalise à l'aide des dialogues intra- et inter-tissulaires. Une des hypothèses actuelles est que l'initiation et l'espacement des primordia sont régulés par des ratios relatifs entre des molécules diffusibles activatrices et inhibitrices.

### **4.5. LA SÉGRÉGATION DES CELLULES SOUCHES ÉPIDERMIQUES**

La niche des cellules souches épidermiques folliculaires du bulge est indispensable au déroulement des cycles pilaires et constitue un réservoir crucial en cas de blessure. Au niveau des vibrisses, chez les rongeurs, le bulge est signalé par un renflement de la gaine épidermique externe qui apparaît tôt au cours du développement. Au niveau du pelage de souris, le bulge ne devient anatomiquement apparent que trois semaines après la naissance, au début du premier cycle pilaire. Le facteur de transcription Sox9 est exprimé dans le bourgeon pileux puis son expression se restreint à la gaine folliculaire externe (Vidal et al., 2005). L'équipe de E. Fuchs (Nowak et al., 2008) a montré que l'ablation spécifique de ce gène n'empêche pas la formation des follicules pileux au cours de l'embryogenèse mais leur renouvellement lors du premier cycle pileux. L'expression de Sox9 est donc requise pour la ségrégation des cellules souches pour former la niche du bulge. Elle est présente très précocement dans la couronne périphérique de la placode pilaire (S. Cadau, thèse octobre 2010 dans notre laboratoire).



**Figure 17:** Synthèse du dialogue moléculaire entre les principales voies de signalisation impliquées dans la mise en place du primordium de phanère.

La formation du primordium de phanère fait intervenir des dialogues intra- et inter-tissulaires. Les voies de signalisation Wnt, FGF et BMP sont les voies principales impliquées dans l'interaction entre l'épiderme et le derme dense. La formation de la placode et la délimitation de celle-ci nécessitent les voies de l'ectodysplasine et de Notch. La mise en place de la condensation dermique, quant à elle, nécessite une migration cellulaire, impliquant des molécules d'adhérence, les Intégrines, ainsi que la matrice extracellulaire qui joue un rôle important dans ce processus, comme cela a été montré au sein du laboratoire (Michon et al, 2007).

## **5. FORMATION DE L'ŒIL**

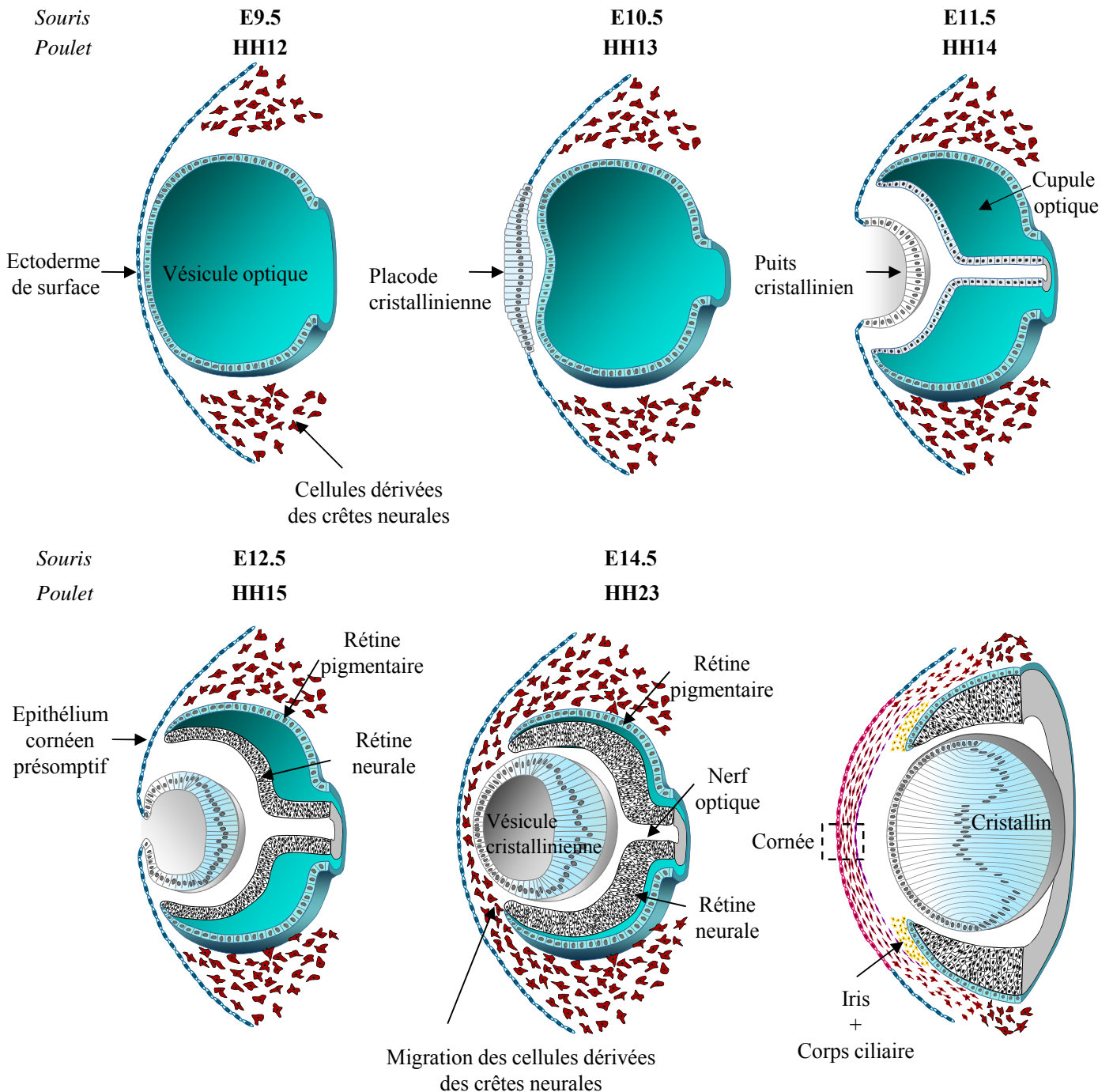
La morphogenèse de l'œil comme celle de la peau fait intervenir des interactions cellulaires, cette fois entre deux épithélia, l'ectoderme qui recouvre la surface de l'embryon et le neuroderme qui forme les vésicules optiques, et un mésenchyme, qui est issu des crêtes neurales.

### **5.1. LA STRUCTURE DE L'ŒIL ADULTE**

L'œil est formé de trois entités principales: la cornée, le cristallin et la rétine (Fig. 5). La cornée, la plus en surface, est prolongée vers sa partie postérieure par la sclérotique, qui est l'armature fibreuse de l'œil. L'épithélium limbique qui est en périphérie de la cornée est en continuité avec l'épithélium conjonctival qui recouvre à l'avant la tunique conjonctive et tapisse l'intérieur des paupières. Ces dernières sont recouvertes à l'extérieur par l'épiderme. La choroïde est un tissu conjonctif pigmenté très vascularisé tapissant la sclérotique et assurant la nutrition de l'iris et des photorécepteurs rétinien. La choroïde se prolonge dans sa partie antérieure par les corps ciliaires et l'iris, un tissu en forme de disque constitué de cellules musculaires lisses, de mélanocytes et percé en son centre d'une ouverture, la pupille, permettant l'entrée de la lumière dans l'œil. En arrière de la cornée et de l'iris, se trouve le cristallin, transparent et biconvexe, suspendu par des ligaments issus des corps ciliaires. La chambre antérieure qui constitue l'espace entre la cornée et l'iris est remplie d'un fluide transparent, l'humeur aqueuse. L'arrière du cristallin est en contact avec l'humeur vitrée, matrice extracellulaire gélatineuse et transparente. Tapissant l'intérieur de l'œil et en contact direct avec l'humeur vitrée, la rétine se distingue en deux entités : la rétine pigmentaire, un épithélium constitué d'une monocouche de cellules qui repose sur la choroïde et la rétine neurale ou neurorétine, constitué des différentes couches de neurones qui, via les photorécepteurs, traduisent puis véhiculent le signal lumineux en influx nerveux qui se propagera par l'intermédiaire du nerf optique.

### **5.2. LES PRINCIPALES ÉTAPES DE LA MORPHOGENÈSE DE L'ŒIL**

Les vésicules optiques sont formées par évaginations bilatérales du neuroderme du prosencéphale. Après subdivision de ce dernier, elles demeureront rattachées au diencephale par les pédoncules optiques qui donneront la gaine des nerfs optiques. Les principales étapes sont représentées dans la figure 18. A 9 jours de développement chez la souris et à 2 jours chez le poulet (stade HH11, d'après la table d'Hamburger Hamilton (Hamburger and Hamilton, 1992)), le neuroderme de la vésicule optique est étroitement accolé à l'ectoderme. Une troisième entité embryonnaire, présente en périphérie, est constituée des cellules issues par migration des crêtes neurales. À E9.5 chez la souris et à HH12 chez le poulet se produit des interactions réciproques clés, qui seront détaillées dans les paragraphes suivants, conduisant simultanément à la formation d'un épaissement au niveau de l'ectoderme, la placode cristallinienne, et au début de l'invagination de la vésicule optique en cupule optique. L'invagination du neuroderme se poursuit et conduit à la formation de la rétine neurale au niveau du feuillet intérieur de la cupule et la rétine pigmentaire au niveau du feuillet extérieur.



**Figure 18:** Les différentes étapes de la morphogenèse de l'œil.

La formation de l'œil commence par un contact étroit entre deux feuilletts embryonnaires, l'ectoderme et le neuroderme des vésicules optiques. En périphérie se trouvent les cellules dérivées des crêtes neurales. À la suite de cette interaction entre l'ectoderme et le neuroderme, s'en suivent simultanément la formation de la placode cristalliniene au niveau de l'ectoderme et l'invagination de la vésicule optique pour former la cupule optique. Cette dernière donne la rétine neurale et la rétine pigmentaire ainsi que, à partir de ses bords, l'iris et le corps ciliaire. La placode cristalliniene s'invagine et se détache pour former la vésicule cristalliniene qui donnera le futur cristallin. L'ectoderme restant donnera l'épithélium cornéen. Les cellules des crêtes neurales restées en périphérie migrent entre l'ectoderme et la vésicule cristalliniene pour former le stroma et l'endothélium cornéen. *Iconographie: E Collomb*



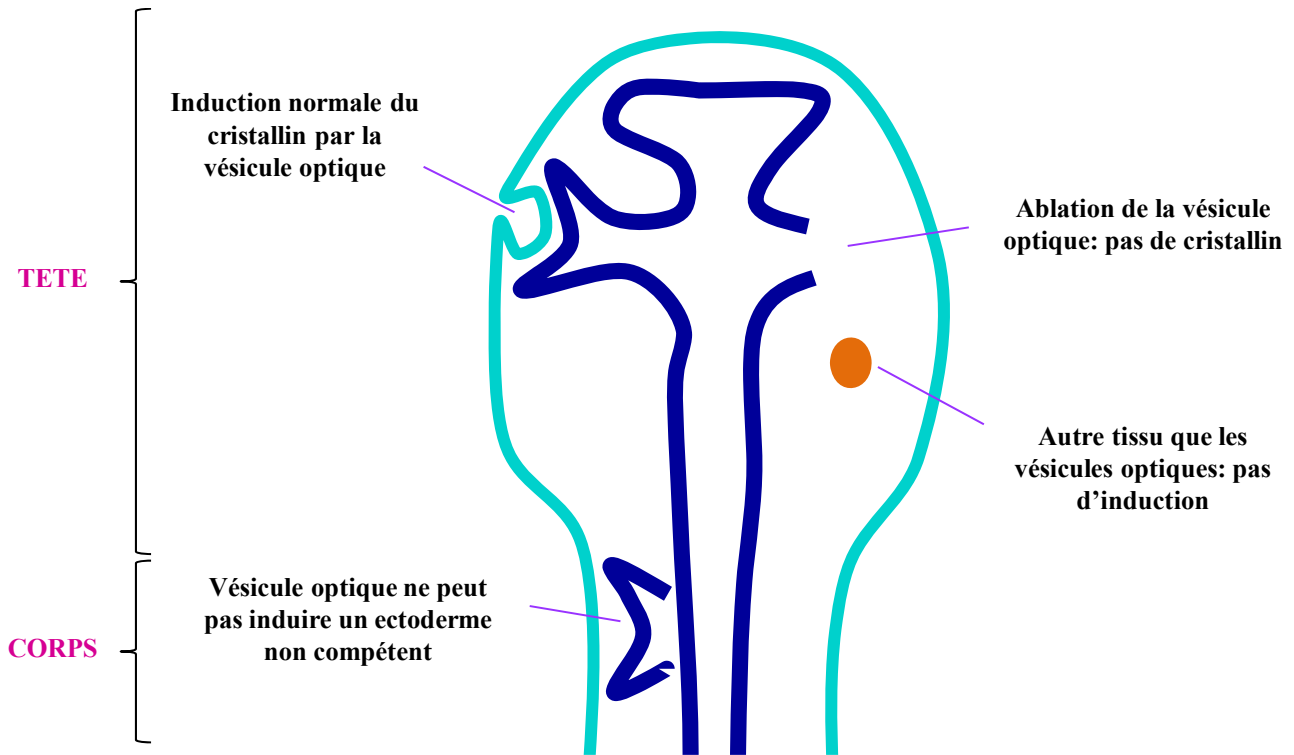
Les bords de la cupule optique vont contribuer à la formation de l'iris et du corps ciliaire. Parallèlement à la différenciation rétinienne, au stade E11.5 chez la souris et au stade HH14 chez le poulet, la placode cristallinienne s'invagine pour former un puits cristallinien. La vésicule cristallinienne se détache à 12.5 jours de développement chez la souris et à HH15 chez le poulet. L'ectoderme restant en surface formera l'épithélium cornéen. Dans un second temps, les cellules issues des crêtes neurales vont migrer dans l'espace entre l'épithélium cornéen présomptif et la vésicule cristallinienne pour former le mésenchyme cornéen ou stroma. Chez le poulet, à 5 jours de développement (HH23), cette migration se fait en deux vagues successives : la première sur un stroma acellulaire sécrété par l'épithélium cornéen présomptif permet la formation de l'endothélium cornéen et la deuxième vague migratoire s'effectue entre l'endothélium et l'épithélium cornéen et constitue les kératocytes du stroma. Chez la souris, la formation du stroma et de l'endothélium s'effectue simultanément à 14.5 jours de développement. Les cellules des crêtes neurales vont également participer à la formation de l'iris et du corps ciliaire, qui sont issus d'un repliement des bords de la cupule optique, ainsi qu'à la formation de la sclérotique.

### **5.3. LE JEU D'INDUCTIONS ENTRE LES DIFFÉRENTS TISSUS EMBRYONNAIRES**

La mise en évidence d'interactions entre l'ectoderme et le neuroderme fut la conséquence d'une série d'expériences chez l'amphibien réalisées par Spemann (1901) et Lewis (1904) (Fig.19). L'ablation du champ morphogénétique d'une vésicule optique chez une neurula, réalisée par Spemann, conduit à l'absence de formation d'une vésicule optique à ce niveau, mais aussi à l'absence de cristallin. L'ectoderme aurait donc besoin de la présence d'une vésicule optique pour se développer en cristallin. Lewis, quant à lui, a réalisé des greffes de vésicule optique, qui ont montré que la présence d'une vésicule optique induit la formation d'un cristallin au niveau de l'ectoderme sus-jacent, suggérant l'émission de facteurs diffusibles d'un cristallin. Cependant, l'induction de la formation d'un cristallin par la vésicule optique n'est possible qu'à partir d'ectoderme céphalique et ne donne aucun résultat lorsque la greffe est réalisée au niveau troncal (Grainger et al., 1988). Ceci sous-entend l'acquisition de la compétence par l'ectoderme céphalique à être induit par le neuroderme. Nous allons voir que cette compétence de l'ectoderme est acquise à un stade très jeune, au stade neurula, lors de la mise en place du domaine préplacodal. Les facteurs impliqués dans l'acquisition de cette compétence sont détaillés dans le paragraphe suivant.

### **5.4. LE DOMAINE PRÉ PLACODAL**

Les placodes sensorielles de la région céphalique sont une caractéristique majeure de l'embryon des vertébrés. Elles sont la contribution ectodermique aux organes récepteurs des systèmes sensoriels spéciaux: olfaction (épithélium olfactif du nez), vision (cristallin oculaire), audition et équilibre vestibulaire (oreille interne), ainsi que la ligne latérale chez les poissons et les larves d'amphibiens. Elles donnent également naissance aux ganglions trigéminaux et épibranchiaux. Le développement de ces différentes placodes se produit de façon similaire et a lieu très tôt au cours du développement.

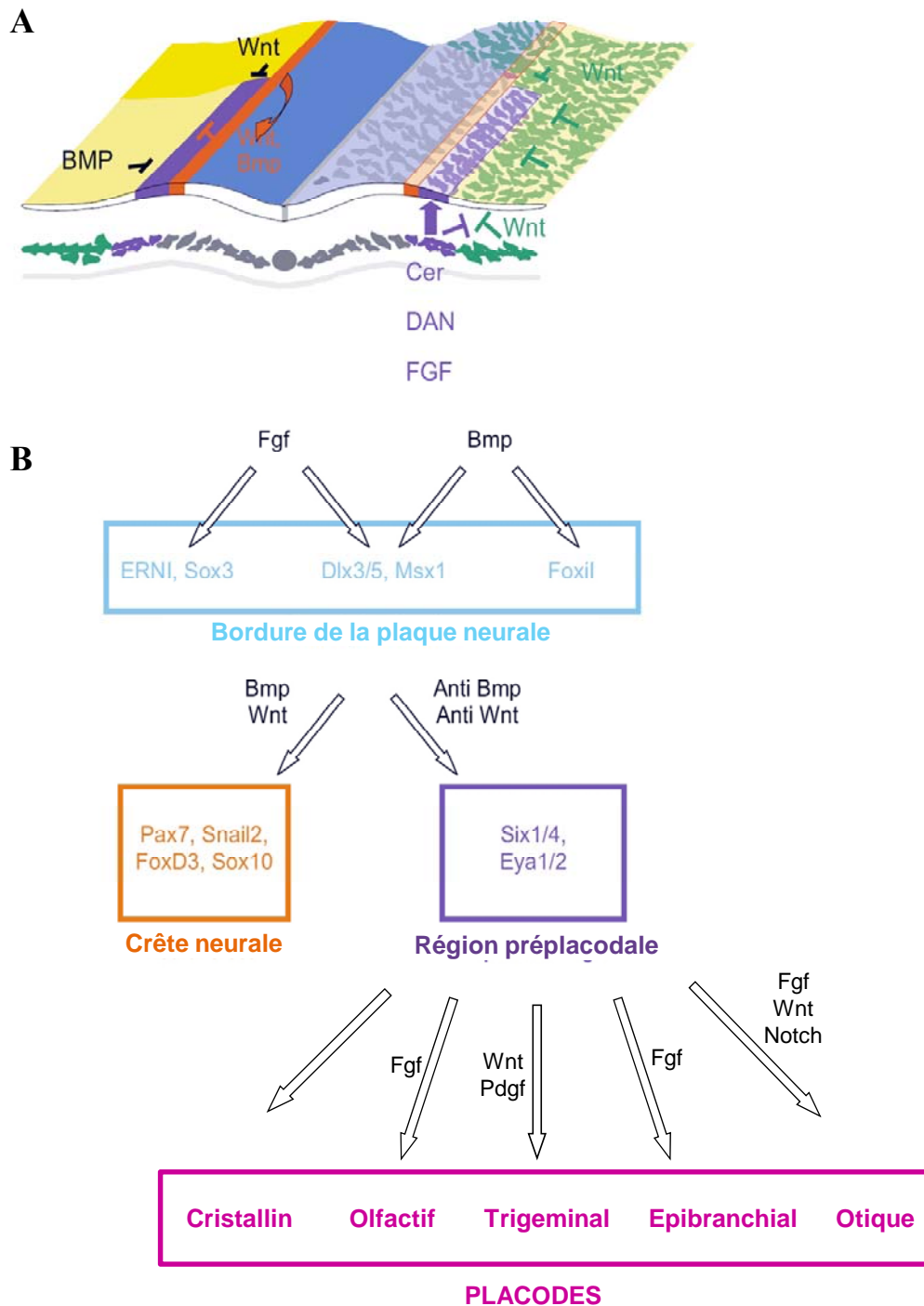


**Figure 19 :** La compétence ectodermale et sa capacité à répondre à son inducteur, la vésicule optique chez le Xénope : expériences de Spemann et Lewis.

La vésicule optique est capable d'induire un cristallin dans l'ectoderme céphalique, mais n'en est pas capable dans l'ectoderme du tronc. Si la vésicule optique est enlevée, l'ectoderme en surface ne forme pas de cristallin. Aucun autre tissu n'est capable de se substituer à la vésicule optique pour induire l'induction du cristallin. D'après Saha et al., 1989 ; Grainger, 1992.

Au cours de la neurulation, l'ébauche du système nerveux se met en place dans la partie dorsale de l'ectoderme de l'embryon. Elle débute avec l'épaississement de l'ectoderme dorsal qui forme la plaque neurale. La bordure épaissie de cette dernière constitue les crêtes neurales. Lorsque la plaque neurale s'incurve pour donner naissance au tube neural, peu après la fermeture de ce dernier, les crêtes neurales effectuent une transition épithélio-mésenchymateuse donnant naissance à une population migrante dont l'importance a été démontrée par le laboratoire de N. Le Douarin (Charrier et al., 2005). Parallèlement à la formation des crêtes neurales, l'ectoderme qui leur est contigu va acquérir une spécificité et constituer le domaine préplacodal. Ce domaine, qui correspond à une bande d'ectoderme qui entoure la plaque neurale du prosencéphale au rhombencéphale, contient des progéniteurs pluripotents dont dérivent les placodes sensorielles.

**Au cours de la neurulation, la formation de la région préplacodale** est initiée à travers une série d'événements qui va dans un premier temps définir le bord de la plaque neurale et ensuite subdiviser cette bordure en précurseurs de placode et de crêtes neurales. La ségrégation des domaines (Fig. 20) passe par des interactions avec les tissus environnants, qui sécrètent des facteurs diffusibles qui inhibent (BMP et Wnt) ou favorisent (FGF, les inhibiteurs de BMP et les inhibiteurs de Wnt) la formation du domaine préplacodal (pour revue : Streit, 2004; Bailey et al., 2006). Cette ségrégation progressive du devenir cellulaire des cellules ectodermiques est illustrée par le changement au cours du temps du profil d'expression d'un certain nombre de gènes. Parmi les nombreux facteurs co-exprimés dans le domaine préplacodal, seuls les membres de la famille des Six et de la famille des Eya ont un même profil d'expression qui coïncide avec la position des précurseurs des placodes (Mishima and Tomarev, 1998; Ishihara et al., 2008). Chez les vertébrés, six gènes Six ont été identifiés (Six1-6), alors qu'il y a seulement quatre gènes Eya (Eya1-4) (pour revue : Kawakami et al., 2000; Rebay et al., 2005). Les protéines Six sont des facteurs de liaison à l'ADN qui interagissent physiquement avec Eya, qui en retour va recruter des co-activateurs afin d'activer des gènes cibles (Hu et al., 2008). Les protéines Six peuvent aussi agir comme des répresseurs transcriptionnels par le recrutement de co-répresseurs comme Groucho (Zhu et al., 2002; Lopez-Rios et al., 2003). Les cellules du domaine préplacodal co-expriment Six1, Six4, Eya1 et Eya2, alors qu'une combinaison différente d'autres membres de ces familles est exprimée dans chaque placode mature (Ishihara et al., 2008). L'importance des gènes Six et Eya dans le développement a initialement été montrée chez la drosophile, où la perte des membres fondateurs des familles Six et Eya, *sine oculis* (So) et *eyes absent* (Eya), conduit à une réduction ou une perte totale de l'œil (Bonini et al., 1993; Cheyette et al., 1994). De même, la perte de fonction de Six et Eya chez la souris, le poisson zèbre et l'humain montre leur implication dans la formation des organes sensoriels. En particulier, l'inactivation de Six1 ou Eya1 conduit à la fois à des défauts de l'oreille, des ganglions craniaux et de l'épithélium olfactif. Chez l'humain, leur mutation provoque le syndrome Branchio-Oto-Rénal (BOR) qui associe des anomalies des arcs branchiaux, des anomalies auditives et des anomalies rénales (Abdelhak et al., 1997). L'absence de Six1 et Eya1 affecte le développement de l'ensemble des placodes, ce qui prouve leur expression très précoce et étendue à l'ensemble du domaine préplacodal et suggère un possible rôle dans la spécification des précurseurs du domaine. Cependant, la surexpression de Six1 et Eya2 chez les vertébrés, contrairement à ce qui a été obtenu chez la drosophile, ne conduit pas à la formation de



**Figure 20 : L'induction du domaine préplacodal et des placodes sensorielles.**

(A) Le diagramme illustre à la fois une section antérieure (partie gauche) et une section postérieure d'embryon de poulet (partie droite) au stade 2-4 somites. Sur la droite du schéma sont représentés les signaux ectodermiques qui influencent la localisation du domaine préplacodal. Sur la gauche du schéma sont mentionnés les signaux issus du mésoderme.

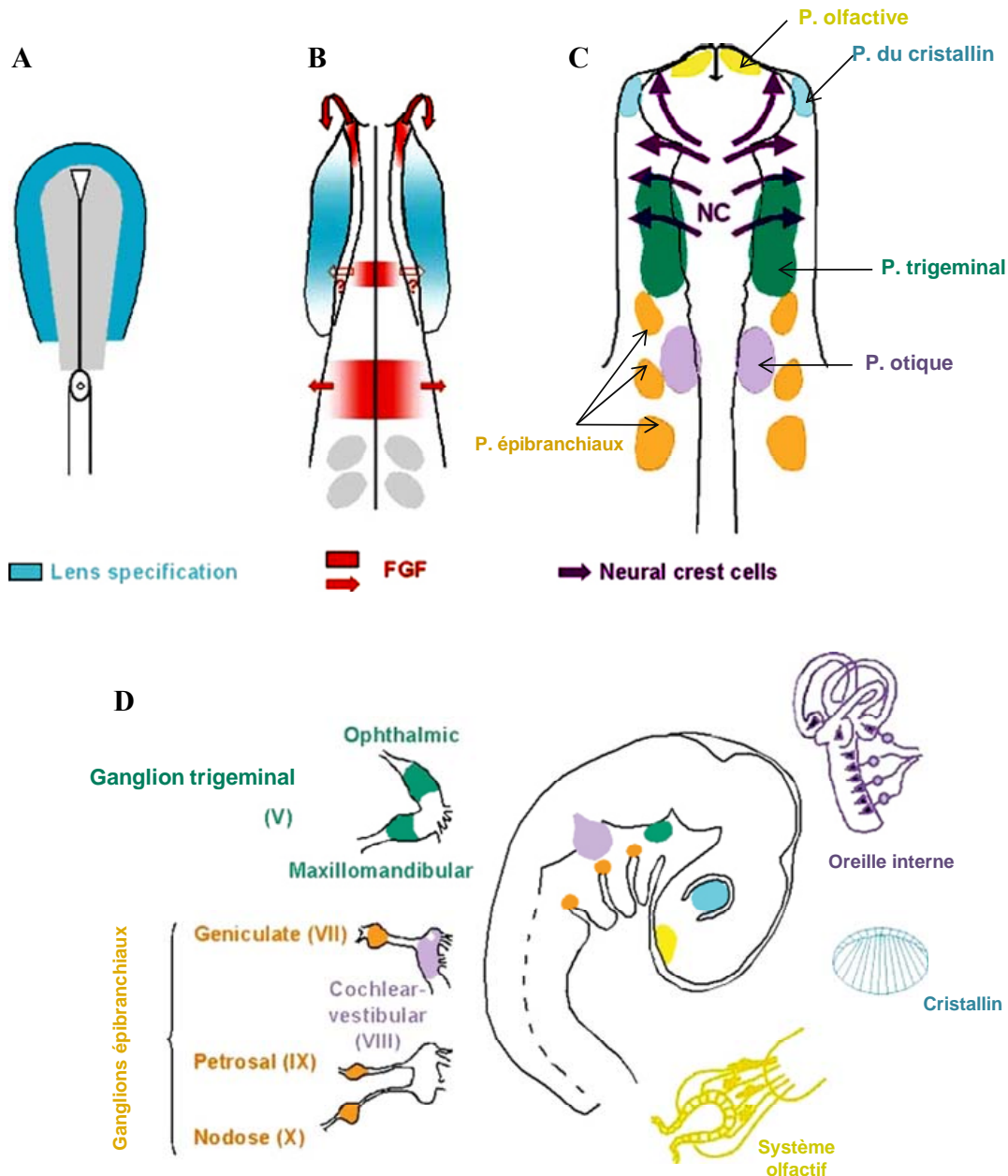
(B) Les signaux BMP et FGF vont activer les facteurs de transcription spécifiques du bord de la plaque neurale. Une fois le bord établi, les signalisations Wnt et BMP vont déterminer si les cellules vont devenir des crêtes neurales ou du domaine préplacodal. La détermination du devenir de chaque type de plaque est sous l'influence principalement de la signalisation FGF qui va inhiber le devenir cristallinien par défaut. D'autres signaux vont participer à déterminer le type de placode.

placode ectopique en dehors du domaine préplacodal, indiquant que la formation de la placode sous-entend des mécanismes de régulation plus complexes. De nombreuses expériences montrent un rôle crucial des membres des familles Six et Eya dans les divers aspects du développement des placodes. Toutefois dans de nombreux cas, les mécanismes moléculaires précis restent à identifier. La caractérisation des cibles directes dans les différents devenir cellulaires sera une étape importante pour comprendre leur fonction.

**Le domaine préplacodal n'est pas seulement défini par le devenir des cellules présentes et par l'expression de certains gènes, mais également pour sa capacité à répondre à un signal inductif de placode.** Par exemple, un ectoderme non placodal n'est pas compétent pour répondre à l'inducteur otique, FGF-2 (Martin and Groves, 2006). Cependant, quand ce tissu est greffé dans le domaine préplacodal, il s'adapte à son environnement et exprime les gènes spécifiques du domaine et devient capable d'exprimer les marqueurs otiques spécifiques en présence de FGF-2.

La spécification des placodes sensorielles est un processus complexe qui commence avant la gastrulation et implique une série de décisions sur le devenir cellulaire avant la spécification précise de l'ectoderme de chacune des placodes. **Initialement, et de façon surprenante, les précurseurs de toutes les placodes sont spécifiés pour devenir du cristallin** (Bailey et al., 2006) (Fig. 21). En effet, lorsque la région préplacodale est sectionnée en quatre portions dans le sens de l'axe antéro-postérieur et sont mises en culture dans un environnement neutre, aucun marqueur spécifique des placodes otique, olfactive ou trigeminal n'est exprimé. Néanmoins, dans cette même expérience, l'ensemble des explants issus de toutes les parties du domaine pré-placodal forment des structures semblables à des cristallins, présentant la même séquence d'expression des gènes observés lors du développement du cristallin (Pax6, L-maf, Foxc1 ainsi que  $\delta$ - et  $\alpha$ -cristallines). Le devenir cristallinien est donc le programme par défaut du domaine pré-placodal.

La génération des autres placodes implique donc que la spécification en cristallin doit être supprimée. **La voie de signalisation des FGFs** semble jouer un rôle important dans l'initiation de ce processus (Fig. 19 et 20). Le traitement de l'ectoderme pré-placodal au FGF-8 conduit à une perte rapide de l'expression de Pax6, qui normalement reste actif dans le cristallin (Bailey et al., 2006). De plus, l'activation de la signalisation FGF favorise l'identité olfactive, tandis que, suivant les espèces, FGF-2, FGF-3, FGF-8, FGF-10 et FGF-19 ont été montrés comme impliqués dans l'induction du devenir otique (Ladher et al., 2000; Vendrell et al., 2000; Maroon et al., 2002). FGF-3 et FGF-8, quant à eux, participent à l'induction des placodes épibranchiales (Herzog et al., 2004; Sun et al., 2007). La signalisation FGF semble donc jouer un rôle crucial dans l'inhibition du devenir cristallinien du domaine préplacodal et favorise la formation des autres placodes non cristalliniennes. Cependant, une même signalisation ne peut pas conduire à la spécification de différentes structures. **L'un des paramètres à prendre en compte est le temps.** En effet, bien que l'inhibition de la signalisation FGF empêche le devenir otique pendant la gastrulation chez le poisson zèbre (Phillips et al., 2001; Maroon et al., 2002), l'utilisation des mêmes inhibiteurs à un stade ultérieur ne perturbe pas l'ébauche otique, mais supprime le développement des placodes



**Figure 21 : Modèle de répression du devenir cristallin pour la formation des placodes sensorielles et de leurs dérivées.**

(A) Au stade neurula, l'ensemble du territoire placodal est spécifié pour être du cristallin (bleu). (B) Dans un premier temps, les FGFs, du bord antérieur neural, du rhombencéphale et du mésoderme sous-jacent la placode otique, vont réprimer la spécification cristalliniennne. FGF8 est également exprimé dans la future limite entre le rhombencéphale et le diencephale, cependant un rôle dans l'inhibition du devenir cristallinien et dans la spécification de la placode trigeminale n'a pas encore été montré (flèche vide). (C) Les cellules des crêtes neurales qui migrent et qui vont se localiser sous la majeure partie de l'ectoderme facial sont de potentiels supresseurs du devenir cristallinien. (D) Les placodes olfactives (jaune), cristalliniennes (bleu), trigéminales (vert), otique (violet) et épibranchiales (orange) sont localisées à des positions caractéristiques sur une vue d'un embryon de poulet de 3 jours. D'après Streit, 2004.

épibranchiques. Les précurseurs otiques et épibranchiques forment initialement un même territoire qui se subdivise par la suite grâce à des signaux additionnels. Des récentes études réalisées chez le poulet montrent que l'induction de ce territoire commun nécessite la signalisation FGF (Freter et al., 2008). Par la suite, la spécification otique nécessite l'arrêt de cette signalisation et le renforcement de l'engagement dans ce devenir par la combinaison de Notch et de Wnt, alors que les précurseurs épibranchiques continuent de dépendre uniquement de la signalisation FGF (Ohyama et al., 2006b; Jayasena et al., 2008; Freter et al., 2008).

La durée et le niveau d'exposition à la signalisation FGF contribuent à la régionalisation de l'ectoderme préplacodal, qui est initiée peu de temps après son induction. Cependant, même si la signalisation FGF est cruciale pour l'initialisation de l'inhibition du devenir cristallinien, elle n'est cependant pas suffisante pour empêcher la formation d'un cristallin dans tous les ectodermes non cristalliniens (Bailey et al., 2006). **Les signaux additionnels nécessaires à cette inhibition pourraient provenir des cellules issues des crêtes neurales, qui vont être en contact avec de nombreuses placodes, sauf celle du cristallin.** Des expériences de co-culture de cellules des crêtes neurales avec un ectoderme cristallinien présomptif empêchent la formation du cristallin dans ce dernier (Bailey et al., 2006). Au contraire, l'ablation des cellules des crêtes neurales conduit à la formation ectopique d'un cristallin (Bailey et al., 2006). Les signaux responsables de cette activité n'ont pas encore été identifiés. Bien que les cellules des crêtes neurales ne semblent pas jouer de rôle dans l'instruction de l'ectoderme crânien à se différencier en des placodes spécifiques, elles jouent un rôle dans la régionalisation de la placode olfactive, une fois qu'elle a été induite (LaMantia et al., 2000; Bhasin et al., 2003).

Lors de la spécification des différentes placodes, celles-ci vont acquérir une identité propre qui est reflétée par l'expression différentielle de nombreux facteurs de transcription. En particulier, les facteurs de transcription Pax6 et Pax2 jouent un rôle crucial dans la morphogenèse de l'œil, alors que Pax2 et Pax8 jouent ce rôle pour l'oreille des vertébrés (pour revue : (Baker and Bronner-Fraser, 2001).

## **5.5.LE MASTER GÈNE DE L'ŒIL : PAX6**

Chez les mammifères, la famille des gènes pax, pour Paired Box, est composée de neuf membres qui sont des facteurs de transcription ayant en commun un domaine de fixation à l'ADN, la boîte paired. Les gènes Pax jouent des rôles importants au cours du développement.

Le gène Pax6 code pour un facteur de transcription à homéodomaine, conservé au cours de l'évolution, qui est le premier membre de la famille Pax à être exprimé dans le cerveau au cours du développement. Son expression est retrouvée à la fois dans le neuroderme et dans les ébauches des vésicules optiques (Walther and Gruss, 1991), et perdurera dans l'épithélium rétinien pigmentaire et la neurorétine (Plaza et al, 1995b). Pax6 est également exprimé dans l'ectoderme préplacodal du cristallin (Grindley et al 1995) et dans l'épithélium cornéen (Plaza et al, 1995b). Notons que Pax6 reste exprimé dans ces deux dernières structures chez l'adulte (Collinson et al., 2004).

L'importance de Pax6 dans le développement de l'œil est établie par plusieurs observations. Ce gène avait reçu des noms divers en fonction des mutations observées dans différentes espèces, avant que l'on découvre qu'il s'agissait en fait de gènes orthologues et ayant conservé un très grand degré d'homologie. Chez la drosophile, des mutations dans *eyeless* empêchent la formation des yeux (Quiring et al., 1994). Chez la souris, les mutants *Small eye*, affectés dans ce gène, présentent des petits yeux à l'état hétérozygote et sont dépourvus d'yeux à l'état homozygote (Hogan et al., 1986; Hill et al., 1991). Chez l'homme, des défauts de développement de l'œil sont observés en réponse à des mutations du gène nommé aniridia, cette pathologie touchant l'ensemble des structures oculaires (Glaser et al., 1992). L'expérience fondamentale réalisée dans le laboratoire de W. Gehring (Halder et al., 1995) montre que l'expression ectopique de *eyeless* dans les disques imaginaux de drosophile autres que le disque d'œil, conduit à la formation d'yeux ectopiques. Chez les vertébrés par contre, le facteur Pax6 nécessite la présence de co-facteurs pour provoquer la formation des tissus de l'œil. Les nombreux travaux sur le développement du cristallin ont montré que Pax6 s'associe à Sox2 pour induire la cascade de signalisation conduisant à l'induction d'une placode cristallinienne et à la formation d'un cristallin (Lang, 2004). Dans le cas de l'épithélium cornéen, le co-facteur de Pax6 nécessaire à l'induction de l'expression de la Kératine 12 reste actuellement inconnu. Chez la souris, en fonction du nombre de copies intégrées dans le transgène, une microphthalmie sévère peut être observée dans un fond génétique normal (Schedl et al., 1996). Chez le poulet, la surexpression de Pax 6 conduit à des anomalies de l'œil (Ying Yang, thèse, 2005). Ces résultats montrent l'importance du dosage de Pax6 dans la morphogenèse oculaire.

L'importance de l'expression de Pax6 dans l'ectoderme pour la formation du cristallin a été mise en évidence, entre autres, par des expériences de co-culture. La culture d'un ectoderme céphalique de rat sauvage avec des vésicules optiques issus d'un rat muté pour Pax6 (rSey) forme des structures cristalliniennes normales, alors que l'ectoderme céphalique issu du rat muté pour Pax6 avec des vésicules optiques de rat normal présente une absence de formation de cristallin (Fujiwara et al., 1994). De même, Pax6 joue également un rôle crucial dans la différenciation de l'épithélium cornéen. Un défaut d'expression de celui-ci entraîne des malformations au niveau de la cornée (Kroeber et al., ; Davis et al., 2003).

Le facteur de transcription Pax6 joue donc un rôle clé dans la morphogenèse de l'œil, et plus particulièrement dans le développement des dérivés ectodermiques oculaires, que sont le cristallin et l'épithélium cornéen.

## **5.6. LES PRINCIPAUX ÉVÉNEMENTS MOLÉCULAIRES DU DÉVELOPPEMENT DU CRISTALLIN**

Le développement du cristallin est un processus qui comporte de **nombreuses étapes** impliquant des interactions complexes, et qui débute, comme nous l'avons vu, dès le stade neurula avec l'établissement du domaine préplacodal. Ces interactions se poursuivent lorsque le neuroderme de la vésicule optique est étroitement accolé à l'ectoderme préplacodal. De nombreux travaux ont eu pour objectif de déterminer, en utilisant différentes espèces, l'influence du neuroderme sur le programme cristallinien. Les résultats contradictoires obtenus, continuent d'entretenir le débat, mais peuvent s'expliquer partiellement par la variété



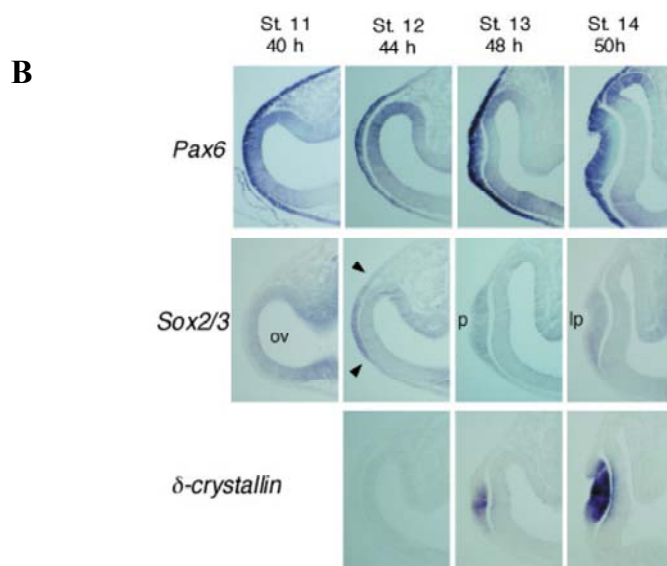
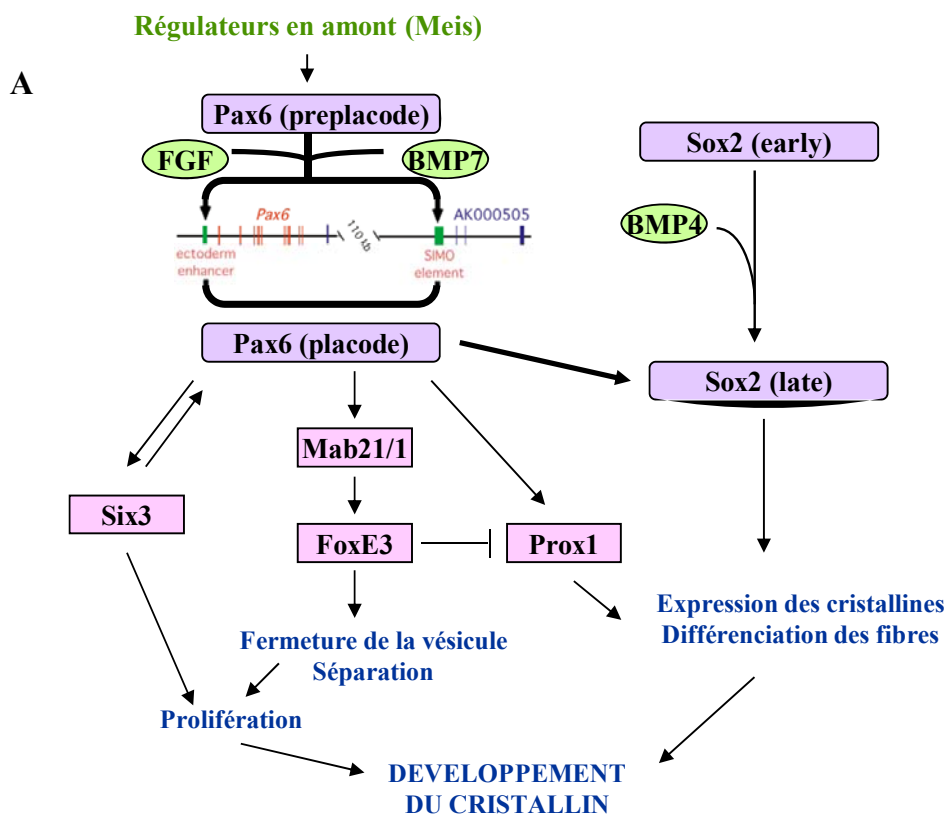
des espèces utilisées, et de conditions expérimentales, en particulier le stade d'ablation de la vésicule optique.

L'événement morphologique évident de la différenciation cristallinienne au niveau de l'ectoderme est l'épaississement de celui-ci pour former la placode cristallinienne. Avant la formation de celle-ci, Pax6 est exprimé dans l'ectoderme. Des expériences de transgénèse ont révélé que **Meis2**, mais pas Meis1, une famille d'homéoprotéines, peut favoriser l'expression ectodermale de Pax6 chez la souris, alors que des expériences induisant la perte de fonction de Meis1 chez le poulet montraient clairement une diminution d'expression de Pax6 (Zhang et al., 2002). Les protéines Meis réguleraient l'expression de Pax6 dans l'ectoderme.

Au stade HH12 chez le poulet et E9.5 chez la souris, le facteur Pax6 va s'associer avec le facteur **Sox2**, dont l'expression est augmentée au stade de formation de la placode, et provoque la cascade de signalisations conduisant à l'induction d'une placode cristallinienne et à la formation d'un cristallin (Kamachi et al., 1998). Ces deux facteurs de transcription à homéodomaine vont se fixer sur le promoteur des gènes codant pour les marqueurs de différenciation du cristallin, les **cristallines** (Kamachi et al., 1998). La première cristalline à être exprimée dans la placode cristallinienne chez le poulet est la  $\delta$ -cristalline qui est suivie par la  $\beta$  cristalline et l' $\alpha A$  cristalline. Chez la souris, la première à être exprimée est l' $\alpha B$  suivie de l' $\alpha A$  cristalline. L'association de Pax6 avec Sox2 va également conduire à l'induction de l'expression d'un certain nombre de gènes cibles, qui seront impliqués dans les processus de différenciation terminale du cristallin, comme la différenciation des fibres cristalliniennes.

**L'initiation de cette cascade de signalisation nécessite le maintien de l'expression de Pax6 et la forte augmentation de l'expression de Sox2 au niveau de la placode** (Fig. 22). L'implication des voies **BMP et FGF** a été mise en évidence à ce stade pour réguler le niveau d'expression de ces facteurs. L'expression de BMP7 dans l'ectoderme pré-placodal avant l'induction de la placode semble nécessaire au maintien de l'expression placodale de Pax6 (Furuta and Hogan, 1998b). Les voies BMP jouerait également un rôle important dans l'initiation de la différenciation des cellules fibreuses du cristallin (Belecky-Adams et al., 2002; Faber et al., 2002). De plus, aux stades précoces de l'induction du cristallin, la signalisation FGF est également importante pour la régulation de l'expression placodale de Pax6 (Dimanlig et al., 2001). Plus tard dans le développement, cette signalisation est requise pour la sortie du cycle cellulaire des cellules cristalliniennes et l'initiation de leur différenciation en fibres (Lovicu and McAvoy, 2005; Griep, 2006; Robinson, 2006).

L'augmentation de l'expression du facteur Sox2, nécessaire à l'induction de la placode et **l'initiation de la dernière étape de la différenciation du cristallin est induite par le facteur diffusible BMP4**. Ce facteur présente des profils de localisation différents suivant les espèces : chez la souris, il est fortement exprimé dans la région dorsale de la vésicule optique et faiblement dans l'ectoderme de surface (Dudley and Robertson, 1997; Furuta and Hogan, 1998b) alors que chez le poulet, il est tout d'abord détecté dans l'ectoderme préplacodal situé juste en face de la vésicule optique avant la formation de la placode, puis plus tard dans la rétine neurale dorsale (Trousse et al., 2001). Néanmoins, le facteur BMP4 est crucial pour la formation de la placode car dans les souris déficientes pour BMP4, la formation du cristallin



**Figure 22 : Les facteurs Pax6 et Sox2 coopèrent pour induire la dernière étape de la différenciation du cristallin.**

Le master gène de l'œil, Pax6 est exprimé très tôt dans l'ectoderme préplacodal, alors que le facteur de transcription Sox2 l'est à un niveau très faible. L'induction par BMP4 conduit à une augmentation d'expression de Sox2, celui-ci va alors, en s'associant avec Pax6, induire l'expression des cristallines, les marqueurs de différenciation terminale du cristallin. L'expression des cristallines concorde avec la formation de la placode cristalliniennne. Les profils d'expression de ces gènes sont présentés chez l'embryon de poulet au moment de la formation de la placode (HH12 à HH14) (Kamachi et al, 1998) (B). En parallèle, Pax6 va également induire l'expression de plusieurs facteurs de transcription qui vont conduire, entre autres, à la fermeture de la vésicule cristalliniennne et à la différenciation des fibres du cristallin.

est arrêtée, avec une perte d'expression de Sox2. Ce phénotype est réversible par l'application de BMP4 exogène dans la vésicule optique de l'explant mis en culture (Furuta and Hogan, 1998b). Cependant, l'application d'une bille de BMP4 à la place de la vésicule optique n'est pas capable d'induire la formation d'un cristallin (Furuta and Hogan, 1998b). **Le facteur BMP4 est donc important pour la formation de la placode cristallinienne** mais il n'est pas le seul. D'autres signaux encore inconnus doivent être requis.

Suite à la formation de la placode, l'expression d'un certain nombre de gènes va être induite par Pax6, comme **Six3** et **Prox1**, dont l'expression disparaît dans la placode cristallinienne des souris présentant une délétion spécifique de Pax6 dans cette structure (Ashery-Padan et al., 2000). Ces facteurs avec également **L-Maf**, vont participer aux étapes finales de la différenciation cristallinienne, en régulant, par exemple, l'expression des cristallines, la fermeture de la vésicule cristallinienne et la différenciation des fibres.

## **5.7. LE DÉVELOPPEMENT DES VÉSICULES OPTIQUES ET LA DIFFÉRENCIATION RÉTINIENNE**

La rétine neurale et l'épithélium neural pigmenté sont issus de la différenciation de la cupule optique, suite à l'invagination de la vésicule optique après un contact étroit de cette dernière avec l'ectoderme préplacodal. Des expériences d'ablation précoce de l'ectoderme préplacodal ont montré l'importance de l'interaction avec l'ectoderme pour l'invagination de la vésicule optique en cupule optique (Hyer et al., 2003). Cependant, Zhang et ses collaborateurs ont depuis présenté des résultats contradictoires montrant que le fait d'empêcher la formation de la placode cristallinienne, en induisant spécifiquement dans l'ectoderme la toxine diphtérique, n'empêche pas l'invagination de la vésicule optique et le développement de celle-ci (Zhang et al., 2008).

**L'invagination de la vésicule optique en cupule optique** est considérée comme une étape cruciale dans la formation de la rétine, de l'iris, du corps ciliaire et du pédoncule optique qui formera le manchon protecteur du futur nerf optique. La variété des devenir des différentes parties de la cupule optique impliquent différents profils d'expression de molécules de signalisation, rendant ainsi leur analyse et donc leur description difficile et complexe (pour revue :Adler and Canto-Soler, 2007). Parmi les facteurs présents dans l'environnement de la vésicule optique, **l'acide rétinoïque**, issu du mésenchyme périoculaire formé par les cellules des crêtes neurales, est crucial pour la régulation de cette invagination et intervient dans la régionalisation ventro-dorsal de la rétine (Matt et al., 2005; Mic et al., 2004; Molotkov et al., 2006). De même, le facteur de transcription **Lhx2**, exprimé dans la vésicule optique puis dans la rétine neurale, est essentiel pour la transition vésicule optique/cupule optique. La perte de fonction de ce facteur dans des souris knock-out conduit à une anophtalmie (Porter et al., 1997). Ce facteur semble avoir un rôle crucial dans une fenêtre de temps réduite, correspondant à la période de contact entre la vésicule optique et l'ectoderme préplacodal.

Dès le stade de la cupule optique, la spécification de la rétine neurale est sous le contrôle de la voie de signalisation **FGF** (Guillemot and Cepko, 1992; Pittack et al., 1997) et va se traduire par l'expression de facteurs de transcription précoces, tel que le facteur de transcription **Chx10** (Nguyen and Arnheiter, 2000). La spécification de l'épithélium rétinien

pigmentaire semble dépendre de signaux provenant du mésenchyme extra-oculaire issus des crêtes neurales, avec une possible implication des activines (Stern et al., 1995; Fuhrmann et al., 2000). Les membres de la famille des protéines **Hedgehog**, en plus de leur rôle précoce dans la séparation du champ oculaire en deux compartiments, sont impliqués dans la formation de l'axe proximo-distal et la différenciation de la rétine pigmentaire (Perron et al., 2003).

## 5.8. LA MORPHOGENÈSE DE LA CORNÉE

La formation de la cornée se produit en deux étapes : la délimitation de l'épithélium cornéen à partir de l'ectoderme suite au détachement de la vésicule cristallinienne, puis la migration de cellules issues des crêtes neurales pour former le stroma cornéen sous-jacent.

À E15 chez la souris, à E17 chez le lapin et à E12 chez le poulet (Chaloin-Dufau et al., 1990), débute l'expression de la kératine 12 (K12), marqueur de différenciation terminale de l'épithélium cornéen. Chez l'embryon de lapin, le transcrite et la protéine K12 sont exprimés en premier dans la couche suprabasale, puis dans la couche basale de l'épithélium (respectivement à 17 et 23 jours de gestation); ils y précèdent l'expression du transcrite et de la protéine kératine basique K3 (respectivement à 21 jours de gestation et entre 7 et 12 jours après la naissance) (Chaloin-Dufau et al., 1993). Chez le poulet, la kératine 3 (K3), exprimée vers E11, s'associe à la K12 pour former les filaments intermédiaires spécifiques de la différenciation de l'épithélium cornéen. La K3 n'est pas présente chez la souris (Chaloin-Dufau et al., 1993). A l'heure actuelle, la kératine 12 constitue le seul marqueur spécifique, présent chez tous les vertébrés, qui indique la détermination de l'ectoderme dans le programme cornéen. Cependant, ce marqueur apparaît très tardivement par rapport au stade où se produit la morphogenèse de la cornée. L'absence de marqueurs plus précoces est un handicap important dans nos études sur la spécification de l'épithélium cornéen. L'hypothèse proposée par E. Hay en 1980 serait que le cristallin est responsable de l'induction de l'ectoderme en épithélium cornéen. Malgré l'absence de preuves, cette explication est souvent énoncée dans les revues concernant l'œil.

Le facteur de transcription Pax6 est un des régulateurs de l'expression de la kératine 12 dans l'épithélium cornéen (Shiraishi et al., 1998). Les mécanismes moléculaires régulant l'expression de la kératine 12 (K12) commence à être connus (Wang et al., 2002). Notons que des sites de fixation des facteurs AP1 et KFL6 sur le promoteur K12 ont été identifiés chez la souris (Chiambaretta et al., 2002). Pax6 est également exprimé physiologiquement par les épithélia nasal et oral. Lorsque ces derniers ont été recombinaisonnés avec un stroma cornéen (Ying Yang, thèse, 2005), ce dernier ne suffit pas à provoquer leur différenciation en épithélium cornéen. En plus de Pax6, d'autres facteurs supplémentaires doivent donc être exprimés dans l'épithélium cornéen et dans les cellules souches correspondantes par rapport à l'épiderme, laissant entrevoir de nombreuses pistes de recherche.

## **6. LA REPROGRAMMATION DE L'ÉPITHÉLIUM CORNÉEN ADULTE**

Les travaux issus du laboratoire ont montré la reprogrammation d'un épithélium cornéen adulte de lapin en un épiderme lorsqu'il est associé à un derme embryonnaire de souris (Ferraris et al., 2000; Pearton et al., 2005). Il faut noter, dès à présent, que cette reprogrammation ne concerne que quelques cellules de l'assise basale de l'épithélium.

### **6.1. COMPORTEMENT DU DERME EMBRYONNAIRE**

La mise en culture d'un explant de peau embryonnaire comportant des primordia néo formés provoque un « rajeunissement » de cette peau. La mise en culture perturbe l'expression des différents signaux et les condensations dermiques disparaissent pour reformer un derme dense homogène, puis se reforment pour poursuivre la morphogenèse du phanère (Michon et al., 2007). La réorganisation de ce derme permet d'étudier les facteurs impliqués dans ce processus et procure ainsi un modèle de choix dans l'étude de l'acquisition de ses capacités inductrices. La formation des primordia de phanères est un **phénomène dynamique**. Lorsque les interactions réciproques entre une condensation dermique sont perturbées par la mise en culture organotypique de fragments de peau, le jeu d'interactions repart du début. De même, lors de la dissociation de la peau embryonnaire en derme et en épiderme, le contact entre condensation dermique et placode est rompu et le même phénomène de **réorganisation du derme** est donc observé. Celle-ci se réalise en quelques heures si l'épithélium d'origine ectodermique associé est embryonnaire, mais demande plusieurs jours dans le cas d'un épithélium adulte de cornée centrale (Pearton et al., 2005).

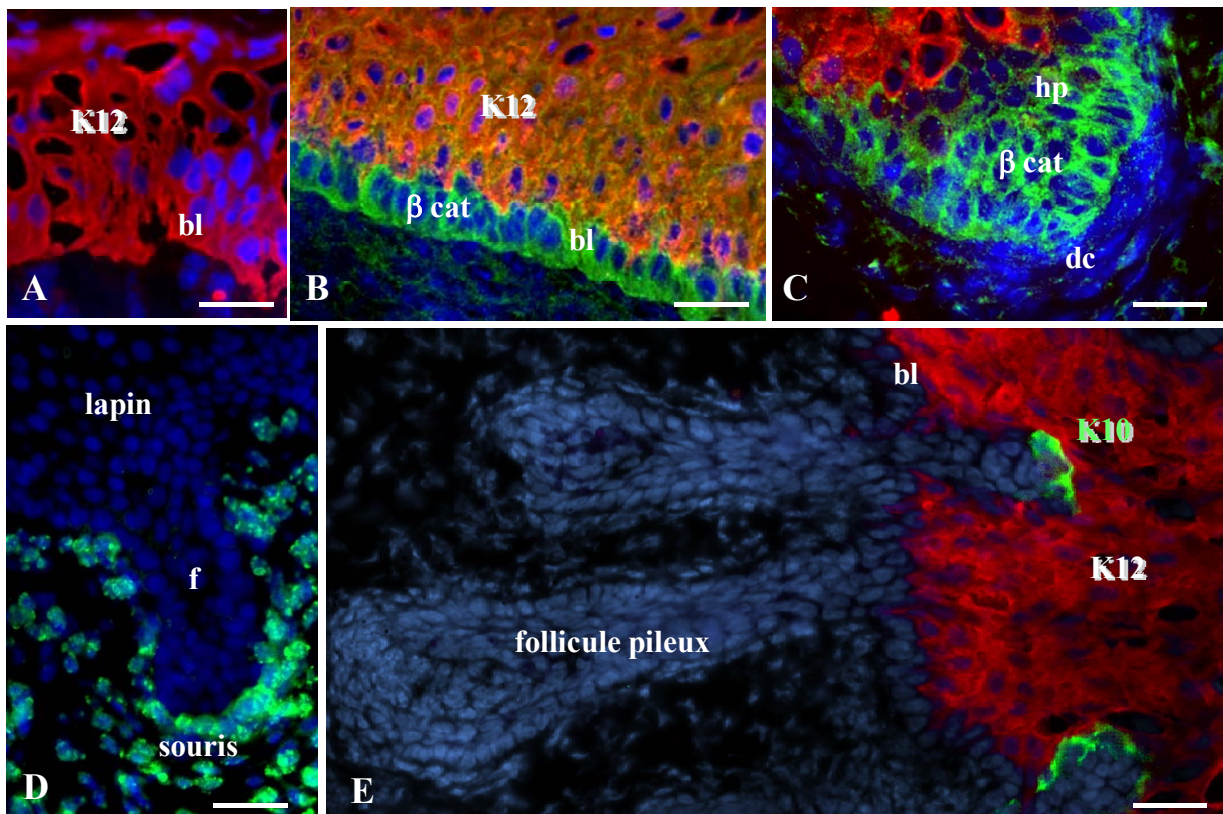
### **6.2. COMPORTEMENT DE L'ÉPITHÉLIUM CORNÉEN**

L'épiderme et l'épithélium cornéen sont des tissus issus de l'ectoderme embryonnaire qui présentent des caractéristiques communes. La transformation de l'un en l'autre est donc envisageable. La mise en évidence de la malléabilité de l'épithélium cornéen et la confirmation du fort potentiel inducteur du derme a été faite par recombinaison tissulaire hétérotopique. Un derme embryonnaire dorsal de souris de 14,5 de développement lorsqu'il est associé à un épithélium de cornée centrale de lapin adulte, dépourvue de cellules souches, provoque après un mois de greffe la disparition de l'épithélium cornéen au profit d'un épiderme (Ferraris et al., 2000). **Cette transformation est en fait réalisée en plusieurs étapes (Pearton et al., 2005) et ne concerne que quelques cellules de l'assise basale de l'épithélium cornéen** (Fig. 23 et 24). Deux jours après l'association avec le derme embryonnaire, une augmentation de **β-caténine** nucléaire dans l'ensemble de la **couche basale de l'épithélium** cornéen est observée, laissant supposer qu'un signal Wnt provenant du derme embryonnaire est à l'origine de cette transformation. Ces cellules épithéliales basales au contact du derme cessent ensuite d'exprimer la kératine 12, marqueur de la différenciation cornéenne, mais continuent à exprimer Pax6. Cette **dédifférenciation** de l'assise basale de l'épithélium cornéen central présente donc une typologie de **type épithélium basal limbique**. Une observation d'une anomalie dans l'espèce humaine a montré la possibilité de la présence de poils à la périphérie de la cornée. Notons que la désactivation

de l'expression de Pax6 dans la cornée peut se produire lors de l'induction de la prolifération cellulaire (Lu et Li, 2005). Or, une semaine après la recombinaison, apparaissent des placodes pilaires qui cessent d'exprimer le gène Pax6, alors qu'elles se multiplient pour donner des bourgeons pileux. Au bout de trois semaines ceux-ci forment des follicules pileux d'architecture normale et complète, pourvus d'un bulge. C'est à partir de ce dernier que vont migrer les cellules souches qui vont soulever progressivement l'épithélium cornéen qui s'élimine par desquamation. Le résultat final est la formation d'un épiderme (Pearson et al., 2005).

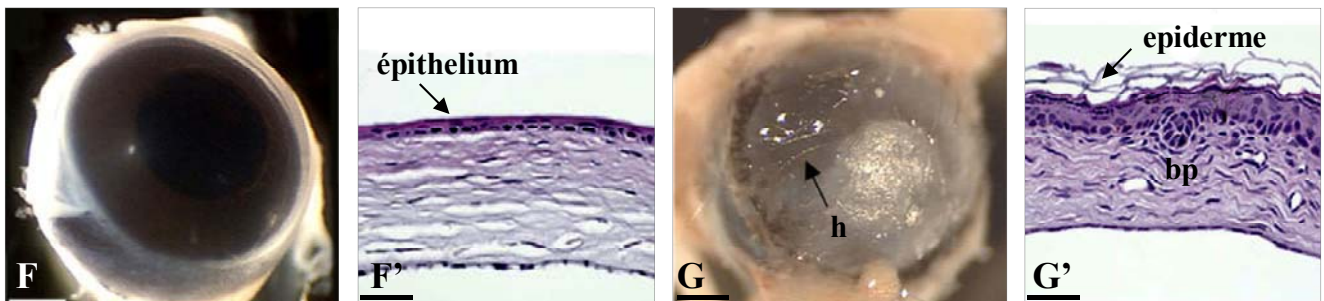
L'importance de l'inhibition de la signalisation Wnt, présente au niveau de la chambre antérieure de l'œil (Fokina and Frolova, 2006), pour la formation d'un épithélium cornéen au lieu d'un épiderme a été confirmée par la génération d'une souris déficiente pour Dkk2 (Mukhopadhyay et al., 2006) (Fig. 23). Cette dernière présente à la place d'épithélium cornéen un épiderme possédant des follicules pileux. La présence de la signalisation Wnt a conduit à une totale transformation de l'ectoderme en épiderme différencié pourvu de phanères. L'expression de Dkk2 dans l'épithélium cornéen est donc essentielle pour le maintien du programme cornéen.

L'état des cellules de la couche basale de l'épithélium cornéen central en tant que des progéniteurs en cours de différenciation exprimant déjà les kératines de différenciation terminale, a été récemment controversé et considéré comme typique des cellules souches (Majo et al., 2008) (voir page 31). Quelle que soit l'interprétation concernant la couche basale, le programme épidermique apparaît être un programme par défaut par rapport à celui de l'épithélium cornéen.



WT/WT

Dkk2<sup>-/-</sup>

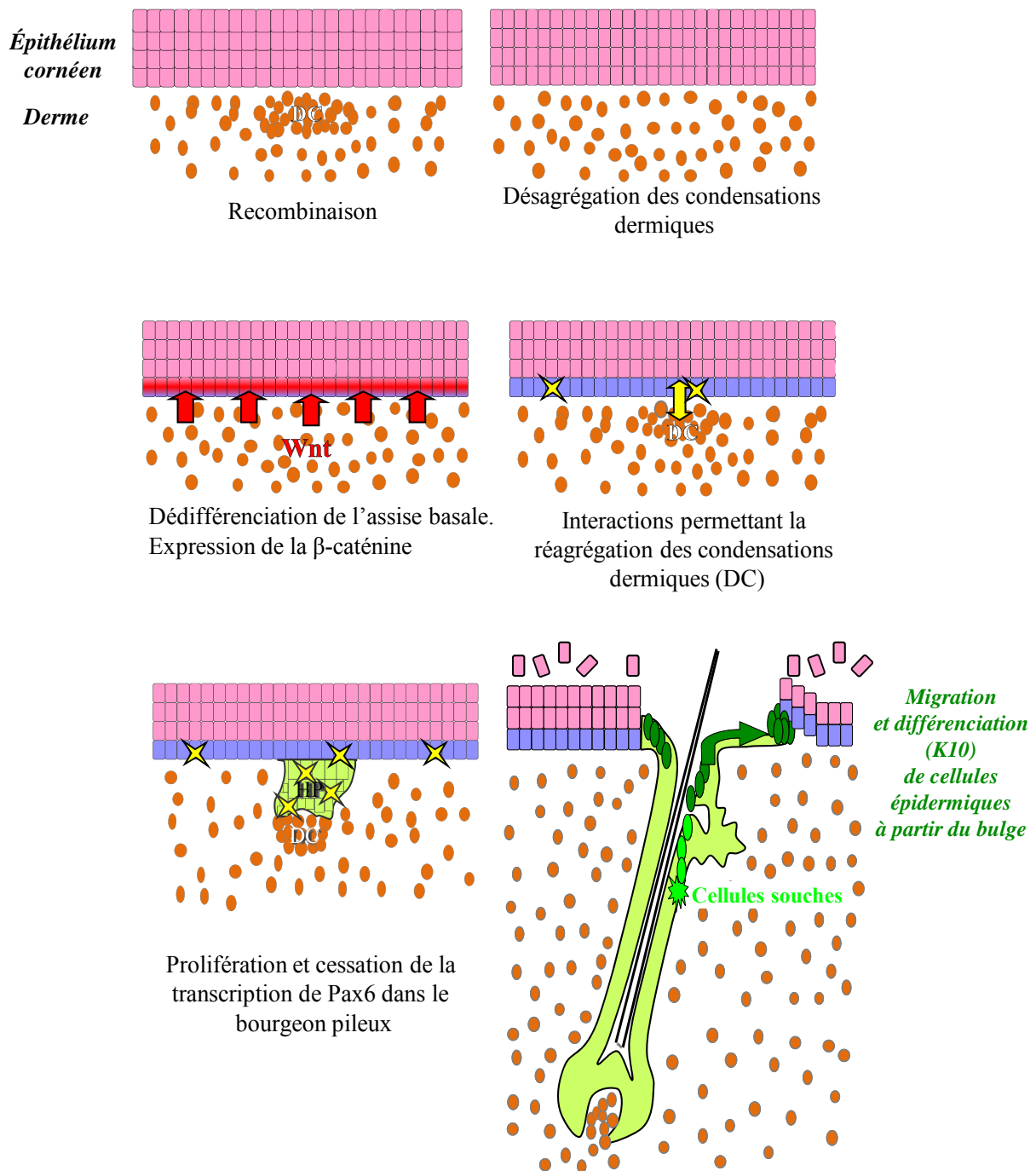


**Figure 23 : La signalisation Wnt inhibe le programme cornéen au profit du programme épidermique**

(A–E) Après quelques jours de recombinaison de l'épithélium cornéen de lapin adulte avec un derme embryonnaire dorsal de souris (E14.5) (A), l'expression de la kératine 12 s'éteint dans la couche basale de l'épithélium cornéen, alors que celle de la β-caténine (βcat) est augmentée (B). Après une semaine de recombinaison, les cellules exprimant la β-caténine prolifèrent et forme des bourgeons pileux (C). Le follicule pileux différencié qui se forme est issu des cellules de lapin, comme le montre un marqueur d'ADN de souris (D). Après deux semaines, des îlots de cellules épidermiques exprimant la kératine 10 apparaissent à la jonction entre les follicules pileux, ce qui va soulever l'épithélium cornéen. D'après Pearton et al. 2005.

(F-G') Les souris déficientes pour Dkk2 présentent une cornée opaque. Un épiderme avec des follicules pileux se sont formés (G,G') à la place d'une cornée transparente (F,F'). D'après Mukhopadhyay et al. 2006.





**Figure 24 :** Les différentes étapes de la reprogrammation d'un épithélium cornéen adulte par un derme embryonnaire.

La reprogrammation en plusieurs étapes des cellules différenciées exprimant les kératines 3 et 12 dans la couche basale de l'épithélium cornéen en cellules souches du follicule pileux permet la formation d'un épiderme. (Modifié d'après Pearton et al., 2005).

DC : condensation dermique, HP : bourgeon pileux





# **OBJECTIFS**



# OBJECTIFS DE LA THESE

**L'organogenèse de la peau et de l'œil** est le résultat d'interactions cellulaires complexes, dont les supports moléculaires ont été étudiés depuis une vingtaine d'années par de nombreux laboratoires. En ce qui concerne la peau, le rôle majeur du derme a été démontré comme primordial, mais il existait cependant encore des incertitudes, en particulier des résultats contradictoires en ce qui concerne le rôle des BMPs. Au niveau de l'œil, si les cascades de signalisation conduisant à la différenciation du cristallin et de la rétine ont été bien étudiées, l'étude de la différenciation de l'ectoderme en épithélium cornéen n'était pas encore rentrée dans l'ère moderne. En particulier on supposait, par similitude avec la morphogenèse cutanée, un rôle majeur du composant mésenchymateux de la cornée et nous verrons que cette hypothèse n'est pas confortée par l'expérimentation.

**Au début de ma thèse, j'ai contribué à une meilleure compréhension de l'implication de la voie BMP au cours de la formation des phanères.**

Trois différents BMPs sont exprimés dans le territoire folliculaire de la peau, BMP2, BMP4 et BMP7. L'hypothèse admise sur le plan international était que ces facteurs inhibent la formation du primordium, leur effet devant être contrebalancés par leurs inhibiteurs, Follistatine et Gremlin (Chuong, 1998a; Botchkarev and Kishimoto, 2003; Pummila et al., 2007). Or plusieurs observations étaient contradictoires avec cette théorie. La Follistatine est exprimée à la périphérie de la placode (Patel et al., 1999a), et Gremlin uniquement dans le domaine interfolliculaire (Bardot et al., 2004). Msx1 et Msx2, deux gènes cibles de la signalisation BMP, sont exprimés au sein de la placode (Chuong et al., 1996a; Noveen et al., 1995) (B. Robert, communication personnelle). L'expression de BMP7 est requise pour la formation des phanères (Harris et al., 2004). Chez le poulet, l'utilisation de billes faiblement chargées en BMP4 résulte en la formation de plumes supplémentaires (Scaal et al., 2002) alors que l'inhibition de leur formation est obtenue en utilisant de fortes concentrations (Jung et al., 1998a). Comment expliquer ces résultats contradictoires?

**L'objectif principal de ma thèse a été de déterminer quelles étaient les différences de signature moléculaire entre épiderme et épithélium cornéen et d'établir quand et comment le programme cornéen est mis en place au cours de l'embryogenèse.**

La peau et la cornée sont deux organes épithéliaux mésenchymateux, dont l'origine embryonnaire est commune au niveau de la tête: ectoderme et crêtes neurales. Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré que le programme épidermique est un programme par défaut par rapport à celui de l'épithélium cornéen (Ferraris et al., 2000; Pearton et al., 2005). On peut donc se demander en termes de profil d'expression génique, ce qui **différencie le programme cornéen**. Afin de répondre à cette première question, j'ai entrepris une étude comparative **du transcriptome** des cellules souches de l'épithélium cornéen et des cellules souches épidermiques du bulge chez la souris, aboutissant à une base de données.

La question suivante est un paradigme de l'embryologie qui n'avait pas encore été résolu en ce qui concerne l'épithélium cornéen. Des travaux antérieurs du laboratoire avaient montré que la différenciation terminale de l'épithélium cornéen (expression de ses kératines

spécifiques K3 et K12) intervient tardivement, au stade fœtal (Chaloin-Dufau et al., 1993; Chaloin-Dufau et al., 1990). Il restait à savoir **à quel moment et comment au cours de l'embryogenèse l'épithélium cornéen est spécifié, puis déterminé**. Afin de répondre à cette deuxième question, j'ai recherché quelle pouvait être l'influence inductrice des tissus situés à proximité de l'épithélium cornéen présumé, c'est-à-dire **le stroma cornéen et le cristallin**. D'une part plusieurs travaux ayant fait la « une » des médias avaient récemment conclu, par similitude avec ce qui se passe pour la peau, à un rôle inducteur du stroma (Gao et al., 2007; Blazejewska et al., 2009). D'autre part, l'hypothèse d'un rôle inducteur du cristallin, évoqué dans une revue d'E. Hay (1980), était reprise comme une évidence dans les livres d'embryologie. J'ai donc réalisé des expériences classiques de recombinaisons épithélio-mésenchymateuses chez l'embryon de mammifère, souris et lapin, ainsi que des expériences d'ablation chirurgicale de la vésicule et de la placode cristalliniennes chez l'embryon de poulet. L'ablation de la vésicule cristallinienne a montré qu'elle était sans influence sur la différenciation de l'épithélium cornée. Celle de la placode cristallinienne était suivie invariablement par sa régénération, contrairement à des résultats publiés récemment (Hyer et al., 2003; Dias da Silva et al., 2007). J'ai finalement réussi à inhiber la formation de la placode du cristallin en contrecarrant la signalisation BMP4, un des facteurs contribuant à la dernière étape de la spécification du cristallin (Furuta and Hogan, 1998a).

# **RESULTATS**



# RESULTATS

## 1. L'EXPRESSION DE BMP7 ET DE BMP2 EST REQUISE POUR L'ORGANISATION DU DERME

Au cours de l'organogenèse de la peau, le **derme apparait comme un acteur essentiel** dans l'initiation de la formation de phanères. Cette compétence à induire la formation de primordia dans tout épithélium d'origine ectodermique est acquise par le derme lorsqu'il devient apte à former des condensations dermiques (Dhouailly et al., 2004; Pearton et al., 2005). D'où l'importance d'étudier les mécanismes morphologiques et moléculaires qui sont impliqués dans l'organisation dermique.

Malgré de nombreuses études concernant la morphogenèse cutanée, les étapes permettant le passage d'un derme dense homogène à un derme hétérogène comportant des condensations dermiques restaient obscures. L'augmentation soudaine de la densité cellulaire n'est pas la conséquence d'une prolifération cellulaire (Desbiens et al., 1991; Rouzankina et al., 2004; Wessells and Roessner, 1965), mais elle est la conséquence d'une migration cellulaire. Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré chez l'embryon de poulet que la redistribution cellulaire des fibroblastes dermiques sollicite l'implication de molécules d'adhérence cellulaire, comme les Intégrines, ainsi que la dynamique du cytosquelette d'actine régulée par la kinase Rho-dépendante, ROCK (Michon et al., 2007). De plus, la composition de la matrice extracellulaire est importante pour la coordination de la migration cellulaire. La présence de l'exon EIIIA de la fibronectine est requise pour la migration des cellules dermiques. Son épissage alternatif intervient au niveau de la condensation dermique. Notre laboratoire a émis l'hypothèse qu'un BMP pourrait être à l'origine de cet épissage.

L'étude par hybridation *in situ* a mis en évidence, chez l'embryon de poulet, la présence de trois membres de la famille des BMPs dans le primordium de phanère : BMP-2, BMP-4 et BMP-7. Une étude comparative des profils d'expression réalisée sur la ptéryle fémorale (stade HH30) a montré que BMP-7 est exprimé plus précocement que BMP-2 (Publi. 1, Fig. 1). Ce dernier avait déjà été montré comme étant exprimé avant BMP-4 (Houghton et al., 2005). Bien que l'inhibition de la signalisation BMP semble être nécessaire pour la formation des primordia, l'expression de gènes cibles de cette signalisation, tels que Id-1, Id-3 et Id-4, est retrouvée au niveau des primordia de la peau dorsale à HH30 (Publi. 1, Fig. 1). L'impact des facteurs BMP-2 et BMP-7 sur la migration des fibroblastes dermiques a été testé lors d'un test de chémo-attraction à travers une membrane, en présence ou non de sérum de veau fœtal. Ce test a mis en évidence l'impact inverse des deux facteurs sur la migration cellulaire, BMP-7 la favorise alors que BMP-2 l'inhibe (Publi. 1, Fig. 2). La comparaison de l'expression de EIIIA et BMP-2 dans les champs fémoraux droit et gauche par hybridation *in situ* a mis en évidence que l'excision de l'exon EIIIA de la fibronectine intervenait après l'expression de BMP-2 (Publi. 1, Fig. 3). L'étude de l'expression de cet exon par RT-PCR dans des fibroblastes cultivés en présence de BMP-2 ou BMP-7 a pu montrer que BMP-2 est responsable de l'épissage de cet exon et donc de l'arrêt de la migration des fibroblastes dermiques (Publi. 1, Fig. 4).



**Le passage d'un derme homogène à une condensation dermique nécessite la migration des fibroblastes dermiques favorisée par le facteur BMP-7, avec l'implication des Intégrines et du cytosquelette d'actine. La migration est arrêtée lors de l'excision de l'exon EIIIA de la fibronectine au niveau du primordia, sous l'influence de BMP-2. Ce dernier régule donc le diamètre de la condensation.**

Ces résultats ont conduit à l'élaboration d'un modèle mathématique intégratif, prenant en compte les paramètres essentiels, tels que les facteurs activateurs, les facteurs inhibiteurs et la situation initiale (Publi. 1, Fig 5, 6, 7).

Parmi les travaux effectués pour cette publication, **j'ai réalisé** l'étude du profil d'expression des facteurs Id ainsi que la mise en évidence de l'épissage alternatif de l'exon EIIIA par RT-PCR en fonction des facteurs BMP mis en présence de fibroblastes dermiques.

### Publication 1:

Frederic Michon, Loïc Forest, **Elodie Collomb**, Jacques Demongeot and Danielle Dhouailly.

#### **BMP2 and BMP7 play antagonistic roles in feather induction.**

*Development. 2008 Aug;135(16):2797-805. Epub 2008 Jul 17. (IF: 7.2)*

#### **Abstract:**

Feathers, like hairs, first appear as primordia consisting of an epidermal placode associated with a dermal condensation that is necessary for the continuation of their differentiation. Previously, the BMPs have been proposed to inhibit skin appendage formation. We show that the function of specific BMPs during feather development is more complex. *BMP2* and *BMP7*, which are expressed in both the epidermis and the dermis, are involved in an antagonistic fashion in regulating the formation of dermal condensations, and thus are both necessary for subsequent feather morphogenesis. *BMP7* is expressed earlier and functions as a chemoattractant that recruits cells into the condensation, whereas *BMP2* is expressed later, and leads to an arrest of cell migration, likely via its modulation of the EIIIA fibronectin domain and  $\alpha4$  integrin expression. Based on the observed cell proliferation, chemotaxis and the timing of *BMP2* and *BMP7* expression, we propose a mathematical model, a reaction-diffusion system, which not only simulates feather patterning, but which also can account for the negative effects of excess *BMP2* or *BMP7* on feather formation.

# **Publication 1**



# BMP2 and BMP7 play antagonistic roles in feather induction

Frederic Michon<sup>1</sup>, Loïc Forest<sup>2,\*</sup>, Elodie Collomb<sup>1</sup>, Jacques Demongeot<sup>2</sup> and Danielle Dhouailly<sup>1,†</sup>

Feathers, like hairs, first appear as primordia consisting of an epidermal placode associated with a dermal condensation that is necessary for the continuation of their differentiation. Previously, the BMPs have been proposed to inhibit skin appendage formation. We show that the function of specific BMPs during feather development is more complex. *BMP2* and *BMP7*, which are expressed in both the epidermis and the dermis, are involved in an antagonistic fashion in regulating the formation of dermal condensations, and thus are both necessary for subsequent feather morphogenesis. *BMP7* is expressed earlier and functions as a chemoattractant that recruits cells into the condensation, whereas *BMP2* is expressed later, and leads to an arrest of cell migration, likely via its modulation of the EIIIA fibronectin domain and  $\alpha 4$  integrin expression. Based on the observed cell proliferation, chemotaxis and the timing of *BMP2* and *BMP7* expression, we propose a mathematical model, a reaction-diffusion system, which not only simulates feather patterning, but which also can account for the negative effects of excess *BMP2* or *BMP7* on feather formation.

**KEY WORDS:** Dermis, Cutaneous appendage, Chemotaxis, Migration, Fibronectin, Mathematical model, Skin

## INTRODUCTION

The integument is one of the most favorable organs for the study of how regular repetitive structures can arise during development within an ensemble of apparently identical cells. In vertebrates, as opposed to in other metazoans where the integument is composed of a single stratum of ectodermal cells, the situation is complicated by the fact that the skin is formed by two tissues, the epidermis and the dermis. In amniotes, the skin is equipped with cutaneous appendages, constituted of epidermal cells, that arise from the morphogenetic collaboration of dermis and epidermis (Dhouailly, 1977; Dhouailly, 1984), and these are distributed in an orderly fashion according to regional and specific patterns. The major part of our current knowledge of the establishment of skin patterns comes from studies of the chick embryo.

Chick skin can be divided into several domains: pterylae (feather field), semi-apteria (region with a few feathers) and apteria (glabrous area) (Mayerson and Fallon, 1985; Sengel, 1976). The future pterylae are characterized by the formation of a homogeneous, dense dermis (Sengel, 1976). In the back, this occurs from days 5 to 6.5 of incubation (stages HH25 to HH29) (Hamburger and Hamilton, 1951), and at day 7 (HH30) the midline, where the first row of feathers will appear, undergoes a further density increase. Before cell migration occurs to form individual dermal condensations, cells proliferate up to a threshold of 2.6 nuclei/1000  $\mu\text{m}^3$  (Desbiens et al., 1991; Jiang and Chuong, 1992; Wessells, 1965). By contrast, in semi-apteria the cell density remains under this threshold, reaching only up to 2.0 nuclei/1000  $\mu\text{m}^3$  (Olivera-Martinez et al., 2001). We have shown previously (Michon et al., 2007) that when cell density exceeds the threshold, proliferation stops and there is a redistribution of cells to form dermal condensations, where the cell density reaches

5.52 nuclei/1000  $\mu\text{m}^3$  (Wessells, 1965). These dermal condensations arise under the epidermal placodes. These two structures form the feather primordium, and the lateral propagation of this process creates a hexagonal feather pattern.

Several signaling pathways (Chuong, 1998) have been implicated in the crosstalk between the epidermis and the dense dermis that leads to feather morphogenesis. The exact sequence of events, in the narrow time window available for primordium formation, is not yet clear. The different signals have been classified as activators or inhibitors (Jung et al., 1998). The FGF pathway acts as an activator, and its epidermal expression promotes dermal condensation formation via its chemoattractant effect on fibroblasts (Song et al., 1996; Song et al., 2004; Viallet et al., 1998). To date, BMPs have generally been considered to be inhibitors of feather formation, and three members are expressed in the primordium domain: *BMP2*, *BMP4* and *BMP7*, where *BMP2* and *BMP4* belong to the same subgroup (Miyazono et al., 2005). *BMP2* is initially expressed throughout the epidermis, but is later restricted to placodes and appears in dermal condensations (Noramly and Morgan, 1998). *BMP4* transcripts are detected only in the forming dermal condensations (Noramly and Morgan, 1998). *BMP7* is expressed throughout the epidermis before placode formation and is subsequently restricted to the primordium, in both dermis and epidermis (Harris et al., 2004). *BMP2* expression occurs earlier than *BMP4* (Houghton et al., 2005), and later than *BMP7* (Harris et al., 2004). The transcriptional regulation of *BMP2* and *BMP4* expression in embryonic skin is still unknown. *BMP7* is expressed in the epidermis under the control of an unknown dermal signal, whereas its dermal expression is regulated by canonical Wnt signaling derived from the placode (Harris et al., 2004).

Studies designed to evaluate the function of BMPs in developing skin have provided incongruous data. The BMP pathway has been demonstrated to function as an inhibitor of feather (Jung et al., 1998), as well as of hair (Botchkarev, 2003) and tooth (Pummila et al., 2007), formation, under certain experimental conditions. *BMP4*-coated beads grafted onto chick HH28 (E6) dorsal skin inhibits adjacent feather formation (Jung et al., 1998), and *BMP4* overexpression in chick embryo dorsal skin leads to the formation of glabrous areas (Noramly and Morgan, 1998). However, the other pieces of evidence are contradictory. The application of *BMP7*-

<sup>1</sup>Equipe Ontogénèse et Cellules Souches du Tégument, Centre de Recherche INSERM UJF – U823, Institut Albert Bonniot, Site Santé, La Tronche, BP170, 38042 Grenoble Cedex 9, France. <sup>2</sup>Laboratoire de Techniques de l'Imagerie, de la Modélisation et de la Cognition UMR CNRS 5525, Institut d'Informatique et de Mathématiques Appliquées de Grenoble, Faculté de Médecine, 38706 La Tronche, Cedex, France.

\*Deceased

<sup>†</sup>Author for correspondence (e-mail: Danielle.Dhouailly@ujf-grenoble.fr)

coated beads inhibits feather formation (Patel et al., 1999), although its epidermal expression has been shown to be required (Harris et al., 2004). An ectopic feather-forming dermis can be obtained in two opposite ways: by the inhibition of BMP signaling in the mid-ventral apterium (Fliniaux et al., 2004), or by grafting a BMP4-coated bead into the dorsal-scapular semi-apterium (Scaal et al., 2002). These contradictory results might be explained by spatial factors, as the molecular mechanisms responsible for the establishment of the dermis in the back and the ventral region are different (Fliniaux et al., 2004; Olivera-Martinez et al., 2002). Moreover, for the back region, whereas the use of low concentration BMP4-coated beads (20  $\mu\text{g/ml}$ ) (Scaal et al., 2002) leads to activation of feather formation, RCAS-BMP4 infection (Noramly and Morgan, 1998) or the use of high concentration BMP4-coated beads (660  $\mu\text{g/ml}$ ) (Jung et al., 1998) leads to an inhibitory effect. Additionally, some results suggest an activator role for BMP signaling. *MSX1* and *MSX2*, two BMP target genes, are expressed in the placode (Noveen et al., 1995). *DRM/gremlin* (BMP signaling antagonist) transcripts are restricted to the interfollicular domain (Bardot et al., 2004), and although follistatin (another BMP signaling antagonist) expression initially occurs throughout the placode, it rapidly shifts to a peripheral ring (Patel et al., 1999). Altogether, the expression of BMP target genes and the absence, or the transient expression, of BMP inhibitors in the follicular domain, as well as the importance of the concentration of the BMP delivered experimentally, indicate a complex role for the BMPs in feather morphogenesis.

In order to distinguish the different roles of BMP signaling in chick embryonic skin, we examined three different aspects. First, we investigated the expression of another set of downstream targets of BMP signaling, the ID genes (Hollnagel et al., 1999), thought to inhibit cell differentiation (Kreider et al., 1992; Miyazono and Miyazawa, 2002; Ogata et al., 1993). In chick, four ID genes have been identified (Kee and Bronner-Fraser, 2001), but we describe their expression in skin. Second, we studied in vitro dermal fibroblast behavior in response to different BMPs. Both fibroblast migration (Mauger et al., 1982) and Fibronectin (Chuong, 1993; Michon et al., 2007) have been implicated in the transition from a dense dermis to individual dermal condensations. Alternative splicing of the fibronectin gene has been identified as a key regulator of Fibronectin/Integrin affinity in CHO cells (Manabe et al., 1997). Furthermore, by promoting adhesion on  $\alpha 5\beta 1$  Integrin, the Fibronectin EIIIA domain was shown to induce the G1-S transition (Manabe et al., 1999). We thus studied the changes in fibronectin EIIIA domain expression during dermal organization. Finally, we established, in silico, a mathematical model based on an activation/inhibition-diffusion Turing system (Turing, 1952), which takes into account the parameters of cell density and migration.

We show that instead of acting as 'inhibitors', different BMPs play distinct crucial roles, ranging from the regulation of dermal condensation formation to the continuation of feather morphogenesis. Furthermore, our numerical simulation is not only in agreement with our biological experimental results, but also provides an explanation for apparently contradictory results (Jung et al., 1998; Noramly and Morgan, 1998)

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Fertilized eggs (JA957 strain, St Marcellin, France) were incubated for seven days at 38°C until the embryos reached Hamburger Hamilton stage 29 or 30 (Hamburger and Hamilton, 1951). rhBMP2, rhBMP7 and rhFGF2 were purchased from R&D Systems, Europe.

### Organotypic skin in vitro culture

Seven-day chick embryo (stage HH29 or 30) dorsal skins were dissected as a single piece, starting from the wing to the femoral level. They were cultured as previously described (Michon et al., 2007). For localized application, 150 to 200  $\mu\text{m}$  diameter Affi-gel Blue beads (Bio-Rad) were soaked in PBS or rhBMP7 (concentrations specified in figure legends) and then placed onto the explants.

### Dermal fibroblast in vitro culture

The dermis was separated from the epidermis by treatment with Trypsin (1.25%) and Pancreatin (4%, Sigma-Aldrich), then was mechanically dissociated into a single-cell suspension. Cells were used for RT-PCR, adherent cell culture, cell migration assay or micromass formation. To evaluate cell migration,  $2.5 \times 10^4$  cells were used for each experimental condition using the InnoCyte cell migration assay (VWR International) (Lauffenburger, 1996). Migration was measured after 10 hours by Calcein-AM dye. Fetal Bovine Serum was used as an attraction factor for cells as a positive control. Micromass culture was performed as described previously (Michon et al., 2007).

### FACS analysis

HH29 and HH30 chick embryo dorsal skins were dissected into separate medial and lateral parts. Obtained dermal cell suspensions were fixed in cold ethanol ( $2 \times 10^6$  cells/ml). Cell aggregates were broken up mechanically and cells were labeled in 0.1% NP40, 0.1 mg/ml RNase A, 50  $\mu\text{g/ml}$  Propidium Iodide (Sigma). Cells were rinsed in PBS and FACS analysis was performed using Cell Quest Pro software (Becton Dickinson).

### Molecular biology

RNA was isolated with the High Pure RNA tissue kit (Roche). Reverse transcription was performed with the SuperScript First-Strand synthesis system (Invitrogen). PCR products were analyzed with Image J software (NIH). Primers used were: cActin sense, AGACCTTCAACACCCAGC; cActin antisense, TGATTTTCATTGTGCTAGG; cEIIIA sense, ATGGTA-CAGCGTCTATGCTCA; cEIIIA antisense, AGACTGGTAGGAGTTAC-CTGA; Fibronectin sense, CAGTGGCTACCGATGACCAC; Fibronectin antisense, AGACTGGTAGGAGTTACCTGA. Primers for chick Actin were designed to discriminate between genomic and complementary DNA (926 bp versus 619 bp).

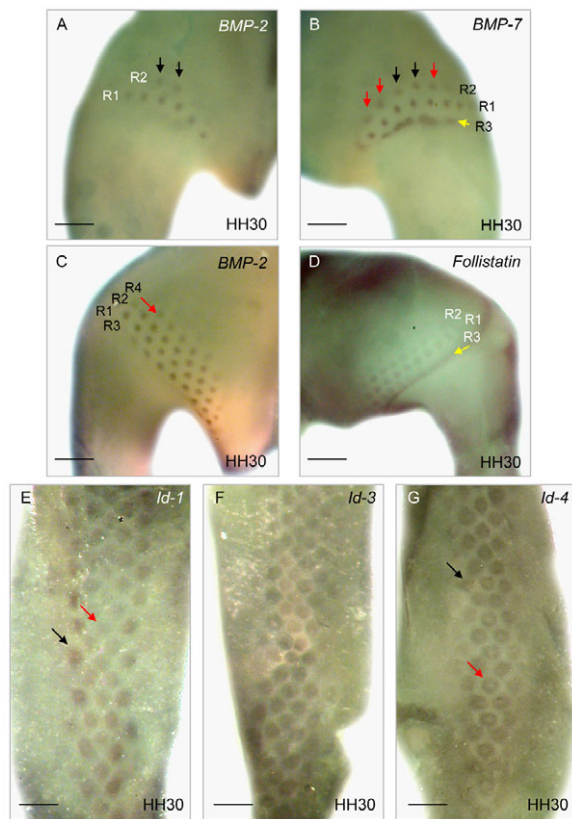
### In situ hybridization

The chick *EIIIA* probe was cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, France) [based on its published sequence (Norton and Hynes, 1987)]. The *cBMP2* and *cBMP7* probes were a gift from Dr A.-H. Monsoro-Burq (Centre Universitaire, Orsay, France). The chick follistatin probe was a gift from Dr A. Graham (King's College London, UK). The *cID1*, *cID3*, *cID4* and  $\alpha 4$  integrin probes were a gift from Dr M. Bronner-Fraser (University of California, Irvine, CA, USA). Alkaline phosphatase-labelled in situ hybridizations were carried out as previously described (Wilkinson and Nieto, 1993).

## RESULTS

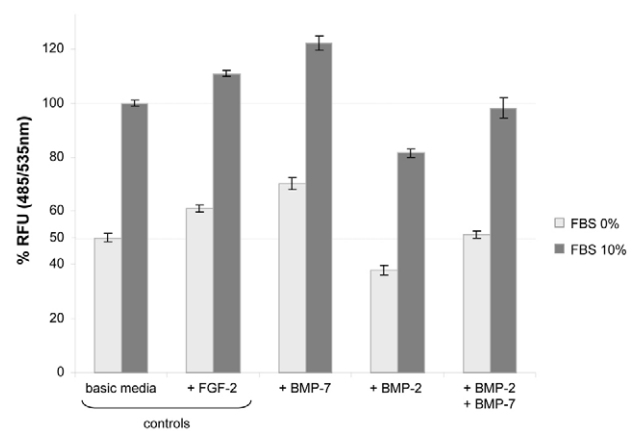
### Sequential expression of BMPs, follistatin and ID genes in early feather primordium

As the two femoral feather tracts of the same embryo develop synchronously on the left and right sides, we used them to compare the timing of expression of two genes (Houghton et al., 2005). Feather rows were numbered according to the order of appearance. The femoral tract has seventeen rows, fifteen proximal to the first one. Distal to the first row, a discontinuous line of expression that gives rise to the third row occurred. This third row forms the boundary between the femoral and zeugopodial tracts, which are on each side of a semi-apteria. The expression of *BMP2* and *BMP7* in corresponding feather primordia of the left and right halves of the same embryo were compared at HH30 ( $n=6/6$  for each comparison). In the second row of this tract, *BMP2* was expressed in only two primordia (Fig. 1A), whereas *BMP7* was expressed in



**Fig. 1. The expression of BMP pathway factors during feather primordium formation.** (A-D) The left and right femoral tract of the same HH30 embryo were compared; the numbers correspond to the order of appearance of the rows. The second row (R2) had only two feather primordia expressing *BMP2* (A), whereas five expressed *BMP7* (B). The additional primordia are indicated with red arrows and those also expressing *BMP2* with black arrows. The distal border (yellow arrow), which preceded the appearance of R3, delimited the femoral and zeugopodial tracts and already expressed *BMP7* (B) but not *BMP2* (A). In another embryo, R4 expressed *BMP2* on the left side (C, arrow), whereas follistatin was expressed only in three rows on the right (D). The continuous line (D, arrow), contiguous to R3, is the distal border of the tract, which expressed follistatin and not *BMP2*. (E-G) *ID* gene expression in the dorsal tract of HH30 embryos, analyzed by in situ hybridization with RNA probes. (E) There was a decrease of *ID1* expression from the newly formed (black arrow) to the older primordia (red arrow). (F) *ID3* transcripts showed stable expression in all the primordia. (G) *ID4* expression exhibited early expression in the entire primordia (black arrow), and later expression restricted to a peripheral ring (red arrow). Scale bars: in A-D, 1000  $\mu\text{m}$ ; in E-G, 800  $\mu\text{m}$ .

five (Fig. 1B). Follistatin (Fig. 1D), a BMP inhibitor, was expressed after *BMP2* (Fig. 1C). The *ID1*, *ID3* and *ID4* transcripts were detected in HH30 dorsal skin in the primordia (Fig. 1E-G). *ID4* expression appeared initially in the complete primordium (newly formed rows), but subsequently the transcripts were detected only as a peripheral ring (Fig. 1G). The expression of *ID1* and *ID4* was concomitant to that of *BMP2* (see Fig. S1A-D in the supplementary material), and the expression of *ID3* was concomitant to that of *BMP7* (see Fig. S1E,F in the supplementary material). These data indicate that the BMP pathway is actively involved in feather formation.



**Fig. 2. Comparative effects of BMP2 and BMP7 on dermal fibroblast cytokinesis.** A freshly dissociated dermal cell suspension was added to a cell culture insert and basic medium placed on the other side of the 8  $\mu\text{m}$  pore membrane. Two types of control were performed: first, basic media with or without FBS; and second, basic media with or without FBS, with FGF2. The first control allowed a normalization of the cell migration measurement (50.1% and 100%), the second, the validation of the chemotactic effect with FGF2 (60.8% and 110.9%). *BMP7* had an even stronger chemotactic effect (70.1% and 122.3%). Perturbation of fibroblast migration was clearly shown with *BMP2* (38.1% and 81.6%). The chemotaxis obtained with *BMP7* decreased with the addition of *BMP2* (51.2% and 98.2%). The migration was evaluated in triplicate by a fluorescent method.  $P < 0.05$  by Student's *t*-test. *BMP2* and *BMP7*, 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; FGF2, 0.33  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

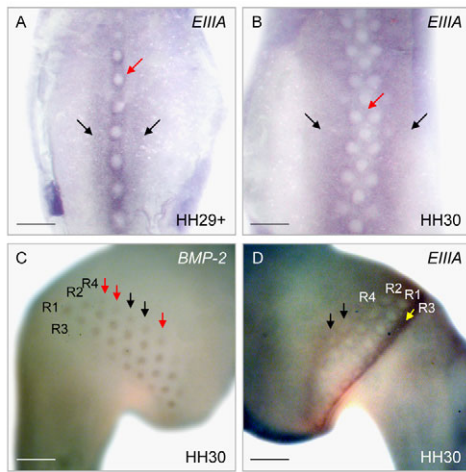
### BMP2 and BMP7 have opposite effects on dermal fibroblast migration

In order to distinguish the relative roles of *BMP2* and *BMP7*, we quantified their effects on fibroblast migration through a membrane under various conditions (Fig. 2). Two kinds of controls were performed. First, we used the basic medium with or without 10% Fetal Bovine Serum (FBS), which has a known chemoattractant effect. Secondly, we added FGF2, which is known to have a positive chemoattractant effect on dermal cells (Song et al., 2004), to the basic media with or without FBS. Each experiment, done in triplicate, was measured relative to the cell migration obtained with the basic medium containing FBS (100%). Without FBS, cell migration decreased to 50.1% ( $P < 0.001$ ). FGF2 activated cell motility, in both the presence (+11.9%,  $P < 0.01$ ) and the absence (+10.7%,  $P < 0.01$ ) of FBS. Interestingly, *BMP7* had an even stronger effect than did FGF2 in the presence (+22.2%,  $P < 0.01$ ) and the absence (+20%,  $P < 0.01$ ) of FBS, whereas *BMP2* had an inhibitory effect on migration: -18.7% ( $P < 0.01$ ) with and -11.9% ( $P < 0.01$ ) without FBS. Combining *BMP2* and *BMP7* in the same medium cancelled out the effect of each factor on dermal cell migration. The difference between the chemotactic effect of both BMPs and that of only *BMP7* was striking: -24.1% ( $P < 0.02$ ) with and -18.9% ( $P < 0.01$ ) without FBS. Our in vitro assay was independent of extracellular matrix, but, in vivo, there might be interactions between it and the BMPs.

### BMP2 modifies the expression of fibronectin EIIIA domain and $\alpha 4$ integrin

Analysis with the probe specific for the fibronectin EIIIA domain showed a lack of expression in fully formed dorsal skin dermal condensations at HH29+, although Fibronectin expression is high in this area (Chuung, 1993; Michon et al., 2007). Moreover, the

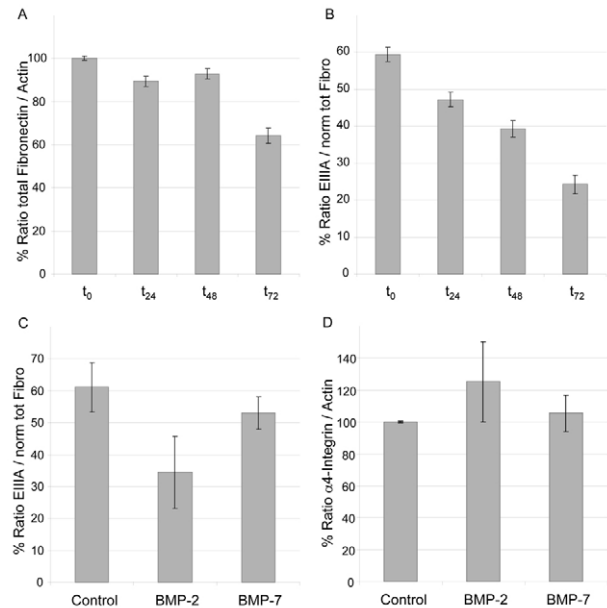




**Fig. 3. The Fibronectin exon EIIIA was involved in dermal organization.** (A, B) Chick embryo dorsal skin. (A) At HH29+, EIIIA was expressed in the periphery (red arrow) of the first feather primordia, as well as in two ribbons on either side of the first row (black arrows). (B) At HH30, the EIIIA transcripts were expressed in the periphery of primordia and in two ribbons (black arrows) on either side of feather rows, although there was a slight decrease of its expression in the three first rows (red arrow). (C, D) *BMP2* and EIIIA expression in the left and right femoral tract of the same HH30 embryo. Five feather primordia of the fourth row (R4) expressed *BMP2* (C), whereas two no longer expressed EIIIA in the corresponding right row (D). The additional primordia are indicated with red arrows and those no longer expressing EIIIA with black arrows. The R3, expressing the EIIIA domain (arrow) has started to form close to the distal border line. Scale bars: 800  $\mu$ m in A, B; 1000  $\mu$ m in C, D.

expression of the EIIIA domain was high in areas in which the dense dermis was still undergoing organization (Fig. 3A). At HH30, there was a lateral expansion of EIIIA domain expression and a slight decrease of its expression in the interfollicular domain of the first rows formed (Fig. 3B). To analyze in time the loss of the EIIIA domain transcripts, we compared its expression with that of *BMP2* ( $n=9/9$ ). Whereas *BMP2* was expressed in five primordia on the fourth row (Fig. 3C), the loss of EIIIA expression occurred only in two of the primordia of the same row (Fig. 3D). Furthermore, strong expression was detected at the distal boundary of the tract close to the third row that has started to form. The expression of *BMP2* thus preceded the alternative splicing of the fibronectin EIIIA domain.

To study the alternative splicing of EIIIA, we used freshly isolated dermal cells in two complementary approaches. In order to mimic the formation of dermal condensations in vitro by dispersed fibroblasts, we used the micromass method (Michon et al., 2007) to follow cell aggregation for 3 days. Semi-quantitative RT-PCR ( $n=3$ ) was performed in order to monitor fibronectin and fibronectin EIIIA expression (Fig. 4). There was a decrease of fibronectin expression from  $t_0$  (100%) to  $t_{72}$  (64.1%; Fig. 4A), but the proportion of fibronectin containing the EIIIA exon had decreased more, from 59.4 to 24.3%, during the same time (Fig. 4B). The relative decrease of EIIIA domain expression was also induced in adherent cell culture via the addition of BMP2. Semi-quantitative RT-PCR of primary cultured dermal fibroblasts showed expression of the EIIIA domain after 20 hours of culture under control conditions, whereas the addition of BMP2 led to a decrease of EIIIA domain expression after 20 hours of treatment, from 61.1% to 34.4% (Fig. 4C). There was a slight effect caused by BMP7 treatment, from 61.1% to 53.1%.



**Fig. 4. The regulation of EIIIA and  $\alpha 4$  integrin expression.**

(A, B) EIIIA expression in dermal fibroblasts cultured in hanging drops for 24, 48 or 72 hours. RT-PCR for Actin, total Fibronectin and the EIIIA exon were performed. Fibronectin expression was normalized to Actin expression. There was a small decrease in Fibronectin expression between  $t_0$  (100%) and  $t_{48}$  (92.8%), and, a noticeable decrease at  $t_{72}$  (64.1%; A). EIIIA expression was normalized to Fibronectin expression. During the same time-lapse, the portion of Fibronectin-expressing cells containing the EIIIA exon decreased from 59.4% to 24.3% (B). (C, D) Cells were placed in adherent culture with or without BMP2 and BMP7 (0.5  $\mu$ g/ml) for 20 hours. Then RT-PCR to detect EIIIA and integrin  $\alpha 4$  expression was performed. The portion of Fibronectin-expressing cells containing the EIIIA exon decreased with BMP2 treatment, from 61.1% to 34.4%, whereas BMP7 treatment led to a slight decrease, 53.1% (C). BMP2 treatment led to an increase of  $\alpha 4$  integrin expression, from 100% to 125.29%, whereas BMP7 induced only a non-significant increase (105.5%; D).

$\alpha 4$  Integrin was expressed in the follicular domain (data not shown), and it was shown previously in the dermal condensation (Jaspers et al., 1995). The addition of BMP2 induced the overexpression of  $\alpha 4$  integrin as well, from 100% to 125.3% (Fig. 4D). The addition of BMP7 led to a non-significant increase of  $\alpha 4$  integrin expression. As the Fibronectin EIIIA domain was shown not only to modulate the Fibronectin/Integrin interaction, but also to be implicated in the control of cell proliferation (Manabe et al., 1999), we quantified the population of cycling cells in dorsal skin before and after dermal condensation formation.

#### Cell proliferation in the chick embryo dorsal skin at HH29 and HH30

Cycling cells have been localized previously in the interfollicular dermis and not in the formed dermal condensation (Rouzankina et al., 2004; Wessells, 1965). We studied cell proliferation during dermal condensation formation in chick embryo dorsal skin from HH29 to HH30. At these stages, dorsal skin can be divided into three parts: the medial part, carrying the first dermal condensation at HH30, and the two lateral parts (see Fig. S2A, B in the supplementary material). The proportion of cycling dermal cells

in each part was determined by flow cytometry (see Fig. S2C in the supplementary material). At HH29, the difference between the lateral and the medial parts was not significant. The slight decrease of cycling cells in the medial part might reflect the start of dermal condensation formation. At HH30, the central part of the dermis, where dermal condensations are forming, had 90.9% of cells in G1, whereas in the lateral part only 77.5% of cells were in G1. The proliferation of dermal cells just before condensation formation is likely to lead to the establishment of the required cell density.

### Mathematical model for dermal condensation formation and patterning

Our results have allowed us to build a new mathematical model for feather primordia formation that includes cell proliferation and cell migration, regulated by BMP7 and BMP2 expression. The model for BMP dynamics was inspired by the activator-inhibitor model proposed by Gierer and Meinhardt (Gierer and Meinhardt, 1972). Cell migration is expressed as a chemotactic term, as in previous studies (Cruywagen et al., 1992; Painter et al., 1999). BMP7 is an activator of feather primordium formation through its effect on chemotaxis and cell recruitment, whereas BMP2 counteracts the positive effect of BMP7 on cell migration. Another important issue is that the model can be run from initial conditions consistent with the in vivo situation in the chick embryo dorsal skin at HH29.

The mathematical model describes the spatiotemporal dynamics of four variables:  $n_1$ ,  $n_2$ ,  $u$  and  $v$  in a two-dimensional space  $\Omega$ . The dermal cell population, whose concentration is noted  $n$  ( $n=n_1+n_2$ ), was divided into two subpopulations:  $n_1$  (cycling cells) and  $n_2$  (migrant cells).  $u$  and  $v$  represent the concentration and the cellular effect, respectively, of BMP7 and BMP2.

### Cellular dynamics

The proliferation of  $n_1$  cells is modeled by a logistic growth function, where  $k_p$  is the proliferation constant and  $N$  the maximal cell population.  $n_1$  cells proliferated until they reached a threshold of cell density  $n^*$  at the time  $t^*$ . After the concentration overcame the threshold,  $n_1$  cells progressively stopped proliferating and acquired the ability to migrate. This transition is determined by a 'differentiation' constant  $k_d$  (taken as being equal to  $k_p$  in the following). For  $n_2$  cells, the migration flux was modeled by a diffusive part with constant  $D_n$  and a chemotaxis part with a constant  $\chi$ . The chemoattractant is  $u$ .

Equations for  $n_1$  and  $n_2$  are:

$$\frac{\partial n_1}{\partial t} = \begin{cases} k_p n_1 (N - n_1) & \text{if } t \leq t^* \\ -k_d n_1 & \text{else} \end{cases} \quad (1)$$

$$\frac{\partial n_2}{\partial t} = D_n \Delta n_2 - \nabla \cdot (\chi n_2 \nabla u) + \begin{cases} 0 & \text{if } t \leq t^* \\ k_d n_1 & \text{else} \end{cases} \quad (2)$$

$n_{1,0}$  and  $n_{2,0}$  are the initial conditions for  $n_1$  and  $n_2$ . No flux boundary condition is used for  $n_2$ .

### BMP dynamics

$u$  and  $v$  dynamics have been given by reaction-diffusion equations.  $D_u$  and  $D_v$  denote the respective diffusion constants. Reaction terms were made of a linear degradation part (with constants  $k_u$  and  $k_v$ ) and a production part. The production part for each chemical was

constructed so as to respect the qualitative regulation between them. As they are synthesized by  $n_2$  cells, production terms are also taken proportional to  $n_2$ . We have:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D_u \Delta u + \frac{c_1 n_2 (1 + c_2 u^2)}{(c_3 + u^2)(1 + v)} - k_u u \quad (3)$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} = D_v \Delta v + c_4 n_2 u^2 - k_v v \quad (4)$$

$c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$  and  $c_4$  are positive constants.

Production terms stated that *BMP7* expression was reinforced by a 'spot' (dermal condensation) microenvironment. For  $v=0$ : (1) for small values of  $u$ , the secretion rate  $\sigma$  of *BMP7* was proportional to the number of  $n_2$  secreting cells ( $\sigma=c_1 n_2/c_3$ ); (2) for medium values of  $u$ ,  $\sigma$  followed Hill kinetics, with autocatalyse of cooperativity 2 by *BMP7* ( $\sigma=c_1 c_2 n_2 u^2/(c_3 + u^2)$ ); and (3) for high values of  $u$ , autocatalyse saturated and  $\sigma$  was proportional to  $n_2$  ( $\sigma=c_1 c_2 n_2$ ). For  $v>0$ , *BMP2* was a competitive inhibitor of *BMP7*, and both *BMP2* and *BMP7* were expressed by the same cell population (primordium domain). Initial conditions for  $u$  and  $v$  are given by  $u_0$  and  $v_0$ , which are generally taken as being equal to 0. No flux boundary conditions are used for  $u$  and  $v$ .

### Resulting model

The simple dynamics for  $n_1$  cells allows the exact computation of  $n_1(x,y,t)$ , where  $(x,y)$  are the 2D-space coordinates. If  $n^*$  is defined as a fraction  $Q$  of the maximal cell density  $N$ ,  $n^*=QN$ , we have:

$$n_1(x,y,t) = \frac{N n_{1,0}(x,y) e^{N k_d t}}{N + n_{1,0}(x,y) (e^{N k_d t} - 1)} \quad (5)$$

for  $t \leq t^*(x,y)$ , and then  $n_1(x,y,t) = n^* e^{N k_d (t-t^*)}$  if  $Q$  is small, and  $n_1(x,y,t) = n^* e^{N k_d (t-t^*)} / (1 - Q + Q e^{N k_d (t-t^*)})$ , if  $Q$  is large.  $t^*(x,y)$  is given by:

$$t^*(x,y) = \frac{1}{N k_d} \ln \left( \frac{Q(N - n_{1,0}(x,y))}{n_{1,0}(x,y)(1 - Q)} \right) \quad (6)$$

This allows directly expressing the production term of  $n_2$  cells as a delayed production term and reducing the model as follows:

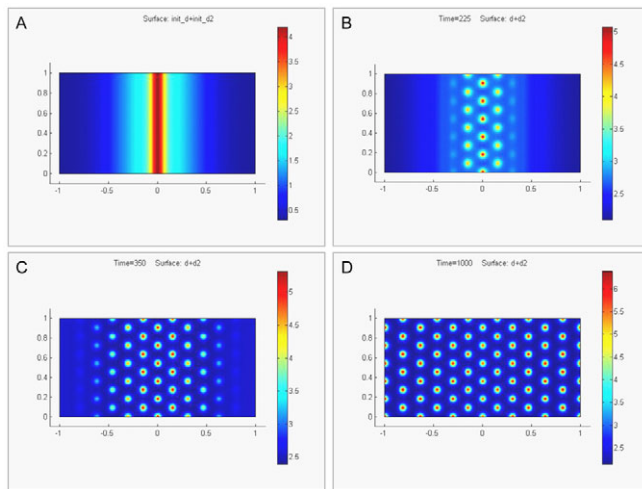
$$\begin{cases} \frac{\partial n_2}{\partial t} = D_n \Delta n_2 - \nabla \cdot (\chi n_2 \nabla u) + \begin{cases} 0 & \text{if } t \leq t^* \\ k_d n^* e^{k_d (t-t^*)} & \text{else} \end{cases} \\ \frac{\partial u}{\partial t} = D_u \Delta u + \frac{c_1 n_2 (1 + c_2 u^2)}{(c_3 + u^2)(1 + v)} - k_u u \\ \frac{\partial v}{\partial t} = D_v \Delta v + c_4 n_2 u^2 - k_v v \end{cases} \quad (7)$$

and reducing the model as equations 2, 3, 4, in which  $n_1$  is replaced by its expression above in terms of  $n^*$  and  $t^*$ .

### Numerical simulations

The calculations were made using the software COMSOL Multiphysics 3.2 and the finite elements method using squared meshes. We took  $\Omega = ]-1,1[ \times ]0,1[$  and the parameters given in Table S1 (see supplementary material).





**Fig. 5. Sequential appearance and patterning of spots with mathematical simulation.** (A) The resolution of the model led to the formation of a primary migrating cell midline. (B) The redistribution of these cells, via chemotaxis, led to the formation of spots, whereas laterally, new cells started to migrate. (C) The lateral expansion of the pattern was due to migrating cells under both chemotaxis and arresting factors. (D) At the end of the simulation, the hexagonal pattern occurred all over the modeled domain. Cell density is represented in false colors.

For the sequential spots appearance numerical experiment, the initial situations for  $n_1$  and  $n_2$  are given by:  $n_{1,0}(x)=0.25+1.7\exp(-5x^2)+0.2\exp(-200x^2)$  and  $n_{2,0}(x)=0.05+2\exp(-200x^2)$ . All other initial values are set to 0. Pulse experiments are realized using the same initial situation. Pulses are modeled by additional production terms in the equation of BMP7 or BMP2. For the local pulse of BMP7 experiment, equation 3 becomes equation 3':

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D_u \Delta u + \frac{c_1 n_2 (1 + c_2 u^2)}{(c_3 + u^2)(1 + v)} - k_u u + p_u \quad (8)$$

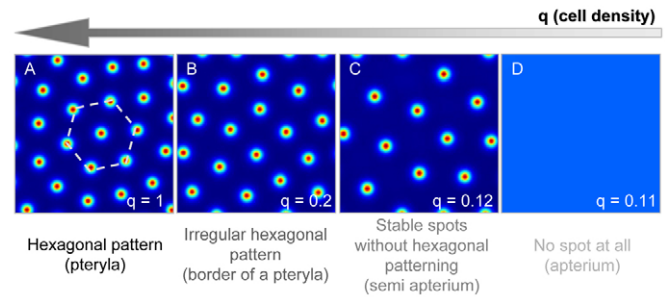
where  $p_u(x,y)=25\exp(-500(x^2+(y-0.5)^2))$ . This expression of the additional term allows the specification of sharp pulse located in the centre of the domain. For the global pulse of BMP2 we used the new term:  $p_v=700$ , and equation 4 becomes equation 4':

$$\frac{\partial v}{\partial t} = D_v \Delta v + c_4 n_2 u^2 - k_v v + p_v \quad (9)$$

To investigate the impact of cell density on the pattern, we ran the model from initial situations in which  $n_2$  cells are homogeneously distributed in the domain with a density  $q$ , affected by small random fluctuations.  $n_1$  cells are not represented. Patterns are observed at the same time  $t=1000$ .

### Dermal condensation formation obtained with numerical resolution

The result of running the simulation was the formation of a pattern of spots that closely resembles the in vivo feather pattern: a medial first row followed by the lateral formation of new rows leading to a hexagonal pattern (Fig. 5A-D; see also Movies 1 and 2 in the supplementary material). Based on previous observations of our laboratory (Olivera-Martinez et al., 2001), we included the cell densities in the dermis of apterium, semi-apterium and pteryla

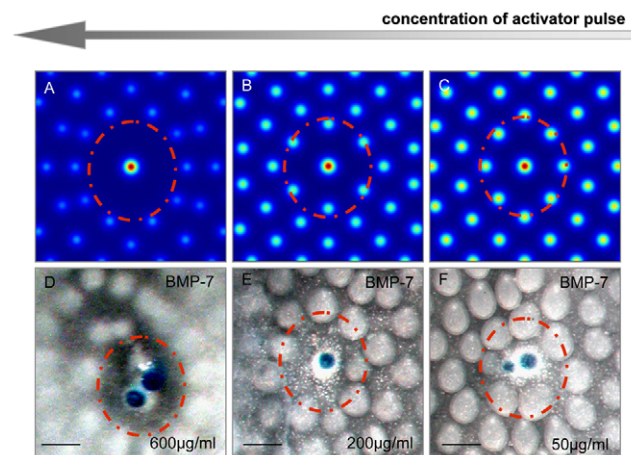


**Fig. 6. The progressive increase of the cell density correlated successively with the formation of an apterium, a semi-apterium and a pteryla.** (A) The pteryla was characterized by a regular pattern. (B,C) The decrease of cell density ( $q$ ) to 0.2 (B) and 0.12 (C) led, respectively, to an irregular pattern at the boundary of the pteryla and the semi-apteria. (D) The switch from spot formation to a glabrous region implicated only a small difference in cell density ( $q=0.12$  versus  $q=0.11$ ).

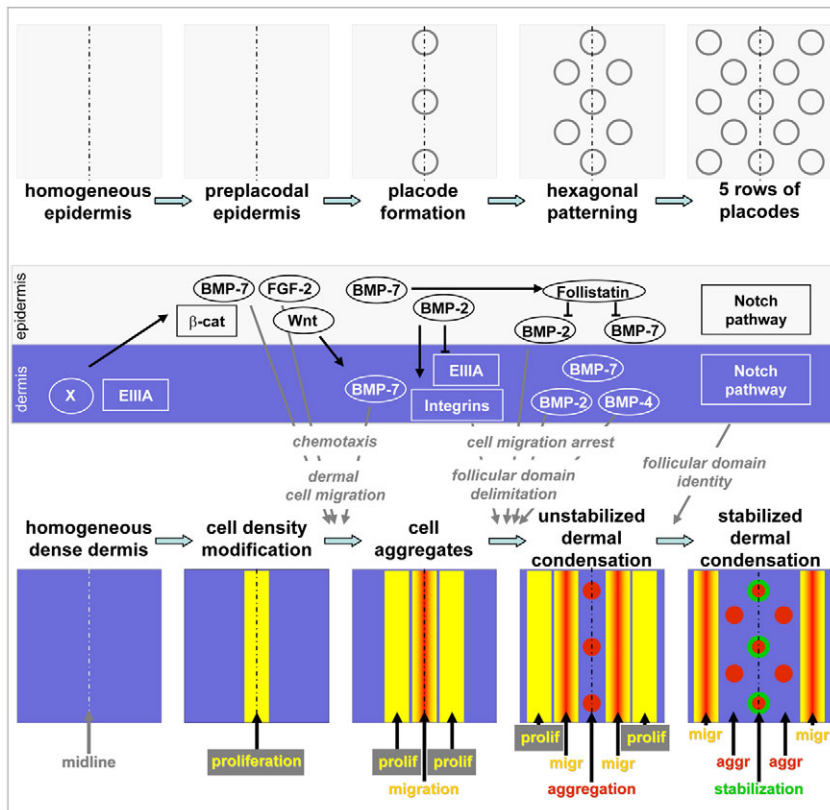
before and during the primordium formation in the model parameters. For the formation of a hexagonal pattern, the cell density threshold ( $N=2.6$ ) and its repartition between primordium ( $n=5.5$ ) and interfollicular ( $n=1.5$ ) was in accordance with the in vivo observations. For the feather tract formation, a cell density threshold ( $q=1$ ) was required (Fig. 6A). Under this threshold ( $q=0.2$  to 0.12), the pattern formation was irregular (Fig. 6B,C), similar to what is observed in semi-apteria. The cell density limit was obtained with  $q=0.11$ , where no spots were formed (Fig. 6D), similar to what occurs in apteria.

### The increase of activator, like that of inhibitor, led to spot inhibition

Using our mathematical model, an increase of the local pulse concentration of activator led to the increase of cell recruitment under the source according to the chemoattractant effect, resulting



**Fig. 7. The over-activation of chemoattraction led to similar results with mathematical simulation and organotypic culture.** (A-C) Simulation of a local pulse of activator led to the formation of an accumulation of cells, surrounded by a ring of inhibition. The size of this ring was proportional to the activator concentration. (D-F) Patterns resulting from the local application of BMP7-coated beads. The maximal area of inhibition (red circle) was obtained with the maximal concentration of BMP7.  $p_u(x,0)=c*\exp(-(x^2+(y-0.5)^2)*500)$  with  $c=4, 8$  or 24. Scale bars: 250  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 8. Model of dermal condensation formation in dorsal chick embryo skin.** The chronological events from dense dermis to stabilized dermal condensation require a molecular dialogue both inter- and intra-tissular in the skin (see the text). Note that the placodes are larger and earlier than the dermal condensations (Dhouailly, 1984). This model took into account only the BMP genes, as well as a few other important genes among those expressed in embryonic skin.

in an area of lower cell density around the source, which could not support the formation of spots. The inhibition of spot formation followed the overactivation of cell recruitment, but the pattern was maintained beyond this circle of depleted cell density (Fig. 7A-C; see also Movies 3 and 4 in the supplementary material). This result has been also obtained *in vitro* (Fig. 7D-F). The diameter of the circle lacking the formation of dermal condensations was augmented by the application of BMP7 beads loaded with increasing concentrations, presumably because of the chemoattractant effect of BMP7. The highest concentration of BMP7 used (600  $\mu\text{g/ml}$ ) dramatically affected feather patterning.

By increasing the concentration of the inhibitor pulse (see Fig. S3A-C in the supplementary material), our model also mimicked previous *in vivo* results. The area of inhibition, caused by the arrest of cell migration, increased with the inhibitor concentration, as previously described with BMP2-coated beads (Jung et al., 1998). It also mimicked the results obtained by a global pulse of overactivation in RCAS-BMP2/BMP4 experiments (Noramly and Morgan, 1998).

## DISCUSSION

The expression of BMP target genes, such as *ID1*, *ID3* and *ID4*, as shown here, or *MSX1* and *MSX2* as previously shown (Chung et al., 1996), indicates that positive effects of the BMP pathway are required for feather morphogenesis. We propose antagonistic roles for BMP7 and BMP2, during feather primordium formation. BMP7 appears to act as a chemoattractant factor for dermal fibroblasts, this effect of BMP7 has also been described on human mesenchymal stem cells (Lee et al., 2006). BMP2, which is expressed later, appears to arrest the migration, slowing down cell recruitment to the condensation. The later expression of BMP4 in the dermal condensation (Noramly and Morgan, 1998) could also

act in the arrest of cell migration because of its redundant activity with BMP2. As previously suggested in the osteogenic differentiation (Hazama et al., 1995), the concomitant presence of *BMP2*, *BMP4* and *BMP7* modifies the effect of each factor on cell migration. We propose the BMP pathway as regulator of both the formation of the dermal condensation, and the expression of *ID* and *MSX* genes, which allows the continuation of feather morphogenesis.

The different effects of BMP7 versus BMP2 and BMP4 appear linked to the activation of different receptors. BMP7 activity is mediated by its binding to Activin type I (ACTRI) (Miyazono, 1999) and type II (ACTRII) (Sebald and Mueller, 2003) receptors. A direct link between Activin receptor (ACTR) activation and cell migration has been proposed in keratinocytes (Zhang et al., 2005). These mechanisms involve Rho-GTPases, which are required for fibroblast migration (Michon et al., 2007). By contrast, BMP2/BMP4 activity is mediated by their binding to BMP type I and II receptors (Botchkarev, 2003). Infection with a RCAS dominant-negative type I BMP receptor in the prospective chick hindlimb resulted in the growth of feathers on scales (Zou and Niswander, 1996). We suggest that the enhancement of the dermal condensation, which was not limited by BMP2 signaling, was the key factor. BMP2 might negatively affect cell migration in at least three manners. First, because BMP2 in our *in vitro* experiments regulated the alternative splicing of the EIIIA domain of Fibronectin, we suggest that it might have a similar role *in vivo*. Although there is an increase of Fibronectin deposition in the dermal condensation (Mauger et al., 1982; Michon et al., 2007), the fibronectin EIIIA domain is spliced out in this area. Indeed, the skin expression pattern of EIIIA reflects the state of dermal organization: cell migration (EIIIA expression), or the formation of dermal condensations (loss of EIIIA expression). Second, BMP2 might regulate cell migration

via a direct effect on integrin expression. Here, we showed an upregulation of  $\alpha 4$  integrin expression. Likewise, BMP2 modulates the expression of  $\beta 1$  integrin in osteoblasts (Sotobori et al., 2006), or of  $\alpha 2$  and  $\alpha 7$  integrin in satellite cells (Ozeki et al., 2007). This direct link between BMP2 and integrin expression could explain the rapid effect on primary dermal cells that we observed in our cell migration assay. Finally, the loss of EIIIA in dermal condensation correlates, as has been previously shown in other organs (Manabe et al., 1999; Manabe et al., 1997), with the absence of cycling cells in dermal condensations (Jiang and Chuong, 1992; Wessells, 1965), and could thus reflect an indirect role for the BMP2 pathway on cell cycle regulation. Altogether, the expression of *BMP2* in dermal condensations could trigger both the arrest of dermal cell migration, through the modulation of adhesion factors, and the arrest of cell proliferation.

Consistent with these processes, we propose a mathematical model that includes cell proliferation and cell migration by chemotaxis, but that is still far less intricate than is reality. It is a single layer model that does not take into account the first epidermal *BMP7* impulse or its role in the stabilization of the formed structures, or a potential heterodimerization between the BMPs. In our model, we have attributed a chemoattractant role to *BMP7* and an arrest role to *BMP2*. It closely mimics the sequential hexagonal pattern formation observed in vivo, and clarifies the relation between cell densities and spot formation, which was hinted at in previous in vitro experiments (Jiang et al., 1999). Moreover, we showed that the difference in cell density that is required to switch from the formation of spots to a glabrous area is small (9%). Our mathematical model can also explain previous biological results, which concluded that BMP factors act as inhibitors. The use of a point source of a high concentration of activator, which induces an over-recruitment of cells, creates an area without the required cell density for dermal condensation formation, and thus mimics the nude area around a *BMP7*-coated bead, which was previously interpreted as an inhibitory effect (Patel et al., 1999). Our model explains this result as an over-activation of chemotaxis. Other biological results that were reproduced by our model are RCAS-*BMP2* skin infection (Noramly and Morgan, 1998), the use of *BMP2*-coated beads (Jung et al., 1998), and the addition of *BMP2* in the culture medium (our experiments). All of these methods led to the homogeneous overactivation of *BMP2* in areas that then stay glabrous. Our simulation showed that a local or a homogeneously high concentration of the factor that arrests cell migration led to the formation of a glabrous area. Our model can also partially explain the effects of *FGF4*-coated beads on chick skin, i.e. the appearance of the typical small inhibition ring around the bead (chemotaxis), but not the feather bud fusions (Jung et al., 1998; Widelitz et al., 1996).

Finally, we propose a new view of BMPs and dermis organization, which is consistent with previous results, although not with their interpretations. It consists of three major steps: dermal cell migration, follicular domain delimitation, and the establishment of follicular domain identity (Fig. 8). Initially there is a limited proliferation along the dorsal midline until a critical cell density is obtained. Then, the molecular dialogue between the epidermis and the dermis, which leads to primordium formation, initiates. Activation of  $\beta$ -catenin in the epidermis (Noramly et al., 1999) is necessary for placode formation and, consequently, dermal organization. The first permissive dermal signaling is a combination of factors: WNT, for  $\beta$ -catenin stabilization; and others that initiate *FGF2* and *BMP7* expression in the epidermis (Harris et al., 2004). The loss of either *FGF2*, in the *Scaleless* mutant, or *BMP7* function

in the epidermis leads to feather defects (Song et al., 1996; Song et al., 2004; Viallet et al., 1998; Harris et al., 2004). Diffusible epidermal chemoattractant factors, such as *BMP7* and *FGF2* (Song et al., 2004), trigger the migration of dermal cells to the placodal area. Then, the dermal expression of *BMP7*, which is regulated by a placodal WNT signal (Harris et al., 2004), enhances this process. *BMP2* expression, in the placode and then in the dermal condensation (Noramly and Morgan, 1998), could modify dermal integrin expression and regulate the splicing of fibronectin EIIIA; both of these events lead to a decrease of dermal cell migration capabilities, signifying the second phase of follicular domain delimitation. Two other facts contribute to the limitation of the feather primordium diameter. The induction by *BMP7* of follistatin expression (Patel et al., 1999) leads to a lateral inhibition of BMP signaling, which is reinforced by the expression of *DRM/gremlin* (Bardot et al., 2004). Finally, the induction of the Notch system, after *BMP2* expression (F.M., unpublished), stabilizes (Chen et al., 1997) the follicular domain identity by strengthening its boundaries.

Our main conclusion is that different members of the BMP family play at least two important roles in chick dermal condensation formation. First, epidermal, and then dermal, *BMP7* activates the migration of dermal fibroblasts to the appendage domain via chemotaxis. Second, epidermal, and then dermal, *BMP2* stops the migration, probably by regulating the expression of integrin and fibronectin EIIIA. This effect, later reinforced by the expression of *BMP4* in the dermis, may lead to the limitation of dermal condensation size. Moreover, the activation of target genes, such as members of the ID and MSX families, suggests a subtle cell transcriptome regulation in the primordium, caused by the transcriptional inhibitor role of the ID factors (Kreider et al., 1992; Miyazono and Miyazawa, 2002) and the transcriptional activator role of the MSX factors (Lallemand et al., 2005; Ramos and Robert, 2005) during the continuation of feather morphogenesis.

We are grateful to Dr M. O'Guin, Dr I. Olivera-Martinez, Dr D. J. Pearton, Dr T. Sun and Dr M. Tummers for critical reading of the manuscript. We thank Dr N. T. Chartier for the FACS experiments and Mrs B. Peyrusse for the iconography. F.M. was the recipient of a doctoral fellowship from the French Ministère de la Recherche. This work was supported by the CNRS and by INSERM. This article is dedicated to the memory of Loïc Forest.

#### Supplementary material

Supplementary material for this article is available at <http://dev.biologists.org/cgi/content/full/135/16/2797/DC1>

#### References

- Bardot, B., Lecoine, L., Fliniaux, I., Huillard, E., Marx, M. and Viallet, J. P. (2004). *Drm/Gremlin*, a BMP antagonist, defines the interbud region during feather development. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 149-156.
- Botchkarev, V. A. (2003). Bone morphogenetic proteins and their antagonists in skin and hair follicle biology. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 36-47.
- Chen, C. W., Jung, H. S., Jiang, T. X. and Chuong, C. M. (1997). Asymmetric expression of *Notch/Delta/Serrate* is associated with the anterior-posterior axis of feather buds. *Dev. Biol.* **188**, 181-187.
- Chuong, C. M. (1993). The making of a feather: homeoproteins, retinoids and adhesion molecules. *BioEssays* **15**, 513-521.
- Chuong, C. M. (1998). *Molecular Basis of Epithelial Appendage Morphogenesis*. Austin, TX: Landes Bioscience.
- Chuong, C. M., Widelitz, R. B., Ting-Berret, S. and Jiang, T. X. (1996). Early events during avian skin appendage regeneration: dependence on epithelial-mesenchymal interaction and order of molecular reappearance. *J. Invest. Dermatol.* **107**, 639-646.
- Cruywagen, G. C., Maini, P. K. and Murray, J. D. (1992). Sequential pattern formation in a model for skin morphogenesis. *IMA J. Math. Appl. Med. Biol.* **9**, 227-248.
- Desbiens, X., Queva, C., Jaffredo, T., Stehelin, D. and Vandenbunder, B. (1991). The relationship between cell proliferation and the transcription of the nuclear oncogenes *c-myc*, *c-myb* and *c-ets-1* during feather morphogenesis in the chick embryo. *Development* **111**, 699-713.



- Dhouailly, D.** (1977). Dermo-epidermal interactions during morphogenesis of cutaneous appendages in amniotes. In *Frontier Matrix Biology*, vol. 4 (ed. L. Robert), pp. 85-91. Paris: Creteil.
- Dhouailly, D.** (1984). Specification of feather and scale patterns. In *Pattern formation* (ed. G. Malacinski and S. Bryant), pp. 581-601. London: Macmillan.
- Fliniaux, I., Viallet, J. P. and Dhouailly, D.** (2004). Signaling dynamics of feather tract formation from the chick somatopleure. *Development* **131**, 3955-3966.
- Gierer, A. and Meinhardt, H.** (1972). A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* **12**, 30-39.
- Hamburger, V. and Hamilton, H. L.** (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**, 49-92.
- Harris, M. P., Linkhart, B. L. and Fallon, J. F.** (2004). Bmp7 mediates early signaling events during induction of chick epidermal organs. *Dev. Dyn.* **231**, 22-32.
- Hazama, M., Aono, A., Ueno, N. and Fujisawa, Y.** (1995). Efficient expression of a heterodimer of bone morphogenetic protein subunits using a baculovirus expression system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 859-866.
- Hollnagel, A., Oehlmann, V., Heymer, J., Ruther, U. and Nordheim, A.** (1999). Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 19838-19845.
- Houghton, L., Lindon, C. and Morgan, B. A.** (2005). The ectodysplasin pathway in feather tract development. *Development* **132**, 863-872.
- Jaspers, M., Wu, R. R., Van der Schueren, B. and Cassiman, J. J.** (1995). Localization of alpha 4m integrin at sites of mesenchyme condensation during embryonic mouse development. *Differentiation* **59**, 79-86.
- Jiang, T. X. and Chuong, C. M.** (1992). Mechanism of skin morphogenesis. I. Analyses with antibodies to adhesion molecules tenascin, N-CAM, and integrin. *Dev. Biol.* **150**, 82-98.
- Jiang, T. X., Jung, H. S., Widelitz, R. B. and Chuong, C. M.** (1999). Self-organization of periodic patterns by dissociated feather mesenchymal cells and the regulation of size, number and spacing of primordia. *Development* **126**, 4997-5009.
- Jiang, T. X., Widelitz, R. B., Shen, W. M., Will, P., Wu, D. Y., Lin, C. M., Jung, H. S. and Chuong, C. M.** (2004). Integument pattern formation involves genetic and epigenetic controls: feather arrays simulated by digital hormone models. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 117-135.
- Jung, H. S., Francis-West, P. H., Widelitz, R. B., Jiang, T. X., Ting-Berreth, S., Tickle, C., Wolpert, L. and Chuong, C. M.** (1998). Local inhibitory action of BMPs and their relationships with activators in feather formation: implications for periodic patterning. *Dev. Biol.* **196**, 11-23.
- Kee, Y. and Bronner-Fraser, M.** (2001). Id4 expression and its relationship to other Id genes during avian embryonic development. *Mech. Dev.* **109**, 341-345.
- Kreider, B. L., Benezra, R., Rovera, G. and Kadesch, T.** (1992). Inhibition of myeloid differentiation by the helix-loop-helix protein Id. *Science* **255**, 1700-1702.
- Lallemand, Y., Nicola, M. A., Ramos, C., Bach, A., Cloment, C. S. and Robert, B.** (2005). Analysis of Msx1; Msx2 double mutants reveals multiple roles for Msx genes in limb development. *Development* **132**, 3003-3014.
- Lauffenburger, D. A.** (1996). Cell motility. Making connections count. *Nature* **383**, 390-391.
- Lee, D. H., Park, B. J., Lee, M. S., Lee, J. W., Kim, J. K., Yang, H. C. and Park, J. C.** (2006). Chemotactic migration of human mesenchymal stem cells and MC3T3-E1 osteoblast-like cells induced by COS-7 cell line expressing rhBMP-7. *Tissue Eng.* **12**, 1577-1586.
- Manabe, R., Ohe, N., Maeda, T., Fukuda, T. and Sekiguchi, K.** (1997). Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment. *J. Cell Biol.* **139**, 295-307.
- Manabe, R., Ohe, N. and Sekiguchi, K.** (1999). Alternatively spliced EDA segment regulates fibronectin-dependent cell cycle progression and mitogenic signal transduction. *J. Biol. Chem.* **274**, 5919-5924.
- Mauger, A., Demarchez, M., Herbage, D., Grimaud, J. A., Druguet, M., Hartmann, D. and Sengel, P.** (1982). Immunofluorescent localization of collagen types I and III, and of fibronectin during feather morphogenesis in the chick embryo. *Dev. Biol.* **94**, 93-105.
- Mayerson, P. L. and Fallon, J. F.** (1985). The spatial pattern and temporal sequence in which feather germs arise in the white Leghorn chick embryo. *Dev. Biol.* **109**, 259-267.
- Michon, F., Charveron, M. and Dhouailly, D.** (2007). Dermal condensation formation in the chick embryo: requirement for integrin engagement and subsequent stabilization by a possible notch/integrin interaction. *Dev. Dyn.* **236**, 755-768.
- Miyazono, K.** (1999). Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins. *Bone* **25**, 91-93.
- Miyazono, K. and Miyazawa, K.** (2002). Id: a target of BMP signaling. *Sci. STKE* **2002**, PE40.
- Miyazono, K., Maeda, S. and Imamura, T.** (2005). BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 251-263.
- Noramly, S. and Morgan, B. A.** (1998). BMPs mediate lateral inhibition at successive stages in feather tract development. *Development* **125**, 3775-3787.
- Noramly, S., Freeman, A. and Morgan, B. A.** (1999). beta-catenin signaling can initiate feather bud development. *Development* **126**, 3509-3521.
- Norton, P. A. and Hynes, R. O.** (1987). Alternative splicing of chicken fibronectin in embryos and in normal and transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 4297-4307.
- Noveen, A., Jiang, T. X., Ting-Berreth, S. A. and Chuong, C. M.** (1995). Homeobox genes Msx-1 and Msx-2 are associated with induction and growth of skin appendages. *J. Invest. Dermatol.* **104**, 711-719.
- Ogata, T., Wozney, J. M., Benezra, R. and Noda, M.** (1993). Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene, Id (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast-like cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9219-9222.
- Olivera-Martinez, I., Thelu, J., Teillet, M. A. and Dhouailly, D.** (2001). Dorsal dermis development depends on a signal from the dorsal neural tube, which can be substituted by Wnt-1. *Mech. Dev.* **100**, 233-244.
- Olivera-Martinez, I., Missier, S., Fraboulet, S., Thelu, J. and Dhouailly, D.** (2002). Differential regulation of the chick dorsal thoracic dermal progenitors from the medial dermomyotome. *Development* **129**, 4763-4772.
- Ozeki, N., Jethanandani, P., Nakamura, H., Ziober, B. L. and Kramer, R. H.** (2007). Modulation of satellite cell adhesion and motility following BMP2-induced differentiation to osteoblast lineage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**, 54-59.
- Painter, K. J., Maini, P. K. and Othmer, H. G.** (1999). Stripe formation in juvenile Pomacanthus explained by a generalized Turing mechanism with chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5549-5554.
- Patel, K., Makarenkova, H. and Jung, H. S.** (1999). The role of long range, local and direct signalling molecules during chick feather bud development involving the BMPs, follistatin and the Eph receptor tyrosine kinase Eph-A4. *Mech. Dev.* **86**, 51-62.
- Pummila, M., Fliniaux, I., Jaatinen, R., James, M. J., Laurikkala, J., Schneider, P., Thesleff, I. and Mikkola, M. L.** (2007). Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression. *Development* **134**, 117-125.
- Ramos, C. and Robert, B.** (2005). msh/Msx gene family in neural development. *Trends Genet.* **21**, 624-632.
- Rouzankina, I., Abate-Shen, C. and Niswander, L.** (2004). Dlx genes integrate positive and negative signals during feather bud development. *Dev. Biol.* **265**, 219-233.
- Scaal, M., Prols, F., Fuchtbauer, E. M., Patel, K., Hornik, C., Kohler, T., Christ, B. and Brand-Saberi, B.** (2002). BMPs induce dermal markers and ectopic feather tracts. *Mech. Dev.* **110**, 51-60.
- Sebald, W. and Mueller, T. D.** (2003). The interaction of BMP-7 and ActRII implicates a new mode of receptor assembly. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 518-521.
- Sengel, P.** (1976). *Morphogenesis of Skin*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Song, H., Wang, Y. and Goetinck, P. F.** (1996). Fibroblast growth factor 2 can replace ectodermal signaling for feather development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10246-10249.
- Song, H. K., Lee, S. H. and Goetinck, P. F.** (2004). FGF-2 signaling is sufficient to induce dermal condensations during feather development. *Dev. Dyn.* **231**, 741-749.
- Sotobori, T., Ueda, T., Myoui, A., Yoshioka, K., Nakasaki, M., Yoshikawa, H. and Itoh, K.** (2006). Bone morphogenetic protein-2 promotes the haptotactic migration of murine osteoblastic and osteosarcoma cells by enhancing incorporation of integrin beta1 into lipid rafts. *Exp. Cell Res.* **312**, 3927-3938.
- Tao, H., Yoshimoto, Y., Yoshioka, H., Nojima, T., Noji, S. and Ohuchi, H.** (2002). FGF10 is a mesenchymally derived stimulator for epidermal development in the chick embryonic skin. *Mech. Dev.* **116**, 39-49.
- Turing, A. M.** (1952). The chemical basis of morphogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **237**, 37-72.
- Viallet, J. P., Prin, F., Olivera-Martinez, I., Hirsinger, E., Pourquié, O. and Dhouailly, D.** (1998). Chick Delta-1 gene expression and the formation of the feather primordia. *Mech. Dev.* **72**, 159-168.
- Wessells, N. K.** (1965). Morphology and proliferation during early feather development. *Dev. Biol.* **12**, 131-153.
- Widelitz, R. B., Jiang, T. X., Noveen, A., Chen, C. W. and Chuong, C. M.** (1996). FGF induces new feather buds from developing avian skin. *J. Invest. Dermatol.* **107**, 797-803.
- Wilkinson, D. G. and Nieto, M. A.** (1993). Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Meth. Enzymol.* **225**, 361-373.
- Zhang, L., Deng, M., Parthasarathy, R., Wang, L., Mongan, M., Molkentin, J. D., Zheng, Y. and Xia, Y.** (2005). MEK1 transduces activin signals in keratinocytes to induce actin stress fiber formation and migration. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 60-65.
- Zou, H. and Niswander, L.** (1996). Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* **272**, 738-741.



## 2. LA SPÉCIFICATION DE L'ÉPITHÉLIUM CORNÉEN

Contrairement à la peau, les mécanismes moléculaires conduisant à l'organogenèse de la cornée, et plus particulièrement à la différenciation de l'épithélium cornéen étaient inconnus. L'expression très tardive du marqueur de la différenciation terminale, la kératine 12, ne permet pas de déterminer à quel moment au cours de l'embryogenèse le programme cornéen est mis en place. Mes travaux de thèse étaient de déterminer à quel stade du développement se réalise la spécification, puis la détermination de l'épithélium cornéen et quels sont les tissus et les signaux moléculaires impliqués dans ce processus.

### 2.1. ÉTUDE TRANSCRIPTOMIQUE COMPARATIVE ENTRE LE PROGRAMME CORNÉEN ET LE PROGRAMME ÉPIDERMIQUE

#### 2.1.1. PROBLÉMATIQUE

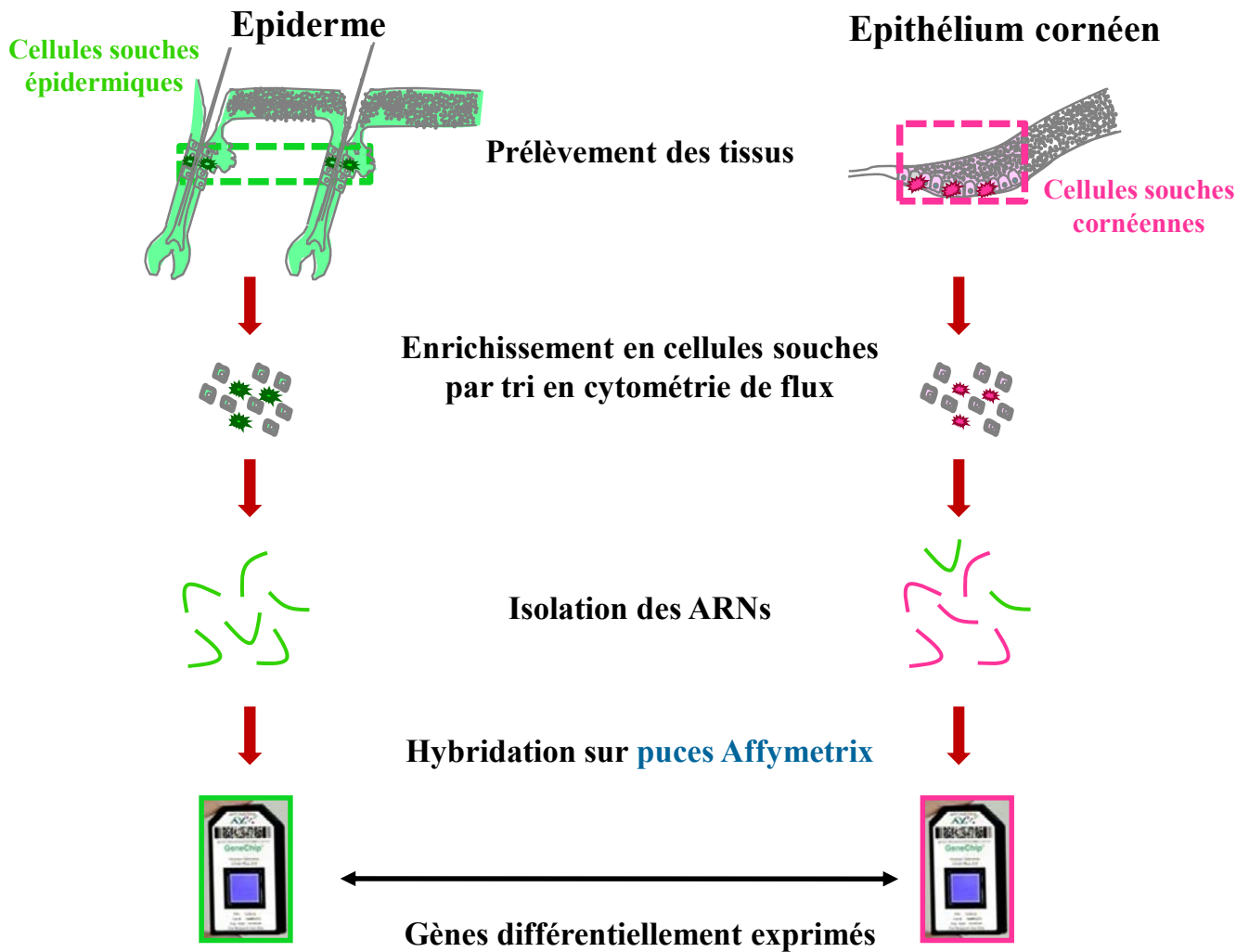
Lors de la morphogenèse de l'œil se posait la problématique de **l'absence de marqueur précoce de spécification de l'épithélium cornéen par rapport à l'ectoderme adjacent** à devenir épidermique. La capacité de transformation des cellules épithéliales cornéennes en épiderme sous l'influence d'un signal Wnt illustre le caractère proche qui existe entre ces deux tissus. Afin de définir le programme cornéen, je l'ai comparé au programme épidermique, au niveau de leurs cellules souches respectives. L'objectif trop ambitieux de cette étude était de trouver une voie de signalisation ou un facteur de transcription clé dont l'expression dans des cellules souches épidermiques permettrait la formation d'un épithélium cornéen. Le suivi de son expression au cours de l'organogenèse de l'œil devait permettre de trouver à quel moment l'épithélium cornéen est spécifié.

J'ai réalisé, avec l'aide d'I. Fliniaux, post-doctorante dans le laboratoire en 2007, une **étude transcriptomique comparative entre les cellules souches du limbe et les cellules souches du bulge** afin de déterminer les facteurs spécifiques au programme cornéen (Fig. 25). L'étude a été réalisée à partir de tissus de souris. Les marqueurs membranaires choisis et déjà employés dans des études similaires, afin d'isoler les cellules souches par cytométrie en flux sont les sous-unités d'Intégrine  $\alpha 6$  (CD49f) et  $\beta 1$  (CD29) pour le limbe, et la sous-unité d'Intégrine  $\alpha 6$  (CD49f) et le marqueur de surface CD34 pour le bulge (Blanpain et al., 2004; Pajooohesh-Ganji et al., 2006).

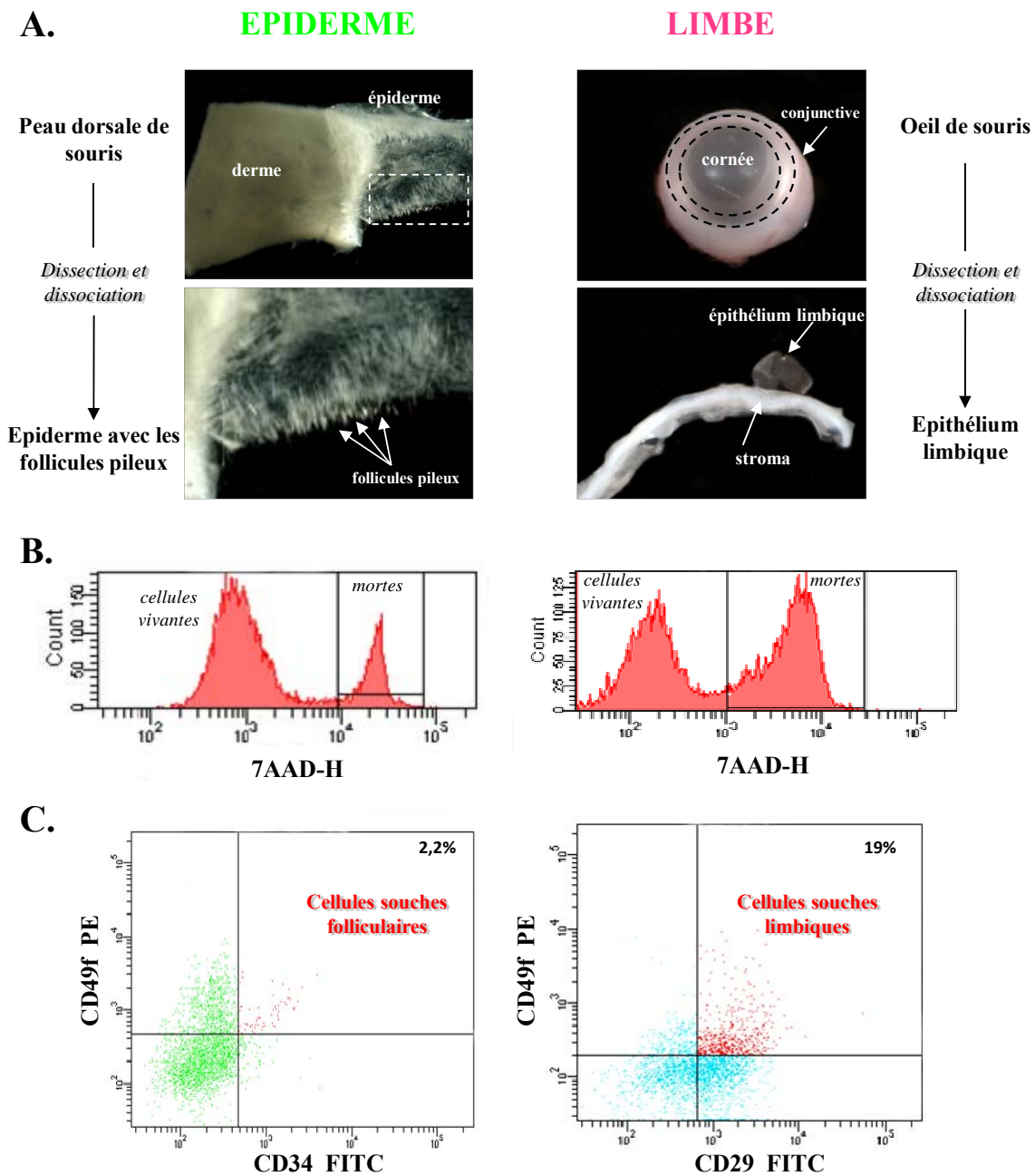
#### 2.1.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

##### 2.1.2.1. Dissection tissulaire et dissociation cellulaire

Le prélèvement de l'œil a été effectué sur des souris OF1 adultes, alors que celui de la peau dorsale a été effectué sur des jeunes souris OF1 de 3 semaines, la peau étant moins épaisse, ce qui facilite la dissection tissulaire (Fig. 26 A). Après une dissection plus précise de la zone du limbe, l'épithélium limbique est séparé du stroma sous-jacent après une incubation d'une heure à température ambiante dans une solution saline contenant de l'EDTA. L'épiderme est



**Figure 25 :** Schéma des différentes étapes de l'étude transcriptomique comparative entre les cellules souches épidermiques et les cellules souches limbiques.



**Figure 26 :** De la dissection tissulaire à l'enrichissement en cellules souches.

(A) Après la dissection de la peau et du limbe, la dissociation de l'épithélium avec son mésenchyme est effectuée grâce à une solution enzymatique (Trypsine-EDTA) pour la peau et par une solution d'EDTA pour le limbe. (B) Après une dissociation des épithélia en suspension cellulaire, les cellules vivantes sont sélectionnées sur les critères d'exclusion du marqueur des acides nucléiques, 7AAD qui ne peut pénétrer dans les cellules que lors de la perte d'intégrité de membrane plasmique lors de nécrose cellulaire. (C) Les cellules issues de l'épiderme exprimant à la fois CD49f et CD34 représentent les cellules souches folliculaires, alors que les cellules issues de l'épithélium limbiques exprimant à la fois CD49f et CD29 sont les cellules souches limbiques.



séparé du derme par un traitement à la trypsine (1,25%) - EDTA (0,75%) pendant 30 min à 37°C. Une fois l'épithélium cornéen et l'épiderme isolés, la dissociation des cellules est réalisée dans une solution de trypsine-EDTA. Après plusieurs rinçages, les suspensions cellulaires sont passées au travers de deux tamis cellulaires de 100µm et 70µm (BD).

#### **2.1.2.2. Isolation des cellules souches par tri cellulaire**

Les cellules dissociées sont resuspendues dans une solution de PBS/10% SVF froid, à laquelle sont rajoutés les anticorps suivants en fonction du type cellulaire: anticorps de hamster anti-CD19 (Intégrine  $\beta$ 1) de rat couplé au FITC (utilisé à 1µg/10<sup>6</sup> cellules) (BD Pharmingen), anticorps de rat anti-CD34 de souris couplé au FITC (utilisé à 1µg/10<sup>6</sup> cellules) (BD Pharmingen) et anticorps de rat anti-CD49f (Intégrine  $\alpha$ 6) humain couplé à la Phycoérythrine (PE) (utilisé à 1µg/10<sup>6</sup> cellules) (BD Pharmingen). Après l'incubation des anticorps à 4°C pendant une heure, s'en suit une série de lavages. Afin de sélectionner les cellules vivantes à trier, une solution de 7AAD (0,25µg/ 10<sup>6</sup> cellules) (BD Pharmingen) est rajoutée 30 minutes avant l'analyse au cytomètre. En effet, les cellules marquées au 7AAD sont les cellules dont l'intégrité membranaire est perdue, ce qui est signe d'une mort cellulaire (Fig. 26 B). La population cellulaire est analysée et triée sur un cytomètre BD FACS Aria avec une buse de 70µm et une pression de 70psi. Les critères de tri sont choisis afin d'avoir un enrichissement en cellules doublement marquées (Fig. 26 C). La suspension cellulaire triée est ensuite centrifugée et le culot cellulaire est resuspendu dans le tampon d'extraction du kit RNeasy Micro kit (Qiagen) puis conservé à -80°C jusqu'à l'extraction.

#### **2.1.2.3. Hybridation sur puces Affymetrix**

Les échantillons d'ARN total après extraction avec le kit RNeasy Micro kit (Qiagen) ont été envoyés sur la plateforme Affymetrix de Cogenics (Morrisville, US). Après la validation de la qualité des ARNs grâce à l'« Agilent Bioanalyzer 2100 », une reverse transcription et une transcription *in vitro* réalisée en présence de nucléotides biotinylés afin d'obtenir de l'ARN complémentaire (ARNc), ceux-ci ont été hybridés sur la puce «Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0». L'analyse des différences d'intensités fluorescentes entre les puces hybridées avec les ARNc de limbe, et celles hybridées avec les ARNc de bulge permettent d'avoir une vision pratiquement exhaustive des gènes surexprimés ou sous-exprimés dans un type tissulaire par rapport à l'autre.

#### **2.1.2.4. Analyse statistique des données**

L'analyse des données fournies par la plateforme Affymetrix a été réalisée en collaboration avec le Dr. Dembele (IGBMC, Strasbourg). La normalisation des données a été réalisée en parallèle par deux méthodes biostatistiques: l'algorithme MAS (Microarray Array Software) et RMA (Robust Multi-array Average), afin d'être sûr de la fiabilité de la liste de gènes résultants.

### 2.1.2.5. Validation des données par PCR quantitative

Afin de valider les données obtenues avec les puces, une quantification relative du niveau d'expression de certains gènes sélectionnés a été réalisée par PCR quantitative. L'extraction d'ARN a été réalisée avec kit RNeasy Micro kit (Qiagen). Les ARNm sont rétrotranscrits en ADNc à l'aide du kit commercial SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen). La détection du niveau d'expression est faite en utilisant le thermocycler Stratagene MX-3000P à l'aide de la détection du Sybr Green. Les gènes *Ranbp1* et *Gapdh* sont des gènes de ménage utilisés comme contrôle afin de normaliser les niveaux d'expressions détectés entre les différents types cellulaires. Le ratio est fait entre le niveau d'expression d'un gène dans les cellules épidermiques par rapport aux cellules cornéennes.

### 2.1.3. RÉSULTATS

J'ai mis au point, avec l'aide de I. Fliniaux, une procédure de dissociation tissulaire et cellulaire afin d'obtenir un épithélium et un épiderme purs (Fig. 26 A). Après sélection des cellules vivantes (7AAD négatives) (Fig. 26 B), l'isolation des cellules souches épidermiques et cornéennes, par cytométrie en flux, a permis d'atteindre le pourcentage de cellules souches putatives, par rapport aux cellules totales triées, de 19% dans le cas de l'épithélium limbique et de 2,2% dans le cas de l'épiderme (Fig. 26 C). Cette différence peut s'expliquer par le fait que le limbe est un réservoir des cellules souches, alors que dans le second cas, l'analyse est faite sur l'ensemble des kératinocytes d'épiderme et des follicules pileux.

Pour sélectionner les probesets, les plus différentiellement exprimés du point de vue du test statistique et pour lesquels l'erreur globale est faible, le seuil de la probabilité du test (*p*-value) a été fixé à 0.01. Nous avons également fixé arbitrairement le niveau de changement entre les deux conditions expérimentales (Epiderme et Limbe) à deux (FC pour Fold Change) afin d'obtenir des listes de gènes dont le niveau d'expression diffère de façon significative. En utilisant ces choix pour les données de MAS5.0 et de RMA, nous avons obtenu une liste de 3621 probesets différentiellement exprimés. Parmi ceux-ci, 1768 sont surexprimés et 1853 sont sous-exprimés dans les cellules souches limbiques par rapport aux cellules souches épidermiques (Fig. 27). On retrouve 17959 gènes dont l'expression ne varie pas de façon significative entre les cellules souches cornéennes et les cellules souches épidermiques. Parmi cette longue liste de gènes communs, on retrouve les kératines 5 et 14 connues pour être exprimées dans les épithélia non différenciés. Le facteur de transcription *Sox9*, découvert récemment pour être exprimé dans la niche des cellules souches folliculaires (Nowak et al., 2008; Vidal et al., 2005), est également exprimé dans la niche des cellules souches de l'épithélium cornéen. Parmi la liste des gènes retrouvés sous exprimés dans le limbe par rapport à l'épiderme (FC<2), c'est-à-dire propre au programme épidermique, sont présentes les kératines propres de différenciation épidermique que sont les kératines K1 et K10. Leur présence met en évidence que la suspension cellulaire obtenue suite au tri, n'est pas une population pure de cellules souches, mais bien une population enrichie, sûrement contaminée par quelques cellules différenciées. Cependant, la présence de cellules différenciées ne remet pas en cause notre étude puisqu'on s'attache à comparer deux programmes tissulaires différents. Certains gènes spécifiques de la différenciation terminale se rajoutent donc, à la

liste des gènes propres au programme, compliquant ainsi l'analyse mais ne la rendant pas impossible. De nombreux facteurs de transcription comme plusieurs Klf (krüppel-like factors) et de nombreuses molécules de signalisation (BMP4, NGF, Wnt3...) sont également présents dans le programme épidermique. Parmi les gènes surexprimés dans le programme cornéen, par rapport au programme épidermique, on retrouve des protéines structurales connues, comme la kératine 12, marqueur de différenciation et l'aldéhyde déshydrogénase de classe 3, une cristalline cornéenne. Le facteur de transcription essentiel à la formation de la cornée, Pax6 est également présent dans les gènes propres au programme cornéen. Un marqueur de surface, la prominine 1 (ou CD133), est exprimé dans les cellules souches limbiques. L'expression de cette protéine a été identifiée dans les cellules souches d'autres types cellulaires, comme les cellules souches hématopoïétiques et cellules souches neurales (Mizrak et al., 2008). Récemment, elle a été montrée comme un potentiel marqueur des cellules souches tumorales (Wu and Wu, 2009).

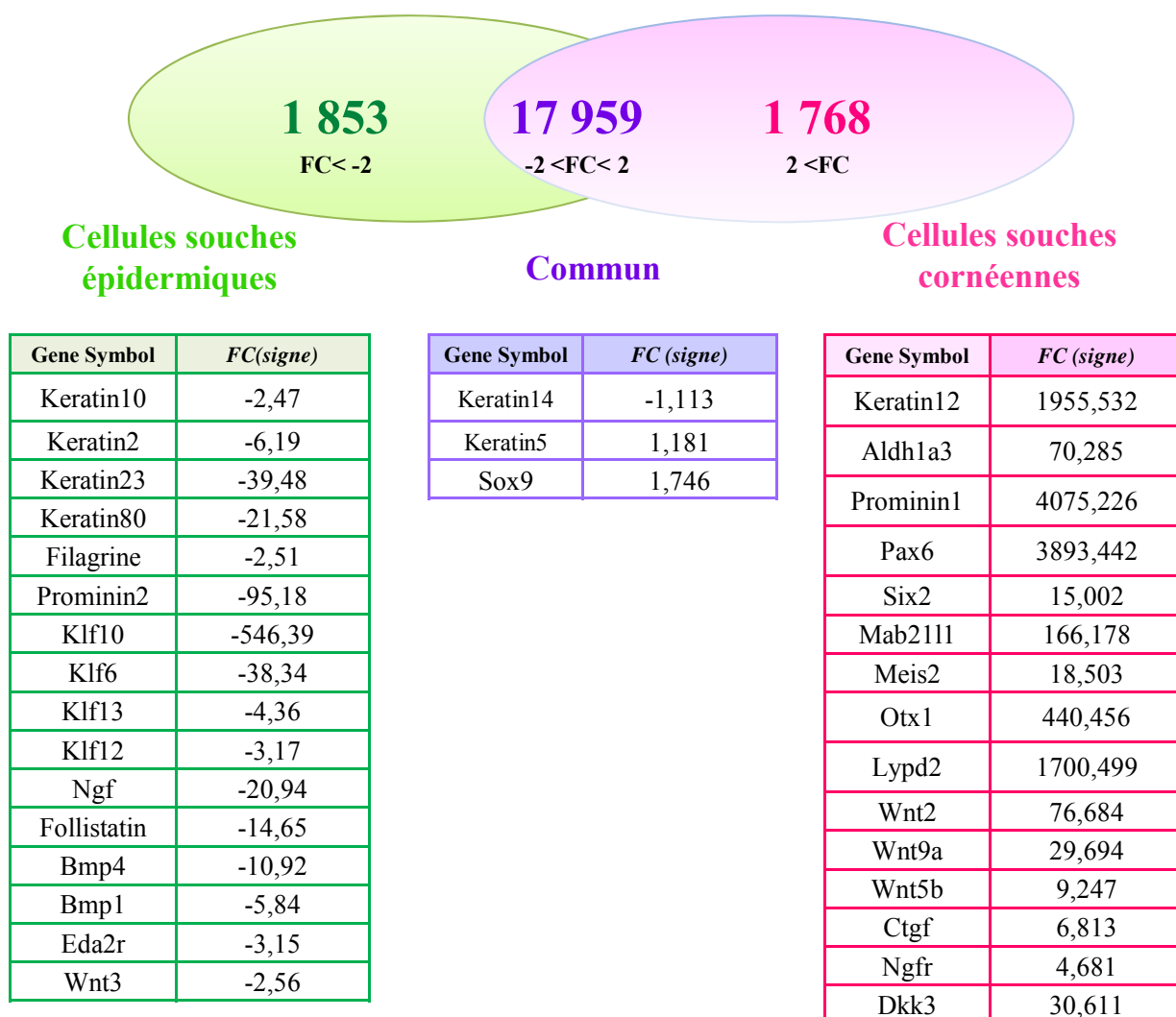
Une attention particulière est portée aux gènes surexprimés dans le programme cornéen et codant pour des facteurs de transcription ou pour des protéines faisant partie de voies de signalisation. La validation des données obtenues est réalisée par RT-PCR quantitative sur un certain nombre de gènes (Fig. 28). Outre les gènes cornéens connus (Pax6 et Aldh1a3), des gènes codant pour des facteurs de transcription (Otx1, Six2, Meis1, Meis2...), des facteurs de signalisation ou régulant des voies de signalisation (Wnt5b, Wnt9a, Ctgf, Dkk3...) ont été sélectionnés. Les différences d'expression des gènes entre les différents types de cellules souches obtenues par PCR quantitative corrélient bien avec les valeurs obtenues par les puces transcriptomiques, validant ainsi la technique utilisée et les résultats obtenus.

#### 2.1.4. CONCLUSION

L'étude de l'expression des gènes différentiellement exprimés dans le programme cornéen par rapport au programme épidermique a abouti à l'identification de 17959 gènes communs, de 1768 gènes surexprimés et de 1853 sous-exprimés dans les cellules souches cornéennes par rapport aux cellules souches épidermiques. Bien que l'expression de certains facteurs de transcription ou molécules de signalisation ait été mise en évidence dans le programme cornéen, une étude plus approfondie est nécessaire pour chacun d'entre eux. En particulier, la vérification de leur spécificité d'expression ainsi que l'étude de leur profil d'expression au cours du développement embryonnaire sont nécessaires afin de trouver un marqueur spécifique et précoce du programme cornéen.

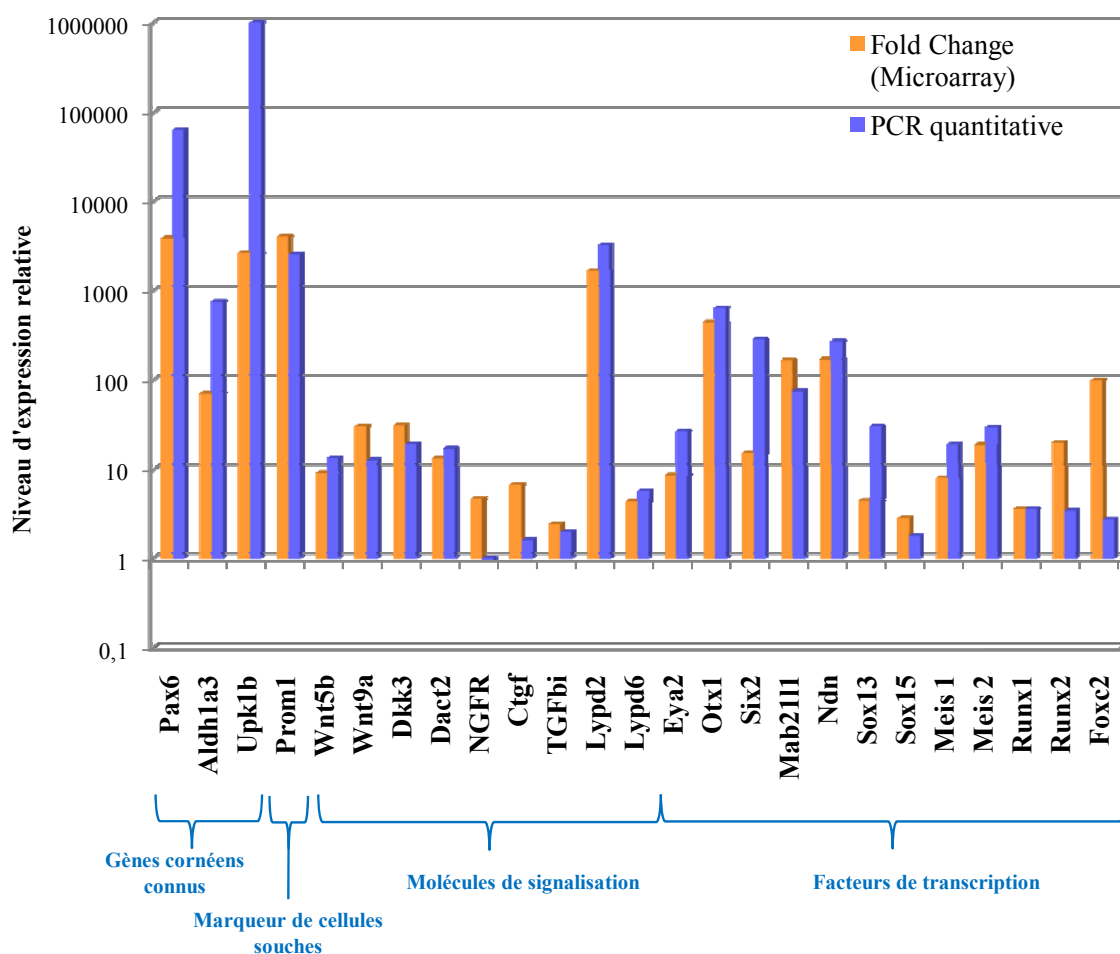
Cette étude est prometteuse car, après l'identification des facteurs clés du programme cornéen, elle pourrait déboucher sur des thérapies régénératives d'épithélium cornéen reconstruit à partir de cellules souches épidermiques transformés. Cependant, la difficulté de la sélection des facteurs candidats et la durée de l'étude approfondie nécessaire pour chaque facteur m'a conduit à m'intéresser, en parallèle, à l'embryogenèse de l'œil, en étudiant l'influence des tissus situés au contact du futur épithélium cornéen.

## Gènes communs et différentiellement exprimés



**Figure 27 :** Listes des gènes communs et différentiellement exprimés dans les cellules souches du limbe et de l'épiderme.

Le niveau d'expression des gènes des cellules souches limbiques est comparé au niveau présent dans les cellules souches épidermiques. Le ratio obtenu est appelé Fold Change (FC). Les gènes, au nombre de 17959, qui ont un ratio compris entre -2 et 2 sont considérés comme étant exprimés au même niveau dans les deux populations cellulaires. Les gènes avec un FC inférieur à -2 sont les gènes qui sont surexprimés dans les cellules souches épidermiques par rapport aux cellules souches cornéennes et on en dénombre 1853. Les gènes qui ont un FC supérieur à 2 sont les gènes surexprimés dans les cellules souches limbiques par rapport aux cellules souches épidermiques. Dans la longue liste de gènes communs, on retrouve les Kératines 14 et 5. Parmi les 1768 gènes propres au programme cornéen, on retrouve des gènes connus comme la Kératine 12 et Pax6, ainsi qu'une cristalline cornéenne, l'aldéhyde déshydrogénase de classe 3 (Aldh1a3).



**Figure 28 :** Comparaison du niveau d'expression relative des gènes différentiellement exprimés dans les cellules souches cornéennes par rapport aux cellules souches épidermiques, en utilisant deux techniques : les puces transcriptomiques et la PCR quantitative.

Parmi les gènes obtenus avec un FC supérieur à 2, c'est-à-dire surexprimés dans les cellules souches cornéennes par rapport aux cellules souches épidermiques, une sélection de gènes a été réalisée et comprend des gènes cornéens connus, un marqueur de cellules souches, des molécules de signalisation et des facteurs de transcription. Leurs niveaux d'expression dans les cellules souches limbiques, par rapport aux cellules souches épidermiques, ont été déterminés par PCR quantitative et comparés à ceux obtenus avec les puces transcriptomiques. Les données de PCR quantitative confirment que ce sont des gènes surexprimés dans les cellules souches limbiques et on retrouve majoritairement les mêmes niveaux d'expression. Cette étude valide les données obtenues avec les puces transcriptomiques.

## **2.2. LA SPÉCIFICATION DE L'ÉPITHÉLIUM CORNÉEN INTERVIENT AVANT LE STADE DE LA VÉSICULE CRISTALLINIENNE, SA LABILITÉ DÉPENDANT DE SA CAPACITÉ À DÉSACTIVER PAX6 (PUBLICATION 2)**

Afin d'étudier l'influence éventuelle de **la vésicule cristallinienne**, sur la différenciation de l'épithélium cornéen, son ablation chirurgicale a été réalisée *in ovo* chez l'embryon de poulet au stade HH15 (24-27 somites). L'étude de la morphologie de l'œil opéré, par coupes histologiques dans les jours suivant l'opération, indique une cicatrisation de l'ectoderme de surface et une migration plus précoce des cellules issues des crêtes neurales (Publi. 2, Fig.1). L'absence de cristallin conduit à une dérégulation de la mise en place du stroma cornéen et à une absence de différenciation de l'endothélium cornéen. A 14 jours de développement, l'œil opéré présente une microphthalmie, liée à l'absence du cristallin qui est une source importante de FGF-10 (Govindarajan et al., 2000). Cependant, bien que la taille de l'ensemble des tissus formant l'œil soit réduite, **l'absence de vésicule cristallinienne n'affecte ni la différenciation de la rétine neurale et de l'épithélium pigmenté rétinien ni la différenciation d'un épithélium cornéen exprimant la kératine K12** (Publi. 2, Fig.1).

La vésicule cristallinienne ne joue donc pas un rôle au stade HH15 sur la spécification de l'épithélium cornéen. Elle forme un obstacle retardant la mise en place des cellules issues des crêtes neurales. Nos résultats confirment le rôle de la vésicule cristallinienne sur la formation de l'endothélium cornéen (Lwigale and Bronner-Fraser, 2009). **Ces expériences n'écartent pas la possibilité d'un rôle du cristallin à un stade plus précoce, c'est-à-dire au stade de la placode cristallinienne.**

Afin de trouver quand **la détermination de l'épithélium** cornéen intervient au cours de l'embryogenèse, une vésicule cristallinienne a été remplacée *in ovo* par un morceau de derme embryonnaire. La même expérience a été réalisée chez l'embryon de poulet et chez l'embryon de lapin à un stade où la migration des crêtes neurales pour former le stroma cornéen n'a pas encore eu lieu, c'est à dire au stade HH 20 pour le poulet, et à 12, 5 jours de gestation pour le lapin. Le derme a été prélevé au stade inducteur de primordia de phanères: 7 jours de développement pour le derme dorsal de poulet, 12,5 jours de développement pour le derme de lèvre supérieure de souris. Dans le cas des greffes réalisées *in ovo* chez l'embryon de poulet, **l'expression de Pax6, dans l'ectoderme recouvrant le derme, diminue pour disparaître quelques heures seulement après l'opération** (Publi. 2, Fig.2 A-C). A 14 jours de développement, l'ectoderme qui devait former l'épithélium cornéen est devenu un épiderme avec des follicules plumaires (Publi. 2, Fig.2 D-F). Le même changement de spécification avec une inhibition rapide de l'expression de Pax6 (au bout de 2 jours), est observé lorsque qu'un derme embryonnaire de souris est inséré en culture organotypique *in vitro* sous l'épithélium cornéen présomptif de lapin à E12, à la place de la vésicule cristallinienne. La morphogenèse des recombinants s'effectue, dans ce cas, grâce à une greffe sur la membrane chorio-allantoïde de poulet ou sous la capsule rénale de souris Nude. La spécification de l'épithélium cornéen présomptif d'embryon de lapin est également rapidement modifiée. L'expression de Pax6 est inhibée (Publi. 2, Fig.2 G-J).

**Ces résultats montrent, que quel que soit la classe de vertébrés supérieurs, le devenir de l'ectoderme recouvrant la vésicule cristallinienne est spécifié, mais pas encore déterminé, c'est-à-dire que le devenir tissulaire est encore modifiable.**

La labilité de cette spécification diminue au cours du développement embryonnaire. Un épithélium cornéen de poulet de 5 jours ne répondra plus que partiellement à l'induction d'un derme embryonnaire, ce qui conduit à une disparition par zones de l'expression de la Kératine 12 et de Pax6, puis aboutit à la formation d'îlots épidermiques (Publi. 2, Fig.3). A 7 jours de développement, l'épithélium cornéen de poulet ne répond plus du tout à l'induction dermique et n'est plus capable d'éteindre ses gènes spécifiques. Il est alors irréversiblement déterminé. Une perte totale de labilité de l'épithélium cornéen est observée chez le lapin quand un épithélium cornéen d'embryon de lapin de 23 jours est associé à un derme embryonnaire de lèvre supérieure de souris de 12,5 jours. Notons que le mésenchyme cornéen se met en place à 5 jours chez l'embryon de poulet, à 16 jours chez celui de lapin.

**La détermination de l'épithélium cornéen est donc effective à E7 chez le poulet, et au moins à E23 chez le lapin.** Cependant, le changement du destin de ces cellules **est encore possible lors d'un phénomène prolifératif** comme c'est le cas lors de la formation d'un bourgeon pileux. En effet, la perte de l'expression de Pax6 peut encore se produire lorsque les cellules prolifèrent; comme c'est le cas des cellules basales d'un épithélium cornéen, d'embryon de 23 jours ou même d'un adulte, associées à un derme embryonnaire. Chez le poulet, la formation de la placode n'implique pas de division cellulaire mais un allongement cellulaire et un soulèvement de l'épiderme. Les différences morphologiques entre la formation d'un bourgeon pileux et plumaire pourraient expliquer les différences de potentialités des épithélia cornéens déjà déterminés de poulet et de souris.

### **2.3. LE STROMA JOUE UN RÔLE TRÈS LIMITÉ DANS LA DIFFÉRENCIATION DE L'ÉPITHÉLIUM CORNÉEN (PUBLICATION 2)**

Nous venons de voir que la détermination de l'épithélium coréen coïncide avec la mise en place du stroma. Joue-t-il un autre rôle? La cornée étant un organe épithélio-mésenchymateux, par assimilation avec le rôle inductif bien connu du derme sur la différenciation de l'épiderme, plusieurs équipes (Gao et al., 2007; Blazejewska et al., 2009) ont testé un rôle potentiel inductif du stroma cornéen. Ces équipes ont testé la différenciation de cellules souches épidermiques semées sur un stroma cornéen et ont publié un résultat positif, qui a fait la « une » des média vue son potentiel thérapeutique.

Les capacités inductrices du stroma cornéen embryonnaire chez le poulet et les mammifères ont été testées par des recombinaisons hétérotopiques avec un épiderme embryonnaire, encore au stade ectodermique, suivi d'une croissance après greffe sous la capsule rénale de souris Nude (Publi. 2, Fig.4). L'association d'un épiderme dorsal de poulet avec un stroma cornéen, tous deux issus d'un embryon de poulet de 7 jours, conduit à la présence d'un épiderme avec ses couches cellulaires caractéristiques au bout de 15 jours de greffe. On observe le même résultat lorsque les tissus proviennent d'un embryon de lapin de 19 jours. L'association d'un stroma cornéen d'embryon de lapin de 16 jours de développement avec un épiderme dorsal de souris de 12,5 jours conduit à la même

conclusion. Le stroma cornéen, même embryonnaire et quel que soit l'espèce, ne possède donc pas de capacité inductrice permettant le changement de spécification d'un épiderme.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que la formation du stroma coïncide avec la détermination de l'épithélium cornéen. Il pourrait donc jouer un rôle de maintien de la spécification de l'épithélium cornéen. Cette interprétation expliquerait les résultats obtenus par les équipes ayant associé à un stroma cornéen, non pas de cellules souches épidermiques, mais de cellules souches embryonnaires (Wang et al., 2005). La caractéristique de ces dernières est de donner tous les types cellulaires quand elles sont cultivées en l'absence de LIF (cellules de souris), donc parmi ceux-ci des cellules épithéliales cornéennes. On peut proposer que ces dernières soient en quelque sorte « sélectionnées » par l'environnement favorable qu'est un stroma cornéen.

Les expériences de microchirurgie et de recombinaison tissulaire, parmi lesquelles j'ai réalisé certaines des ablations vésiculaires et toutes les recombinaisons concernant les tissus de mammifères, ont permis de montrer que la spécification de l'épithélium cornéen n'est pas induite par le stroma ou par la vésicule cristallinienne ; ceci laisse penser que cette spécification a lieu très tôt au cours de l'embryogenèse. Nous avons alors suspecté qu'elle pourrait faire intervenir la placode cristallinienne.

#### **2.4. L'ABLATION CHIRURGICALE DE LA PLACODE CONDUIT À LA RÉGÉNÉRATION DU CRISTALLIN (PUBLICATION 3)**

Les travaux précédents de Hyer et ses collègues en 2003 et 2007, d'ablation chirurgicale de la placode cristallinienne de l'embryon de poulet avaient conduit à la non régénération du cristallin. Confiant dans ces résultats répétitifs publiés récemment dans *Development* et *Developmental Biology*, j'ai entrepris une première série expérimentale et j'ai attendu le 14ème jour d'incubation, moment où la kératine 12 est dès lors fortement exprimée dans l'épithélium cornéen, pour récupérer les embryons. A ma grande surprise, ils présentaient tous, sans exception, deux yeux normaux.

Ces mêmes publications du groupe de Hyer montraient une non-différentiation de la vésicule optique en cupule optique après ablation de la préplacode cristallinienne et concluait sur son rôle inducteur sur la différenciation des rétines. Or ce résultat est inverse à celui obtenu chez la souris par destruction spécifique des cellules de la préplacode avec le gène d'une toxine diphtérique sous le contrôle d'un promoteur modifié de Pax6 (Zhang et al., 2008).

Suspectant que l'utilisation de deux colorants vitaux différents pouvait expliquer la non-conformité de nos résultats avec ceux du groupe Hyer, j'ai utilisé, à la place du rouge neutre, le sulfate de bleu de Nile utilisé par l'autre groupe. La même concentration de Nile Blue sulfate que celui employé par Hyer, c'est-à-dire 1,5%, a été utilisée et a conduit au décès de la totalité des embryons opérés. Notons que l'autre groupe n'avait besoin de récupérer les embryons opérés que quelques heures à 24h maximum après l'intervention, contrairement à nous. Or, Cheryll Tickle avait averti de l'effet toxique du Nile blue sulfate, à haute



concentration dans son chapitre du livre de *Méthodes d'embryologie* de Paul Sharpe et d'Ivor Mason (1999). Elle conseille une utilisation entre 0,01 et 0,1%.

J'ai donc repris les expériences d'ablation de la placode cristallinienne en utilisant cette fois une solution de Nile Blue sulfate à 0,05%. L'ectoderme périphérique de la placode cristallinienne supprimée au stade HH13, est capable de régénérer dans 100% des cas (Publi. 3, Fig.1). La re-formation d'une placode, puis d'une vésicule cristallinienne, prouve également la continuité, aux stades utilisés, de l'induction provenant de la vésicule optique. De plus, l'absence de placode ne perturbe pas l'invagination de la vésicule optique dans les heures qui suivent l'ablation, ce résultat est en conformité avec celui des expériences d'ablation génétique chez la souris (Zhang et al., 2008).

Nous avons montré également que lorsque l'ablation est réalisée à un stade plus avancé de la différenciation cristallinienne, au stade de formation du puits cristallinien (HH14, 21 somites), le pourcentage de cas présentant une régénération totale diminue à 88%. Des cas de régénération anormale du cristallin avec des malformations apparaissent. La capacité de régénération diminue dès la fin du stade HH14 (21 somites) et est définitivement perdue au stade HH15 après l'ablation de la vésicule cristallinienne (Publi. 3, Fig.2 et 3).

La régénération de la placode cristallinienne suite à une ablation chirurgicale ne nous a pas permis de déterminer l'influence de l'absence de placode sur la différenciation de l'épithélium cornéen. Une autre approche technique a dû être envisagée pour l'étude de son rôle éventuel.

## **2.5. LA SPÉCIFICATION DE L'ÉPITHÉLIUM CORNÉEN : LA DERNIÈRE ÉTAPE DU PROGRAMME CRISTALLINIEN (PUBLICATION 4)**

L'ablation chirurgicale de la placode cristallinienne étant invariablement suivie de sa régénération, j'ai choisi une approche moléculaire afin de l'inhiber, car nous **suspections l'éventualité d'une induction latérale de la placode cristallinienne sur l'ectoderme.**

Les voies de signalisation impliquées dans la formation de la placode cristallinienne à partir du domaine pré-placodal sont maintenant bien décrites. La dernière phase de sa formation chez l'embryon de souris montre qu'un signal **BMP4** provenant de la vésicule optique est **nécessaire pour accroître le niveau d'expression du facteur de transcription Sox2** et pour ainsi confirmer le devenir cristallinien de l'ectoderme pré-placodal (Furuta and Hogan, 1998a). Chez l'embryon de poulet, BMP4 est exprimé dans l'ectoderme placodal et est également un facteur primordial de la dernière étape de la spécification du cristallin (Reza and Yasuda, 2004). Une fois le niveau d'expression de Sox2 augmenté, ce facteur s'associe à Pax6 dont le niveau d'expression est également renforcé par un signal FGF provenant du neuroderme. **L'interaction entre Sox2 et Pax6 conduit à l'expression des cristallines,** protéines marqueurs de la différenciation terminale du cristallin, dès le stade de la placode (Kamachi et al., 1998).

Des travaux portant sur la mise en place des muscles au niveau de la face (Tzahor et al., 2003) chez l'embryon de poulet faisaient mention de l'expression de Gremlin, un inhibiteur connu de la voie de signalisation des BMPs, par les cellules des crêtes neurales. J'ai confirmé ce profil d'expression par hybridation *in situ*, sur des embryons de poulet de stade HH26. Les cellules des crêtes neurales qui forment le mésenchyme péri-oculaire, dans les stades précoces

de développement de l'œil, expriment bien Gremlin, un inhibiteur sécrété qui empêche la fixation des BMPs sur leur récepteur. Or, lors de mes expériences d'ablation chirurgicale de la vésicule cristallinienne, j'avais noté la migration précoce et accélérée des cellules des crêtes neurales constituant le stroma. Ce fait était à mettre en parallèle avec l'absence de régénération du cristallin quand l'ablation était réalisée à ce stade. Un rôle inhibiteur des cellules des crêtes neurales sur l'expression de Sox2 avait déjà été suspecté dès 2006 (Bailey et al., 2006).

Afin d'empêcher la formation d'une placode cristallinienne, j'ai **réalisé l'électroporation d'un vecteur rétroviral répliquatif RCAS-Gremlin/Drm dans l'ectoderme céphalique, faisant face à la vésicule optique**, d'embryon de poulet de deux jours d'incubation. Si les premières expérimentations aboutissaient à des malformations de l'œil, un cristallin était encore présent, bien que de petite taille. L'objectif était de produire suffisamment de Gremlin, suffisamment tôt, afin d'inhiber la forte concentration de BMP4 et par ricochet l'expression de Sox2. Une inhibition insuffisante de BMP4 conduirait à la détermination de quelques cellules dans le programme cristallinien, ce qui serait suffisant pour la formation d'un cristallin même de taille réduite. Le but de notre étude était d'analyser le comportement de l'ectoderme en absence totale de placode cristallinienne. Cela a nécessité la mise au point des paramètres expérimentaux avec de nombreux ajustements, comme la détermination exacte du stade de l'embryon à électroporer, la concentration de l'ADN plasmidique, les conditions d'électroporation, etc. L'électroporation a été finalement réalisée très tôt, au stade HH10 (Publi. 4, Fig.1), soit plusieurs heures avant le stade d'induction de l'expression de Sox2 par BMP4 (HH12), afin de permettre la dispersion du virus et l'expression de Gremlin par un maximum de cellules.

L'électroporation de RCAS-Gremlin a abouti à l'obtention parmi les embryons survivants entre deux et 10 jours d'incubation dans 40 % des cas, d'une microphthalmie du côté électroporé (Publi. 4, Fig.2 A-F), souvent signe d'une absence de cristallin et donc de facteurs de croissance. L'analyse histologique des trois cas d'œil microphthalmique, sur les cinq embryons ayant survécu jusqu'à 15 jours de développement, montre l'absence totale de structure caractéristique d'un cristallin (Publi. 4, Fig.2 G-J, Fig. 3A), mais la présence d'une rétine neurale et d'un épithélium rétinien pigmenté dont la différenciation est normale. Les paupières se sont également formées normalement. L'immunofluorescence avec l'anticorps 11E10, spécifique des épithelia (Publi. 4, Fig.3 B), montre un marquage en surface correspondant à l'épiderme qui recouvre les paupières avec la présence de plumes. La fente des paupières ainsi que la cavité oculaire antérieure sont également marquées. Le marquage de la coupe histologique suivante, avec un anticorps anti-kératine 12 (AK12), montre qu'une partie de l'épithélium tapissant la cavité antérieure est un épithélium cornéen différencié (Publi. 4, Fig.3 C). La partie de l'épithélium de la cavité antérieure non marquée par AK12 correspond peut être à la conjonctive mais cela reste à vérifier avec l'utilisation d'un marqueur spécifique.

Contrairement à notre hypothèse précédente, qui était également celle d'un autre groupe (Zhang et al., 2008), **l'épithélium cornéen est donc spécifié en absence totale de placode cristallinienne**. Cependant l'absence des précurseurs de la placode cristallinienne aboutit à la formation d'un épiderme recouvrant l'œil (Zhang et al., 2008). **Les précurseurs de l'épithélium cornéen sont donc communs à ceux de la placode cristallinienne**. Comme

c'est le cas pour les autres types de placode, en particulier la placode olfactive (Bailey et al., 2006), la détermination du programme cristallinien doit être inhibée pour pouvoir donner un autre dérivé. Dans le cas de l'épithélium cornéen, cette inhibition pourrait donc résulter de l'expression de Gremlin par les cellules des crêtes neurales s'infiltrant entre l'ectoderme de surface et la vésicule cristallinienne. Le programme cornéen peut donc être considéré comme l'avant dernière étape de la spécification du programme du cristallin. **Le domaine préplacodal aurait donc une spécification « ectoderme de l'œil » et le choix entre cristallin et cornée serait dépendant du degré d'expression de Sox2.**

## 2.6. PUBLICATIONS

### Publication 2:

Ying Yang, **Elodie Collomb**, Sebastien Cadau, David J. Pearton and Danielle Dhouailly.

**Specification of corneal epithelium occurs concurrently with the lens placode, its reversibility dependent on its ability to down regulate Pax6.**

*En cours de finalisation.*

#### **Abstract :**

To clarify respective roles of the lens placode, the lens vesicle and the corneal stroma in corneal epithelium specification, commitment and differentiation, we performed surgical experiments and followed Pax6 and Keratin 12 expression in the resulting epithelium. The corneal specification has already taken place in chick when the lens placode invaginates, but is still directly reversible to an epidermis by the lens vesicle stage, both in chick and rabbit, under the influence of a dermis. In both species, the corneal stroma, that forms later, is not able to induce an epithelial switch, but might play a role in corneal epithelium commitment, which appears linked to a stabilization of Pax6 expression. This commitment is non-reversible in chick, but can be erased in rabbit, only in a few cells of the corneal epithelium basal layer, that down-regulates Pax6 expression, while they are induced by a dermis to undergo hair placode proliferation.

**Key words:** commitment, differentiation, epidermis, epithelium, eye, stroma, keratin 12.

### Publication 3:

**Elodie Collomb**, Ying Yang, Michel Mouillon and Danielle Dhouailly.

**Lens placode can regenerate in chick embryo.**

*Soumis récemment à Investigative Ophthalmology and Visual Science.*

#### **Abstract :**

**PURPOSE.** Contrary to recent previous assertions according to which lens placode regeneration cannot occur in chick embryos, several experiments are in favour of a larger lens ability of the head

ectoderm. To re-examine the ectodermal competence to reform a lens, we performed ablations of the lens tissue at different stages: placodal, lens pit and lens vesicle.

**METHODS.** We used 2 day chick embryos which can be easily manipulated for surgical ablation. After opening the shell, and vital staining, the ectoderm facing the optic vesicle or the optic cup was largely removed with a tungsten needle. The embryos were analysed from 6 hours to 12 days after surgery.

**RESULTS.** In all cases, wound healing of the ectoderm was achieved 6 hours after the ablation. When the lens placode was removed, a new lens was formed in 100% of cases. When the lens tissue was ablated at the stage of lens pit invagination, the percentage of lens regeneration decreased and the regenerated lens remains open. No regeneration occurred when the lens vesicle was ablated.

**CONCLUSION.** The ectoderm which rapidly heals the ablated area is still able to respond to the signals emanated from the optic vesicle. This implies that the lens-forming ability is not limited to the head ectoderm facing the optic vesicle and that the optic vesicle signal lasts long enough. However, by the time the lens placode invaginates, the ectoderm's regenerative ability is rapidly lost.

**Key words:** lens, ectoderm, optic vesicle, optic cup, wound healing

#### Publication 4:

**Elodie Collomb** and Danielle Dhouailly.

#### **Corneal epithelium: the last but one step to lens specification.**

*En cours de rédaction.*

#### **Abstract:**

In 1901, Hans Spemann reported that the optic cup causes head ectoderm to form a lens (Spemann, 1901). More than a century later, two relevant advances showed that the optic vesicle is not the primary inducer, but that it contributes to the final phase of lens formation (reviewed by (Sullivan et al., 2004), and that cells fated to become lens are part of a preplacodal domain in the neurula ectoderm (Bhattacharyya and Bronner-Fraser, 2004). In contrast, cornea formation remains still an enigma. Genetic (Zhang et al., 2008) and surgical (Collomb et al., Submitted) ablations both showed that contrary to an old dogma, rather than the lens vesicle, the lens placode might be critical for corneal epithelium specification. Based on the fact that BMPs, the major actors of lens placode formation (Furuta and Hogan, 1998b), are expressed in the chick ectoderm which overlies the optic vesicle (Trousse et al., 2001), loss of function experiments were carried out in chick embryos by ectodermal overexpression of Gremlin, an inhibitor of BMP signaling. The corneal epithelium that differentiates in the resulting lens-less eye shows that its precursors are common with that of the lens, their partition being dependent on the inhibition of the last step of lens specification in its peripheral ectoderm.

**Key words:** BMPs, chick, embryo, Gremlin, lens.



# **Publication 2**



# **Specification of corneal epithelium occurs concurrently with the lens placode, its reversibility dependent on its ability to down regulate Pax6**

*Yang, Y.\*, Collomb, E., Cadau, S., Pearton, D. J. \*\*<sup>§</sup>, and Dhouailly, D.\*\*\*<sup>§</sup>*

Equipe Ontogenèse et Cellules Souches du Tégument, Centre de Recherche INSERM UJF – U823, Institut Albert Bonniot, Site Santé – La Tronche, Grenoble, France

\*Current address: Institut de la Vision, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, France

\*\* Current address: AgResearch Ltd, Ruakura Research Centre, Private Bag 3123, Hamilton 3240, New Zealand

§ co-senior authors

\*\*\* Corresponding Author: [danielle.dhouailly@ujf-grenoble.fr](mailto:danielle.dhouailly@ujf-grenoble.fr)

[yingyc302000@yahoo.com](mailto:yingyc302000@yahoo.com)

[elodie.collomb@e.ujf-grenoble.fr](mailto:elodie.collomb@e.ujf-grenoble.fr)

[dpearton@gmail.com](mailto:dpearton@gmail.com)

[sebastien.cadau@e.ujf-grenoble.fr](mailto:sebastien.cadau@e.ujf-grenoble.fr)

Running title: corneal epithelium fate





**ABSTRACT** (here 150, max 150 words).

To clarify respective roles of the lens placode, the lens vesicle and the corneal stroma in corneal epithelium specification, commitment and differentiation, we performed surgical experiments and followed Pax6 and Keratin 12 expression in the resulting epithelium. The corneal specification has already taken place in chick when the lens placode invaginates, but is still directly reversible to an epidermis by the lens vesicle stage, both in chick and rabbit, under the influence of a dermis. In both species, the corneal stroma, that forms later, is not able to induce an epithelial switch, but might play a role in corneal epithelium commitment, which appears linked to a stabilization of Pax6 expression. This commitment is non-reversible in chick, but can be erased in rabbit, only in a few cells of the corneal epithelium basal layer, that down-regulates Pax6 expression, while they are induced by a dermis to undergo hair placode proliferation.

**Key words:** commitment, differentiation, epidermis, epithelium, eye, stroma, Keratin 12.



## INTRODUCTION

How and when tissues are specified, committed and finally differentiated is a fundamental question in developmental and regenerative biology. Here we explore to detail the paradigm of ectodermal specification and commitment toward a corneal epithelium fate. The cornea is the transparent part of the integument, and is composed of three layers: a stratified non-keratinized epithelium overlaying a thick stroma comprised of highly-aligned collagen sparsely populated by fibroblasts (keratocytes) and under this a single cell layer endothelium. The presumptive corneal epithelium is first distinguishable when the lens vesicle detaches from the ectoderm. In chick this is followed by two waves of migration of neural crest cells into the space between the ectoderm and the lens. These will subsequently become the endothelium and the stromal keratocytes; the first wave giving rise to corneal endothelium and the second wave to corneal stromal keratocytes, while in mammals, the neural crest cells migration in order to form the stroma and the endothelium occurs in one wave (Hay 1980). Many downstream genes involved in eye morphogenesis are regulated by Pax6, a paired homeodomain containing transcription factor (for a review: (Gehring 2002) and defects in Pax6 lead to severe defects in eye development (among others: (Hanson 2003). *Pax6* expression occurs in the future eye domain before any morphological differentiation and in the ectoderm expression of *Pax6* starts before lens placode formation and persists in the adult lens and adult corneal epithelium (Collinson et al. 2003, Walther and Gruss 1991). Indeed, throughout adult life, Pax6 plus its co-factor, Sox2 are required for the activation of *crystallins* (Kamachi et al. 1998), while Pax6 plus a still unknown co-factor are required for *Keratin 12* activation (Shiraishi et al. 1998).

The knowledge of the inductive events that initiate cornea development is not yet available, largely because of the lack of biochemical markers specific for the early cornea. The question is thus still open: how and when is corneal fate specified, and then determined? In other words, what are the steps involved in the initial specification and subsequent differentiation of the corneal epithelium and how are they integrated with the other aspects of eye development? The dogma that the lens plays the primary role in the induction of cornea derives from several studies in the first half of the twentieth century (see (Clombre 1964), for a review). Already by the seventies, however, another theory was gaining currency; that the chick corneal epithelium might be already specified by the earliest stages that it can be isolated from the embryo, i.e. when it has

begun to produce collagen (Meier and Hay 1973), or even earlier, either by the lens placode plus the optic vesicle, or by the optic vesicle alone (Hay 1980, Meier 1977).

The last decennium has seen extensive work done on the interactions between the lens and the optic vesicle. In these excision of the embryonic optic cup prevents lens formation (Furuta and Hogan 1998, Kamachi et al. 1998). Likewise, conditional deletion in mice of the Pax6 and Six3 genes, which are expressed in the presumptive lens ectoderm, result in the loss of the lens placode (Ashery-Padan and Gruss 2001). Despite such studies, the possible effects on corneal development were not analyzed, as embryos were fixed too soon for these effects to become apparent. Another recent study was more informative: ablation of lens precursor cells of the surface ectoderm, and hence the lens placode in mice, by expression of an attenuated version of diphtheria toxin driven by a modified Pax6 promoter, prevented corneal differentiation (Zhang et al. 2008a). In these experiments, the resulting tegument of the eye surface displayed histological features and markers of skin differentiation. These results suggest that the lens placode, rather than the lens vesicle, might be critical for the proper differentiation of the corneal epithelium and that skin morphogenesis appears to be a default state of cornea formation.

Cornea and skin share a number of important characteristics; they are both combined epithelial-mesenchymal organs and, particularly in the case of the face, are composed of cells of a common origin, the ectoderm and neural crest. The pluristratified epithelial components of the skin and cornea do, however, have clear morphological differences. The corneal epithelium does not possess the anucleate stratum corneum typical of epidermis, and only the epidermis forms cutaneous appendages such as feathers in birds and hair follicles in mammals. Furthermore, the differentiating cells of the epithelia are characterized by the expression of different pairs of keratins: K3/K12 for cornea and K1-2/K10 for skin (O'Guin et al. 1987, Sun et al. 1983). However, K3/K12 serve only as biochemical markers for an advanced stage of corneal-type differentiation, as they are expressed well after corneal epithelium formation (Chaloin-Dufau et al. 1990, Kurpakus et al. 1994, Liu C. Y. et al. 1993), while Pax6 is expressed early in corneal epithelium development, but also in other eye and head tissues (for reviews: (Ashery-Padan and Gruss 2001, Gehring and Ikeo 1999). In chick embryo, K12 appears on day 12, while K3 is detectable from day 11 (Chaloin-Dufau et al. 1990). Likewise, in mouse, where only K12 is expressed (Chaloin-Dufau et al. 1993), its initial expression occurs on embryonic day 15

(Kurpakus et al. 1994, Liu C. Y. et al. 1993). Another critical difference between corneal and skin keratinocytes is that the development and maintenance of the corneal epithelium, including K12 gene regulation (Liu J. J. et al. 1999) depends on Pax6 activity.

In contrast to the cornea, the mesenchymal/ectodermal interactions in the skin and their molecular nature have been extensively studied from their discovery (Dhouailly 1977). Numerous signalling pathways, mainly the FGF, BMP, and Wnt families, have been implicated in this crosstalk (among others: (Chuong 1998, Jiang et al. 2004, Millar 2002, Thesleff 2003). The results clearly show that the ectoderm is dependent upon its associated dermis and the Wnt/beta catenin pathway in order to become an epidermis (Olivera-Martinez et al. 2004) and to initiate cutaneous appendage morphogenesis (among others: (Gat et al. 1998, Zhang et al. 2008b). Despite the fact that chick corneal epithelium differentiation was shown to be autonomous from its stroma by the first week of development (Zak and Linsenmayer 1985), a number of recent studies by different groups have tried to determine whether, analogous to the case in the skin, the mesenchymal component of the cornea, the stroma, might direct the specification of naïve cells to corneal epithelium fate. Using tissular (epidermal) or embryonic stem cells (among others: (Blazejewska et al. 2009, Gao et al. 2007, Yang et al. 2008), they show that this is apparently the case.

In order to clarify the roles of the lens and of the corneal stroma in cornea specification and commitment, we have repeated a number of previously reported microsurgery studies, in chick embryo (particularly by (Coulombre and Coulombre 1971, Zak and Linsenmayer 1985), as well as by our laboratory, in mammalian embryos (Ferraris et al. 1994, Ferraris et al. 2000, Pearton et al. 2005). Corneal epithelium identity was then analyzed by determining the expression of two genes that have been shown to be expressed in, and to be important for, Pax6 and Keratin K12. These two proteins, in combination, allow us to study the full course of corneal epithelium morphogenesis.

Here we show that in contrast to the embryonic dermis, the embryonic corneal stroma is not endowed with the capacity to induce specific epithelia, either in birds or mammals, and that corneal epithelium is already specified as early as the invagination of the lens pit in chick embryo. However, at the stage of lens vesicle formation, this specification can still be totally and directly reversed to an epidermal fate by an embryonic dermis in both classes. The commitment

of corneal epithelium occurs several days before its differentiation, and it cannot be directly reversed to an epidermal fate, coincidentally with the continuance of Pax6 expression.

## **RESULTS**

### **Chick corneal epithelium is specified before the formation of lens vesicle**

Development subsequent to the ablation of the right eye of the invaginating lens placode at HH stage 14 (21-23 somites) or of the detached lens vesicle at HH stage 15 (24-27 somites), resulted in microphthalmic right eyes. When surgery was done at early HH stage 14 (21-22 somites), a small lens or a lens remaining open was regenerated in 100% of cases (n=12). Surgical ablation of the invaginating lens placode was also performed at late HH stage 14 (23 somites) or early HH stage 15 (24 somites) (n total = 12). In two cases, the lens did not regenerate (Fig. 1, A) the two types of retina were formed, but were contracted. The corneal epithelium, however, differentiated as normal, expressing keratin K12 by E14 (Fig. 1B). In the remaining cases, six showed abnormal lens regeneration, while in four cases almost normal lens regeneration occurred (data not shown). When lens vesicle was ablated at HH stage 15 (25-27 somites), in almost all the cases (n= 6/8) there was no lens regeneration at all, and the retina were extensively folded. By E5 the corneal stromal precursors had migrated adjacent to the substitute ectoderm, but the mass migration occurred earlier (Fig. 1 C) than in the contra lateral unoperated eye (Fig. 1D). It should be noted that in the operated eye, the ectoderm does not synthesize the first acellular stroma, which characterizes chick cornea development and that the migration of neural crest cells to form the stroma occurs in a single, early step. The operated eye did not form a distinctive corneal endothelium bellow the stroma by E7 (n=8) (Fig. 1 E), while one had formed in the control eye (Fig. 1F) Furthermore, the anterior eye chamber did not form, aberrant connections were formed with the future iris area, and the pigmented and neuronal retinal layers were extensively folded (Fig. 1 E). In spite of this, the corneal epithelium was well formed in all cases and showed the expression of keratin 12 by E14 (Fig. 1 G), as in the control left eye (Fig. 1 H). When surgery was done later, at HH stage 16 (26-28 somites), the lens regeneration never occurred, whereas the corneal epithelium differentiated as normal (n=15) (data not shown).

### **Chick and rabbit corneal epithelium specification is still reversible when the lens vesicle is formed**

The lens vesicle of HH stage 20 (3 days of incubation, E3) chick embryo was replaced with blocks of E7 chick dorsal dermis (Fig. 2 A). At this stage, the acellular stroma and the first migration of neural crest cells had not still occurred, and are then prevented by the implanted dermis. In addition, in a few hours (Fig. 2 B) the expression of *Pax6* decreased, and was completely lost in the overlaying ectoderm 12 hours later (Fig. 2 C). At E14, perfect feathers had formed (Fig. 2 D-F) and throughout all its cells, the prospective corneal epithelium had been transformed into a feathered epidermis (n=16). Keratin12 was never expressed (data not shown). It should be noted that the eyelids differentiated perfectly (Fig. 2 D).

E12.5 mouse upper-lip dermis was inserted instead of the extirpated lens vesicle under the corneal epithelium of E12 rabbit embryo (i.e. corresponding at a stage HH 20 chick embryo), and the recombinants were then grafted on chick chorioallantoic membrane. At E12.5, the ectoderm facing the lens vesicle is expressing *Pax6*. After 4 days of culture on the chorioallantoic membrane, the expression of *Pax6* was totally lost (n= 3) (Fig 2 G), and the basal epithelial cells in contact with the mouse dermis were engaged in the production of hair buds (Fig. 2, H) (n= 12). After 10 days, a complete epidermis, characterized by the presence of a granular layer (Fig. 2 I) differentiated in all cases. Immunofluorescent staining with AK12 antibody was negative, even in its upper strata (n= 14).

### **Commitment of chick and rabbit corneal epithelium occurs several days ahead of its differentiation**

When E5 chick corneal epithelium was associated with E7 chick dorsal dermis (n=6), after two weeks the resulting epithelia showed areas of epidermis and of corneal epithelium, that maintained *Pax6* and keratin 12 expression (Fig. 3 A-C). When the recombinants involved E7 chick corneal epithelium (n= 8), the fate of the recombined corneal epithelium was not changed and no epidermal structures were formed (Fig. 3 D-F). Thus, during the fourth day of incubation, the chick corneal epithelium has lost the ability to form feathers, and during the following day becomes largely unable to down regulate *Pax6* expression, except in patches. By day seven the chick corneal epithelium is irreversibly committed.



Recombinants of E23 rabbit corneal epithelium and 12.5 mouse upper lip dermis were performed. After 6 days the expression of Keratin 12 disappeared from the basal layer (n= 6) (Fig. 3, G). After 10 days, hair pegs, which does not express anymore Pax6 have formed (n= 6) (data not shown).

**The corneal stroma of chick, mouse or rabbit embryo is unable to induce a corneal epithelium fate in a future epidermis.**

When a naïve E7 chick dorsal epidermis was recombined with a E7 chick central (n=9), or peripheral (limbal) (n= 11) corneal stroma and the graft recovered after 15 days, the single cell layer embryonic epidermis had developed to form several strata including a thick stratum corneum characteristic of the neonatal epidermis (Fig.4A). Likewise, when a simple dorsal epithelium of E19 rabbit embryo was recombined with rabbit corneal stroma of the same age, and the graft recovered after 3 weeks, a stratified epithelium, including a stratum granulosum and a thick stratum corneum, characteristic of a neonatal rabbit epidermis, had formed (n= 6) (Fig. 4B). Finally, when E 12.5 Rosa mouse dorsal ectoderm (one cell layer) was recombined with an E16 rabbit corneal stroma (n= 11), a characteristic stratified epidermis (Fig 4C) derived from the *beta-galactosidase*-positive mouse tissue was formed (Fig. 4 D), which expressed keratin 10 (Fig. 4 E), but not keratin 12 (Fig. F).

## **DISCUSSION**

Specification is a statement, i.e. a prepared program with all the details for something to be built. A tissue is considered as specified when its developmental fate is restricted, but can still be reversed, whereas it is intrinsically committed to its fate if it recapitulates that fate, when challenged by transplantation to a novel embryonic environment. Our results show that corneal epithelium specification had already occurred at the time that the lens vesicle detaches from the surface ectoderm, and that its commitment occurs by the time of corneal stroma formation and depends on the stability of its Pax6 expression.

### **The corneal epithelium fate is inextricably linked to that of the lens placode**

We confirm that lens placode formation, rather than the lens vesicle itself, is critical for the differentiation of the cornea. More strikingly, our studies are the first to suggest that corneal epithelium and lens precursors have their fates inextricably linked until the beginning of lens placode invagination, that is, until early HH stage 14 in chick embryo. Until this stage, and contrary to previous results (Dias da Silva et al. 2007, Hyer et al. 2003), we recently showed (Collomb et al. Submitted) that the lens placode invariably regenerated after its surgical ablation. Thus we are unable to conclude as to what might occur in its absence. The recent paper from (Zhang et al. 2008a) shows that when the lens placode is permanently removed via targeted genetic destruction of the preplacodal precursors, cornea does not form. This implies that the lens placode plays an essential role in corneal fate. In the chick embryo, when the lens preplacode forms at HH stage 13, Sox2 expression, which starts at HH stage 12 in the ectoderm facing the optic vesicle, is still present in the ventral head ectoderm next to the lens placode, and is subsequently lost in the corneal epithelium (Kamachi et al. 1998). We therefore suggest that loss of Sox2 expression may give rise to the placodal corneal epithelium precursors, which are then distinct from the lens placode precursors. This late restriction might be induced by the lens placode itself, as a planar intra-ectodermal interaction and its effect is stabilized by the subsequent initial migration of mesenchymal neural crest cells. The possibility that Sox2

expression might be a target for neural crest-derived inhibitory signals has been already suggested (Bailey et al. 2006). This potential inhibition does not preclude a later specification event originating from the rim (further iris) of the optic cup.

### **A limited role of the lens vesicle on eye growth, mesenchymal cell migration and corneal endothelium morphogenesis**

Our results confirm previous ones showing that the lens vesicle has a limited role in corneal morphogenesis, as well as in the general growth of the eye (for a review, (Robinson 2006) and differentiation of the corneal endothelium (Zhang et al. 2007). The results of our lens vesicle ablation experiment in chick are consistent with previous surgical ablation and transplantation experiments performed in chicks and transgenic ablation studies in mice. Over 20 years of accumulated evidence has indicated that fibroblast growth factors (FGFs) and/or fibroblast growth factor receptors (FGFRs) play a key role in eye development in general, with the lens, in particular, being a source of FGF (for a review, (Govindarajan et al. 2000, Nakayama et al. 2008, Robinson 2006). This explains why the removal of the lens vesicle led to the formation of a microphthalmic eye with a contracted, wrinkled retina in our experiments. We confirm, however, that the lens vesicle is not required for the last step of corneal epithelium differentiation in embryo; either in our operated chick embryos, or in previous work using transgenic mice expressing Tox176 in lens fibers (Zhang et al. 2007) given that the expression of keratin-12 (K12), a marker of corneal epithelial differentiation, is unaltered.

Our results also show that in chick embryo, an early, mass migration of neural crest cells occurs by E4 in the right eye, where the lens vesicle was ablated. This is in contrast to what occurs in the control eye, where, as previously described (Hay 1980), an initial migration of a restricted number of cells forms the endothelium at E4 and is followed at E5.5 by a larger invasion of cells that will form the keratocytes. One possible explanation for the early migration of the mesenchymal cells in the operated eyes was that the lens vesicle itself plays a direct role in preventing their migration, either mechanically and/or by secretion of an inhibitory signal. The Grainger laboratory showed that the optic vesicle may block neural crest cells from entering the anterior ocular region, which would serve to prevent such an inhibitory effect under normal circumstances (for a review: (Sullivan et al. 2004). A recent investigation (Lwigale and Bronner-Fraser 2009) shows that the introduction of a peptide that inhibits semaphorin-3A/neuropilin-1

signaling results in premature entry of neural crest cells over the lens, that phenocopies lens vesicle ablation. Contrarily, the migration of this mesenchyme may itself have an inhibitory effect on lens formation by the ectoderm, as we do not observe any lens regeneration when the lens vesicle is ablated (Collomb et al. Submitted).

Our results confirm that an inductive signal from the lens, which was absent in the operated eyes, is critical for corneal endothelium morphogenesis. Previous experiments in chick embryo where the lens vesicle was removed and replaced in a different orientation such that only a portion of its anterior epithelial cells faced the cornea, showed that only the mesenchymal cells adjacent to the lens epithelium differentiated into corneal endothelium, in contrast to those adjacent to lens fibers (Beebe and Coats 2000). Likewise, in mice, ablation of the lens fibers via the targeted expression of *Tox 176* (Zhang et al. 2007), prevents corneal endothelium morphogenesis. Of the known signals secreted by the lens, TGFbeta2 is of special interest in this respect as TGFbeta2 null mice have a thin stroma and lack a distinctive corneal endothelium (Sanford et al. 1997).

### **The commitment of corneal epithelium in birds and mammals depends on its capacity to downregulate *Pax6*.**

We confirm an early and stable commitment of corneal epithelium in chick (Zak and Linsenmayer 1985), and show that it depends on *Pax6* expression. All our present and past (Pearson et al., 2005) results show that the down-regulation of *Pax6* is a prerequisite for epidermis development. At 3 days of development in chick embryo and 12.5 days in rabbit embryo, a stage that corresponds in both species to the formation of the lens vesicle and to the absence of a corneal stroma (Chaloin-Dufau et al. 1990, Hay 1980), specified corneal epithelium cells are able to directly and rapidly down-regulate *Pax6* and to be re-specified into epidermal cells, under the influence of a cutaneous-forming embryonic dermis. Thus our results are in conformity and extend previous results of dermal implantation under the chick corneal epithelium (Coulombre and Coulombre 1971). We suggest that the ubiquitous Wnt signaling by the dermis (Noramly et al. 1999) at the stage of initiation of epidermal morphogenesis might probably play a role in the down regulation of *Pax6* expression. However, it cannot act alone, but in conjunction with a proliferating signal.

We confirmed previous results (Zak and Linsenmayer 1985) according to which the presumptive chick corneal ectoderm is gradually irreversibly committed between embryonic day five and seven by exposing it to a new, developmentally instructive environment, the dorsal dermis, by grafting. When the chick corneal epithelium from a day five embryo is used, Pax6 down regulation occurs only in patches and areas of both epidermis and corneal epithelium can be found in the same recombinant. The patchy nature of the epithelial transformation appears to be due to differences in epithelial responsiveness, as our recent experiments show that the dermis initially exerts a uniform inductive effect on the epithelium (Michon et al. 2007, Michon et al. 2008, Pearton et al. 2005). When the corneal stroma is well constituted, after 7 days in chick embryo (Hay 1980), and 20 days in rabbit embryo (Chaloin-Dufau et al. 1990), Pax6 expression appears to be stabilized in the corneal epithelium, and can be considered as committed. We suggest that this resistance to alternative developmental signals would be mediated by the ability of the corneal epithelium to maintain Pax6 expression even in the absence of a permissive mesenchymal environment.

Commitment is usually considered as finalized. However, after the commitment stage, the mammalian corneal epithelium is still able to give rise to an epidermis, but only indirectly and after a long period (three weeks to one month) of association with a cutaneous appendage forming dermis. It should be noted that in the case of mammalian corneal epithelium the temporal sequence observed for the formation of hair pegs, then hair follicle and finally an epidermis is the same whatever the age of the committed corneal epithelium, whether still embryonic (23 days), postnatal or adult (Ferraris et al. 1994, Ferraris et al. 2000, Pearton et al. 2005); and the results presented here). In the recombinants, K12 expression is turned off in basal cells where Pax6 is re-localized to the cytoplasm and hence cannot act as a transcriptional activator. The loss of K12 might result directly from the down-regulation of Pax6 expression, which activates its promoter (Shiraishi et al. 1998). This appears to be mediated by dermal Wnt signals (among others: Noramly et al. 1999) that induce dedifferentiation of basal cells to a state resembling that of the limbal corneal epithelium. Then, Pax6 expression is completely lost in cells forming the hair peg, while it is retained in basal cells of interfollicular epithelium. Cells expressing the interfollicular suprabasal keratin K10 are detected at the junction of the formed hair follicles and the epithelium (Ferraris et al. 2000, Pearton et al. 2005). Finally, the corneal derived hair follicles are the source

of the cells that become the epidermis. Therefore epidermal stem cells usually found in the hair cortex bulge region are the source of this new epidermis similar to what occurs in re-epidermisation after wounding (Miller et al. 1998).

Thus the down-regulation of Pax6 expression in rabbit corneal epithelium is a late event, and is restricted to cells that undergo proliferation and grow down to give rise to hair placodes, then hair pegs. We suggest that the ability of these cells to regain a multipotent “stem cell” state might be linked to their re-entry into the cell cycle and subsequent loss of Pax6 expression. Moreover, a few of them might then segregate in slow cycling cells, which have been shown to normally appear in the early hair placodes and to give rise to the adult stem cells (Nowak et al. 2008, Vidal et al. 2005). This can be induced by embryonic dermal instructions in mammals, where placode formation is formed by cell division, but is absent in birds, where placode formation results from an elongation of epidermal cells.

**The corneal stroma lacks specific instructive abilities, but might be involved in stabilizing Pax6 activity.**

Whilst the epidermis requires a continuous dialogue with its underlying dermis, for its correct specification, development and maintenance (Chuong et al. 1998, Dhouailly 1977, Olivera-Martinez et al. 2004), the same did not appear to be true for the cornea. Firstly, the specification of corneal epithelium occurs before the migration of neural crest cells that form the stroma. Then, heterotypic mesenchymal/epithelial recombinations performed with chick embryonic tissues showed previously that, at least in birds, development of the corneal epithelium was autonomous from its underlying stroma several days before it undergoes final differentiation (Zak and Linsenmayer 1985). Here, we confirm and extend these results, showing that not only various chick embryonic epithelia, but also naive rabbit or mouse embryonic epidermis and even ectoderm, cannot be changed into a corneal epithelium by recombination with a corneal stroma. Moreover, the corneal stroma in both species is unable to induce Pax6 expression in a naïve embryonic epithelium. In normal development of the head it has been shown that Pax6 expression in the eye surface ectoderm results from a complex interaction of genetic pathways (for a review: (Lang 2004). Contrary to what occurs in skin, in cornea the

epithelium might therefore play a dominant role in determining the morphogenesis of its associated mesenchyme, and hence direct the underlying mesenchyme organization to form a characteristic stroma. Previous experiments had shown that when chick corneal epithelium is isolated from its stroma with its basal lamina intact and cultured under appropriate conditions, it lays down a new stroma with 20 nm fibrils (Bard et al. 1988) that strongly resembles the primary stroma laid down in the early chick eye (Hay 1980). This primary stroma is a highly organized extracellular matrix composed largely of striated collagen fibrils, of which the type II and IX collagens are synthesized by the epithelium (Fitch et al. 1994). Likewise, at later embryonic stages, the corneal epithelium seems to be required for the transformation of fibroblasts into active keratocytes (Hay 1980). More recently, (Matt et al. 2005) showed that early in mouse eye development, retinoic acid produced in the corneal ectoderm acts to selectively control the expression of several genes, among them *Ptx2*, in the migrating ocular mesenchyme. Indeed, it has just been shown that retinoic acid represses periocular mesenchyme Wnt signaling via induction of *Pitx2* and *Dkk2* (Kumar and Duester). The repression of Wnt signaling in the corneal stroma, via the corneal epithelium, confirms the initial role of the latter in the non-skin choice of the tegument that forms the eye window. Does the corneal stroma in return play a role in the commitment of the corneal epithelium by stabilizing *Pax6* expression?

A revival of interest, for medical purposes, with respect to the mechanisms of corneal epithelium differentiation during embryogenesis arises from the recent studies about the potential of stem cells, both embryonic as well as epidermal tissue-specific, apparently able to be redirected to a corneal fate by a corneal stroma environment (among others: (Blazejewska et al. 2009, Gao et al. 2007, Wang et al. 1999, Yang et al. 2008). It is well known that embryonic stem cells can spontaneously differentiate into every type of cell when cultured in the absence of factors that maintain their stemness (Wang et al. 2005). When they are seeded on a corneal stroma, more precisely a limbal stroma, the stroma might play a role in the stabilization of this expression in a few cells that will take advantage and proliferate. Thus we suggest that instead of the term “redirect” it might be better to say “stabilized”, and allowing the expansion of cells that spontaneously express the corneal epithelial proteome. In favour of our interpretation we show here that the commitment of corneal epithelium occurs after the formation of the embryonic stroma.

**In conclusion**, once specified at an early stage, concurrently with the lens placode, the corneal epithelium fate remains still labile for a few days in bird as well as in mammalian embryos. This ability to respond to alternative developmental cues appears to be linked to an ability to down regulate Pax6 expression. The ability of the committed corneal epithelium to maintain Pax6 expression even in the absence of the “correct” stroma may help to maintain its corneal fate. It is possible that Pax6 down regulation might require a re-entry into the cell cycle. This can be induced by embryonic dermal instructions in mammals where placode formation results from cell division, but not in birds.

## **MATERIALS and METHODS**

### **Materials**

Fertilized eggs (JA957 strain, St Marcellin, France) were incubated at 38°C until the embryos reached the required Hamburger Hamilton stages (Hamburger and Hamilton 1951). Rabbits were from “Elevage Scientifique des Dombes” (Vif, France) and mice from Charles river and Jackson laboratories. All embryos were humanely anaesthetized and/or euthanized, and all procedures were performed according to the French Animal Protection and Health ministry, authorization number 04622 (to D.D.).

### **Removing of the lens tissue in embryos**

Embryos were very lightly stained for 2 minutes with a piece of agar impregnated with 0,001% Neutral red. Lens tissue was surgically removed from the right eye with sharpened tungsten needles when the lens placode invaginates at late HH stage 14 (Hamburger and Hamilton, 1951) when the lens vesicle is detached from the ectoderm at HH stage15, and finally detached at HH Stage 20. In each case, 4 embryos were recovered at time 0 to confirm their surgical ablation by histology. In the majority of cases, the eggs were resealed and the operated embryos allowed to develop then fixed from a few hours to 14 days after surgery.



## **Insertion of a dorsal dermis under the corneal ectoderm after removal of the lens vesicle in chick and rabbit embryos**

At the stage of lens vesicle formation, the presumptive corneal epithelium was too small to be dissected either in chick or in rabbit. As the migration of the neural crest mesenchyme has not still occurred, the following techniques were used to perform the recombinants. The dorsal skin of E7 chick embryos as well as of E14.5 mouse embryos was dissected and the dermis and epidermis separated via protease treatment (1.25% Trypsin + 2% Pancreatin) for 10 minutes (chick) and 20 minutes (mice) respectively. The host chick embryos were at stage HH 20 (E3), and the rabbit embryos at E12.5. After taking off the chick lens vesicle through a dorsal incision of the ectoderm at the future iris level, a piece (1mm<sup>2</sup>) of dorsal dermis was inserted under the presumptive corneal epithelium. The embryos were recovered from a few hours (4) to 12 days (E14) after the graft (t0), directly underneath the corneal epithelium. In the case of rabbit embryos, the entire periocular region was sectionned. The lens was then excised and the mouse dermis inserted in the resulting pit. The recombined tissues were then grafted on the chorioallantoic membrane of 10 day chick embryos for 3 to 6 days. For long-term in vivo grafting (10 to 21 days), recombinants were inserted beneath the kidney capsule of nude mice.

## **Preparation and grafting of the epithelial/mesenchymal heterotopic recombinants.**

Recombinants were performed between cornea and skin epithelium and mesenchyme from chick, mouse and rabbit embryos. The embryonic corneal epithelium from E5 to E7 chick embryos, and E16, E19 and E23 rabbit embryos were dissociated from their underlying stroma by treatment with saturated EDTA in Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> free medium. The dorsal skin from E7 chick, E12.5 Rosa mice, E14.5 OF1 mice and E19 rabbit embryos were surgically removed and the dermis and epidermis separated via protease treatment (1.25% Trypsin + 2% Pancreatin). The epithelium and mesenchyme were recombined on agar medium for 1 hour and were then grafted on the chick chorioallantoic membrane (CAM) at E11, for 3 to 6 days, or under the kidney capsule of Athymic nude mice for long term grafting. The recombinants were recovered sequentially to follow Pax6 expression as well as after 2 (chick) or 3 (mammals) weeks to allow epithelial differentiation.

## **Immunofluorescence and histology**

Immunohistochemistry was performed on cryosections (7 $\mu$ m) of operated embryos, grafts and recombinants according to standard protocols (Harlow and Lane 1988). Primary antibodies were detected with a secondary antibody against the appropriate species labelled with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 548 (Molecular Probes). We used rabbit anti-Pax6 (Chemicon), and AK12 monoclonal antibody monospecific for the acidic corneal-type keratin K12 from chick and rabbit (produced in D.D's laboratory, (Chaloin-Dufau et al. 1990) and rat anti-keratin 10 (AK10), also produced in D.D's laboratory (Delorme and Dhouailly 1989), goat anti-cytokeratin 12 for mouse (Santa Cruz Biotechnology Inc.), rabbit anti- $\beta$  galactosidase and antilaminin monoclonal (both from ICN Biomedicals). Nuclei were counterstained with Hoechst 33258 or DAPI, and the slides mounted in Molwio 4.88 anti-fading medium (Callbiochem). Some specimens were processed for routine histology and stained with Haematoxylin/Biebrich Scarlet.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Dr. Pritinder Kaur for critical reading of the manuscript, Mrs Brigitte Peyrusse for iconography and bibliography. This research was supported by a Vision Research fellowship to YY, an "Association Française contre les Myopathies" fellowship to EC, a "Fondation pour la Recherche Médicale" fellowship to SC, and by INSERM and by Université Joseph Fourier grants.

## REFERENCES

- Ashery-Padan R, Gruss P. 2001. Pax6 lights-up the way for eye development. *Curr Opin Cell Biol* 13: 706-714.
- Bailey AP, Bhattacharyya S, Bronner-Fraser M, Streit A. 2006. Lens specification is the ground state of all sensory placodes, from which FGF promotes olfactory identity. *Dev Cell* 11: 505-517.
- Bard JB, Bansal MK, Ross AS. 1988. The extracellular matrix of the developing cornea: diversity, deposition and function. *Development* 103 Suppl: 195-205.
- Beebe DC, Coats JM. 2000. The lens organizes the anterior segment: specification of neural crest cell differentiation in the avian eye. *Dev Biol* 220: 424-431.
- Blazejewska EA, Schlotzer-Schrehardt U, Zenkel M, Bachmann B, Chankiewicz E, Jacobi C, Kruse FE. 2009. Corneal limbal microenvironment can induce transdifferentiation of hair follicle stem cells into corneal epithelial-like cells. *Stem Cells* 27: 642-652.
- Chaloin-Dufau C, Sun TT, Dhouailly D. 1990. Appearance of the keratin pair K3/K12 during embryonic and adult corneal epithelial differentiation in the chick and in the rabbit. *Cell Differ Dev* 32: 97-108.
- Chaloin-Dufau C, Pavitt I, Delorme P, Dhouailly D. 1993. Identification of keratins 3 and 12 in corneal epithelium of vertebrates. *Epithelial Cell Biol* 2: 120-125.
- Chuong CM. 1998. Molecular basis of epithelial appendage morphogenesis. Landes biosciences, Austin, TX: Landes bioscience.
- Chuong CM, Jung HS, Noden D, Widelitz RB. 1998. Lineage and pluripotentiality of epithelial precursor cells in developing chicken skin. *Biochem Cell Biol* 76: 1069-1077.
- Clombre AJ. 1964. Problems in corneal morphogenesis. *Adv Morphog* 4: 81-109.
- Collinson JM, Quinn JC, Hill RE, West JD. 2003. The roles of Pax6 in the cornea, retina, and olfactory epithelium of the developing mouse embryo. *Dev Biol* 255: 303-312.
- Collomb E, Yang Y, Mouillon M, Dhouailly D. Submitted. Lens placode can regenerate in chick embryo.
- Coulombre JL, Coulombre AJ. 1971. Metaplastic induction of scales and feathers in the corneal anterior epithelium of the chick embryo. *Dev Biol* 25: 464-478.
- Delorme P, Dhouailly D. 1989. The expression of mouse cytokeratin 9 during normal development and in dermal-epidermal recombinants. *J Invest Dermatol* 94: 393.
- Dhouailly D. 1977. Dermo-epidermal interactions during morphogenesis of cutaneous appendages in amniotes. Pages 86-121 in Robert L, ed. *Frontiers of Matrix Biology*, vol. 4. Basel: S. Karger.

- Dias da Silva MR, Tiffin N, Mima T, Mikawa T, Hyer J. 2007. FGF-mediated induction of ciliary body tissue in the chick eye. *Dev Biol* 304: 272-285.
- Ferraris C, Chaloin-Dufau C, Dhouailly D. 1994. Transdifferentiation of embryonic and postnatal rabbit corneal epithelial cells. *Differentiation* 57: 89-96.
- Ferraris C, Chevalier G, Favier B, Jahoda CA, Dhouailly D. 2000. Adult corneal epithelium basal cells possess the capacity to activate epidermal, pilosebaceous and sweat gland genetic programs in response to embryonic dermal stimuli. *Development* 127: 5487-5495.
- Fitch JM, Linsenmayer CM, Linsenmayer TF. 1994. Collagen fibril assembly in the developing avian primary corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 862-869.
- Furuta Y, Hogan BL. 1998. BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes Dev* 12: 3764-3775.
- Gao N, Wang Z, Huang B, Ge J, Lu R, Zhang K, Fan Z, Lu L, Peng Z, Cui G. 2007. Putative epidermal stem cell convert into corneal epithelium-like cell under corneal tissue in vitro. *Sci China C Life Sci* 50: 101-110.
- Gat U, DasGupta R, Degenstein L, Fuchs E. 1998. De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell* 95: 605-614.
- Gehring WJ. 2002. The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. *Int J Dev Biol* 46: 65-73.
- Gehring WJ, Ikeo K. 1999. Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet* 15: 371-377.
- Govindarajan V, Ito M, Makarenkova HP, Lang RA, Overbeek PA. 2000. Endogenous and ectopic gland induction by FGF-10. *Dev Biol* 225: 188-200.
- Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88: 49-92.
- Hanson IM. 2003. PAX6 and congenital eye malformations. *Pediatr Res* 54: 791-796.
- Harlow E, Lane D. 1988. *Antibodies*. New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hay ED. 1980. Development of the vertebrate cornea. *Int Rev Cytol* 63: 263-322.
- Hyer J, Kuhlman J, Afif E, Mikawa T. 2003. Optic cup morphogenesis requires pre-lens ectoderm but not lens differentiation. *Dev Biol* 259: 351-363.
- Jiang TX, Widelitz RB, Shen WM, Will P, Wu DY, Lin CM, Jung HS, Chuong CM. 2004. Integument pattern formation involves genetic and epigenetic controls: feather arrays simulated by digital hormone models. *Int J Dev Biol* 48: 117-135.

Kamachi Y, Uchikawa M, Collignon J, Lovell-Badge R, Kondoh H. 1998. Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development* 125: 2521-2532.

Kumar S, Duester G. Retinoic acid signaling in perioptic mesenchyme represses Wnt signaling via induction of Pitx2 and Dkk2. *Dev Biol* 340: 67-74.

Kurpakus MA, Maniaci MT, Esco M. 1994. Expression of keratins K12, K4 and K14 during development of ocular surface epithelium. *Curr Eye Res* 13: 805-814.

Lang RA. 2004. Pathways regulating lens induction in the mouse. *Int J Dev Biol* 48: 783-791.

Liu CY, Zhu G, Westerhausen-Larson A, Converse R, Kao CW, Sun TT, Kao WW. 1993. Cornea-specific expression of K12 keratin during mouse development. *Curr Eye Res* 12: 963-974.

Liu JJ, Kao WW, Wilson SE. 1999. Corneal epithelium-specific mouse keratin K12 promoter. *Exp Eye Res* 68: 295-301.

Lwigale PY, Bronner-Fraser M. 2009. Semaphorin3A/neuropilin-1 signaling acts as a molecular switch regulating neural crest migration during cornea development. *Dev Biol* 336: 257-265.

Matt N, Dupe V, Garnier JM, Dennefeld C, Chambon P, Mark M, Ghyselinck NB. 2005. Retinoic acid-dependent eye morphogenesis is orchestrated by neural crest cells. *Development* 132: 4789-4800.

Meier S. 1977. Initiation of corneal differentiation prior to cornea-lens association. *Cell Tissue Res* 184: 255-267.

Meier S, Hay ED. 1973. Synthesis of sulfated glycosaminoglycans by embryonic corneal epithelium. *Dev Biol* 35: 318-331.

Michon F, Charveron M, Dhouailly D. 2007. Dermal condensation formation in the chick embryo: requirement for integrin engagement and subsequent stabilization by a possible notch/integrin interaction. *Dev Dyn* 236: 755-768.

Michon F, Forest L, Collomb E, Demongeot J, Dhouailly D. 2008. BMP2 and BMP7 play antagonistic roles in feather induction. *Development* 135: 2797-2805.

Millar SE. 2002. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J Invest Dermatol* 118: 216-225.

Miller SJ, Burke EM, Rader MD, Coulombe PA, Lavker RM. 1998. Re-epithelialization of porcine skin by the sweat apparatus. *J Invest Dermatol* 110: 13-19.

Nakayama Y, Miyake A, Nakagawa Y, Mido T, Yoshikawa M, Konishi M, Itoh N. 2008. Fgf19 is required for zebrafish lens and retina development. *Dev Biol* 313: 752-766.

- Noramly S, Freeman A, Morgan BA. 1999. beta-catenin signaling can initiate feather bud development. *Development* 126: 3509-3521.
- Nowak JA, Polak L, Pasolli HA, Fuchs E. 2008. Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. *Cell Stem Cell* 3: 33-43.
- O'Guin WM, Galvin S, Schermer A, Sun TT. 1987. Patterns of keratin expression define distinct pathways of epithelial development and differentiation. *Curr Top Dev Biol* 22: 97-125.
- Olivera-Martinez I, Thelu J, Dhouailly D. 2004. Molecular mechanisms controlling dorsal dermis generation from the somitic dermomyotome. *Int J Dev Biol* 48: 93-101.
- Pearnton DJ, Yang Y, Dhouailly D. 2005. Transdifferentiation of corneal epithelium into epidermis occurs by means of a multistep process triggered by dermal developmental signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3714-3719.
- Robinson ML. 2006. An essential role for FGF receptor signaling in lens development. *Semin Cell Dev Biol* 17: 726-740.
- Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. 1997. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 124: 2659-2670.
- Shiraishi A, Converse RL, Liu CY, Zhou F, Kao CW, Kao WW. 1998. Identification of the cornea-specific keratin 12 promoter by in vivo particle-mediated gene transfer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 2554-2561.
- Sullivan CH, Braunstein L, Hazard-Leonards RM, Holen AL, Samaha F, Stephens L, Grainger RM. 2004. A re-examination of lens induction in chicken embryos: in vitro studies of early tissue interactions. *Int J Dev Biol* 48: 771-782.
- Sun TT, Eichner R, Nelson WG, Tseng SC, Weiss RA, Jarvinen M, Woodcock-Mitchell J. 1983. Keratin classes: molecular markers for different types of epithelial differentiation. *J Invest Dermatol* 81: 109s-115s.
- Thesleff I. 2003. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 116: 1647-1648.
- Vidal VP, Chaboissier MC, Lutzkendorf S, Cotsarelis G, Mill P, Hui CC, Ortonne N, Ortonne JP, Schedl A. 2005. Sox9 is essential for outer root sheath differentiation and the formation of the hair stem cell compartment. *Curr Biol* 15: 1340-1351.
- Walther C, Gruss P. 1991. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113: 1435-1449.
- Wang Z, Ge J, Chen J, Huang B. 1999. [Preliminary experimental study on commitment differentiation of embryonic stem cells induced by corneal limbal stroma in vitro]. *Yan Ke Xue Bao* 15: 195-198.

Wang Z, Ge J, Huang B, Gao Q, Liu B, Wang L, Yu L, Fan Z, Lu X, Liu J. 2005. Differentiation of embryonic stem cells into corneal epithelium. *Sci China C Life Sci* 48: 471-480.

Yang X, Moldovan NI, Zhao Q, Mi S, Zhou Z, Chen D, Gao Z, Tong D, Dou Z. 2008. Reconstruction of damaged cornea by autologous transplantation of epidermal adult stem cells. *Mol Vis* 14: 1064-1070.

Zak NB, Linsenmayer TF. 1985. Analysis of corneal development with monoclonal antibodies. II. Tissue autonomy in cornea-skin recombinants. *Dev Biol* 108: 455-464.

Zhang Y, Overbeek PA, Govindarajan V. 2007. Perinatal ablation of the mouse lens causes multiple anterior chamber defects. *Mol Vis* 13: 2289-2300.

Zhang Y, Burgess D, Overbeek PA, Govindarajan V. 2008a. Dominant inhibition of lens placode formation in mice. *Dev Biol* 323: 53-63.

Zhang Y, et al. 2008b. Activation of beta-catenin signaling programs embryonic epidermis to hair follicle fate. *Development* 135: 2161-2172.

## FIGURE LEGENDS

cj; conjunctival epithelium; ep, epidermis; ir, iris, r, retina

### **Figure 1. The ablation of the chick lens pit or lens vesicle at E2 did not prevent the differentiation of the corneal epithelium.**

At the end of HH stage 14 (A, B), the ablation of the lens pit prevented lens regeneration (A) but not the differentiation of the corneal epithelium at E14 (B). The same effect was obtained after the ablation of the lens vesicle at HH stage 15 (C-H). Compare the formation of the cornea in the operated right eye (C-E) to that of the control left eye (D-F). By E5 in the operated right eye, a large wave of fibroblast migration has already occurred with no evidence of endothelium formation (C) and, by E7, there are abnormal connections between the stroma (st) and the retina (E), with a consequent lack of anterior chamber formation. By comparison, at E5, in the control left eye (D) the acellular stroma (ast) is formed, and the first mesenchymal cell migration has occurred. This gives rise to the endothelium (end) by E7 when the second, fibroblast cell migration has occurred (F). In contrast in the operated eye, there is neither endothelium nor anterior chamber (ac). At E14, in the case of lens ablation (G), well differentiated corneal epithelium with keratin K12 formed as in the control (H).

ce, corneal epithelium; eyl, eyelid; le, lens; r, retina

### **Figure 2. At E3 in chick, and E12.5 in rabbit, a complete metaplasia of the prospective corneal epithelium can occur if the lens vesicle is replaced by an embryonic dermis.**

Four hours after the surgery, Pax6 is expressed in all the eye structures, including the lens vesicle (lv), retina (r), and corneal epithelium (ce) in the control left eye (A), while its expression has already decreased in the corneal epithelium which overlays the block of E7 chick dorsal dermis (de) (B). After twelve hours (C), the epithelium overlying the dermis is completely negative for Pax-6 (C) by comparison with its expression in the retina in the same section (not shown). After ten days, a feathered skin has formed instead of a cornea (D-F).

Four days (G-H) after the insertion of a mouse dermis under the corneal epithelium, instead of the lens vesicle, the corneal epithelium had downregulated Pax6 (G) and formed hair buds (H). Ten days after surgery, the future corneal epithelium has been transformed into a pluristratified



epidermis with granular and cornified layers (I). Keratin 12 expression had not appeared in the keratinocytes (J).

br, barb ridges; ce, corneal epithelium; de, dermis; ect, ectoderm; ep, epidermis; eyl, eyelid; hb, hair bud; hf, hair follicle; LAM, laminin antibody; lv, lens vesicle; pd, papilla dermis; r, retina, f, feather.

**Figure 3. Between E5 and E7 in chick and at E23 in rabbit, the corneal epithelium fate becomes stabilized.**

When E5 chick corneal epithelium (ce) is recombined with a E7 chick dorsal dermis (de) (A-C), it is partially transformed into an epidermis (ep), as shown by a patch of epithelium which has lost the expression of Pax6 and of K12, two weeks after the recombination. In contrast, when E7 corneal epithelium is used, it maintains its corneal characteristics (D-F).

Likewise, at E23, the rabbit corneal epithelium supra-basal cells are committed to express K12. After 10 days of its association to a dermis (G) its histology is still similar to that of a corneal epithelium (compare with Figure 2, I), whereas K12 is no longer expressed in its basal layer (bl).

**Figure 4. In birds and mammals, the embryonic corneal stroma cannot induce corneal epithelium formation in a recombined embryonic epithelium.**

After two weeks of recombination with a E7 chick corneal stroma, the single layer E7 chick dorsal epidermis has developed into a pluristratified, cornified epidermis (ep) (A).

Similarly, after three weeks of recombination with a rabbit embryonic corneal stroma, an E19 rabbit single layer dorsal ectoderm ( a prospective epidermis) (B) or an E12.5 Rosa mouse dorsal ectoderm (C-E) have differentiated into a pluristratified epidermis (ep), with a well recognizable stratum granulosum (sg) and stratum corneum (sc). Note that after three weeks the recombined Rosa mouse ectoderm expresses beta-galactosidase (bgal) (C), as well as the characteristic epidermal keratin K10 (D), but not the corneal keratin, K12 (E).

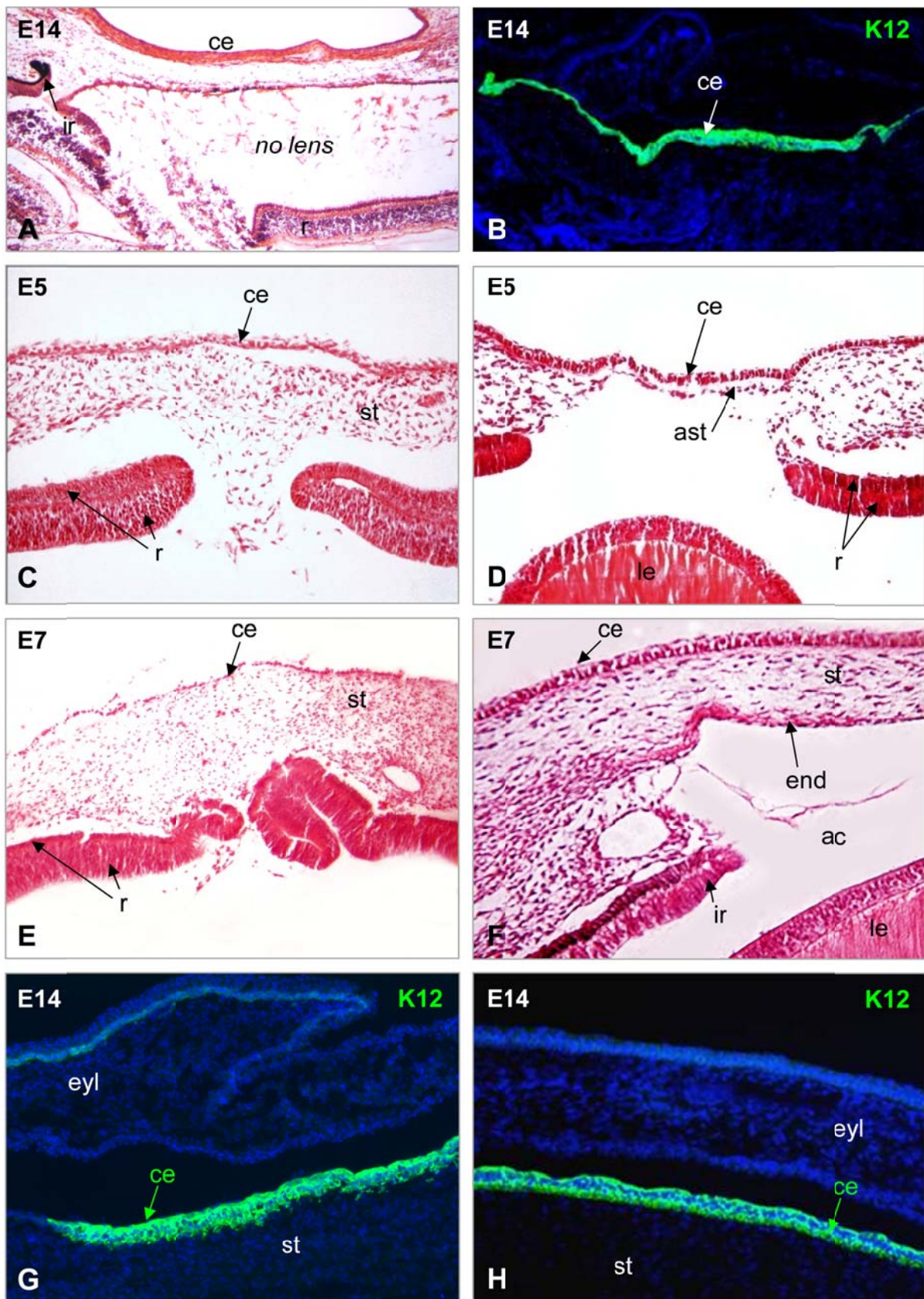


Figure 1. Yang et al.



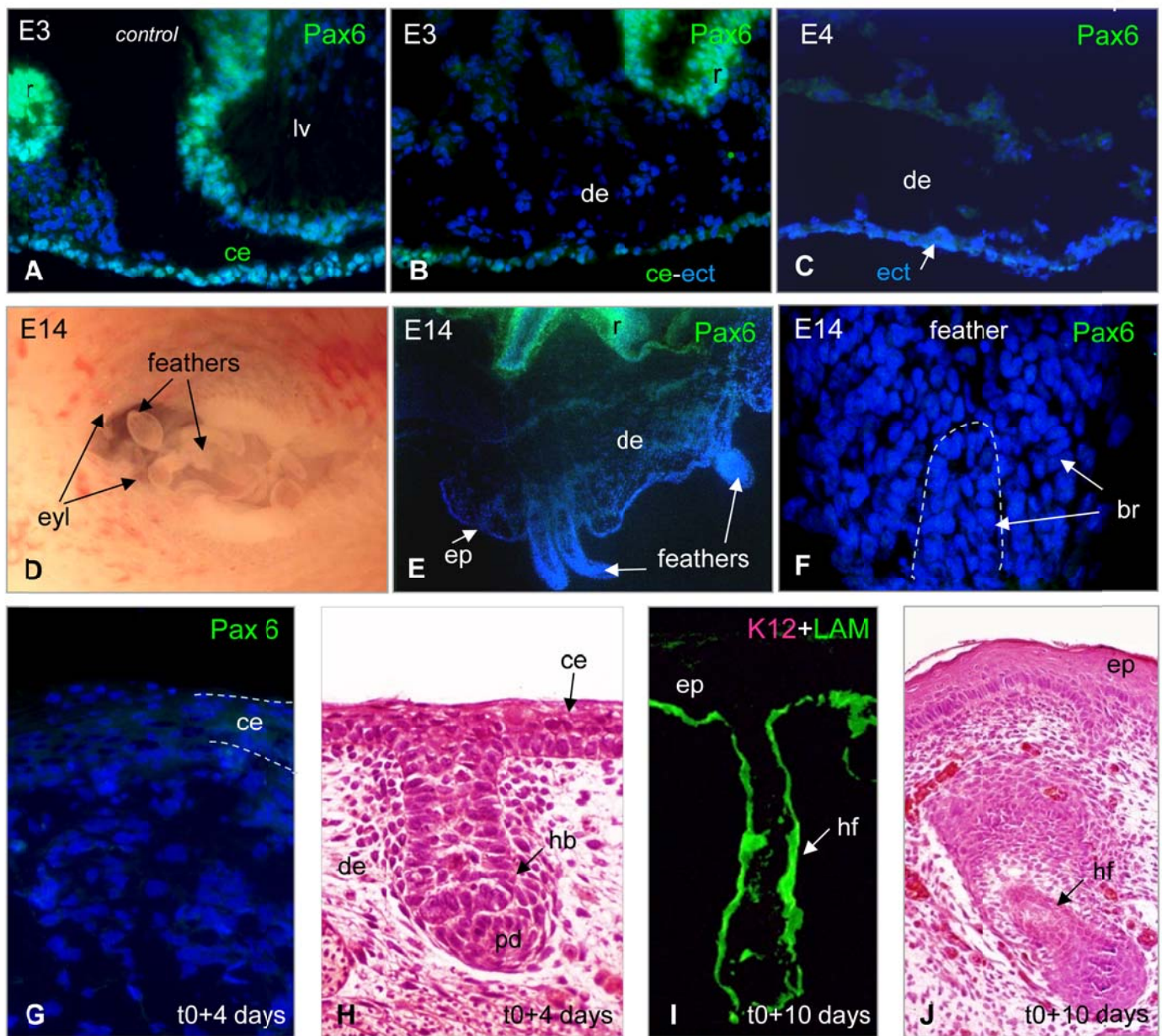


Figure 2. Yang et al.

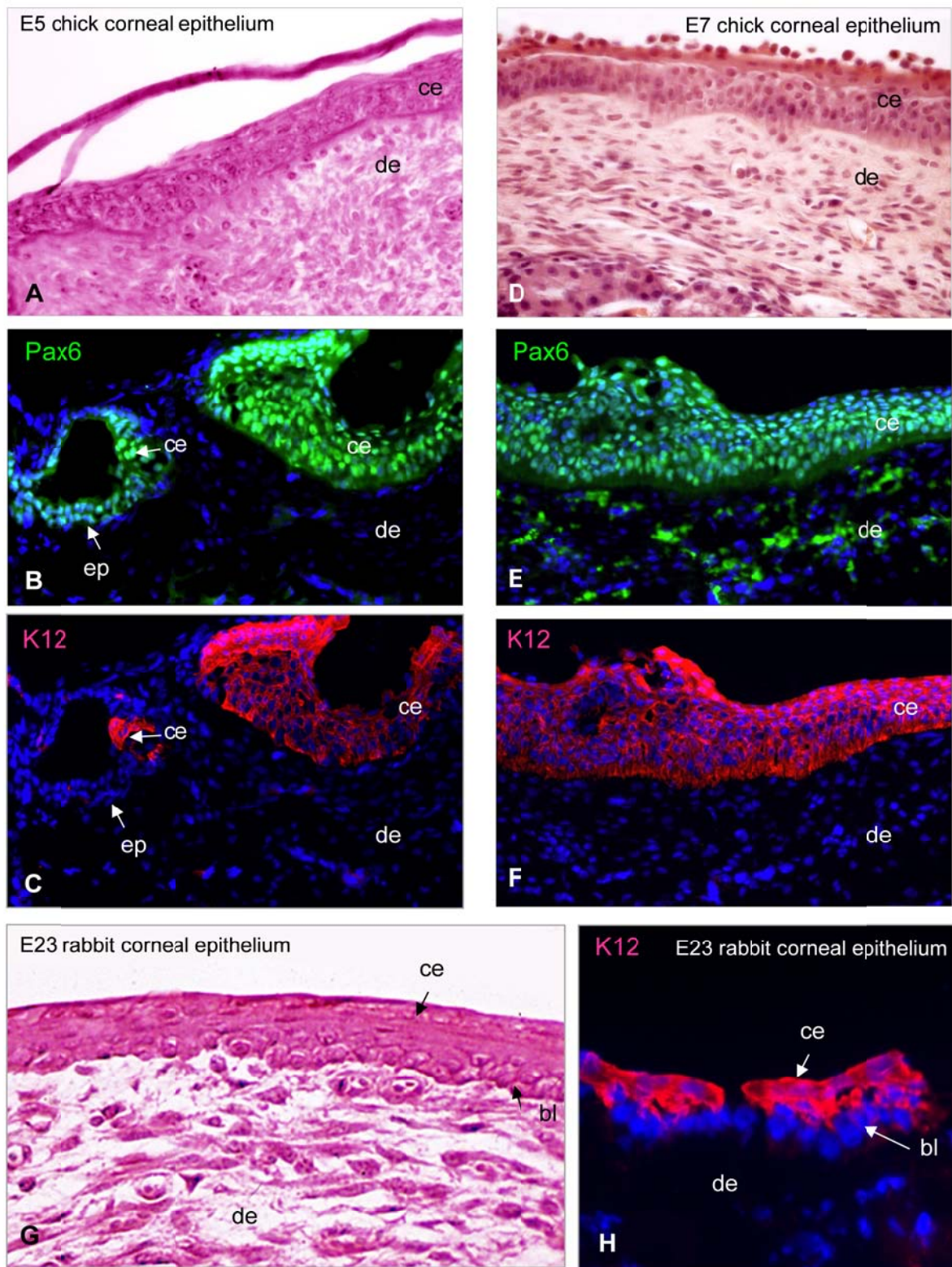


Figure 3. Yang et al.



Corneal stroma recombinants

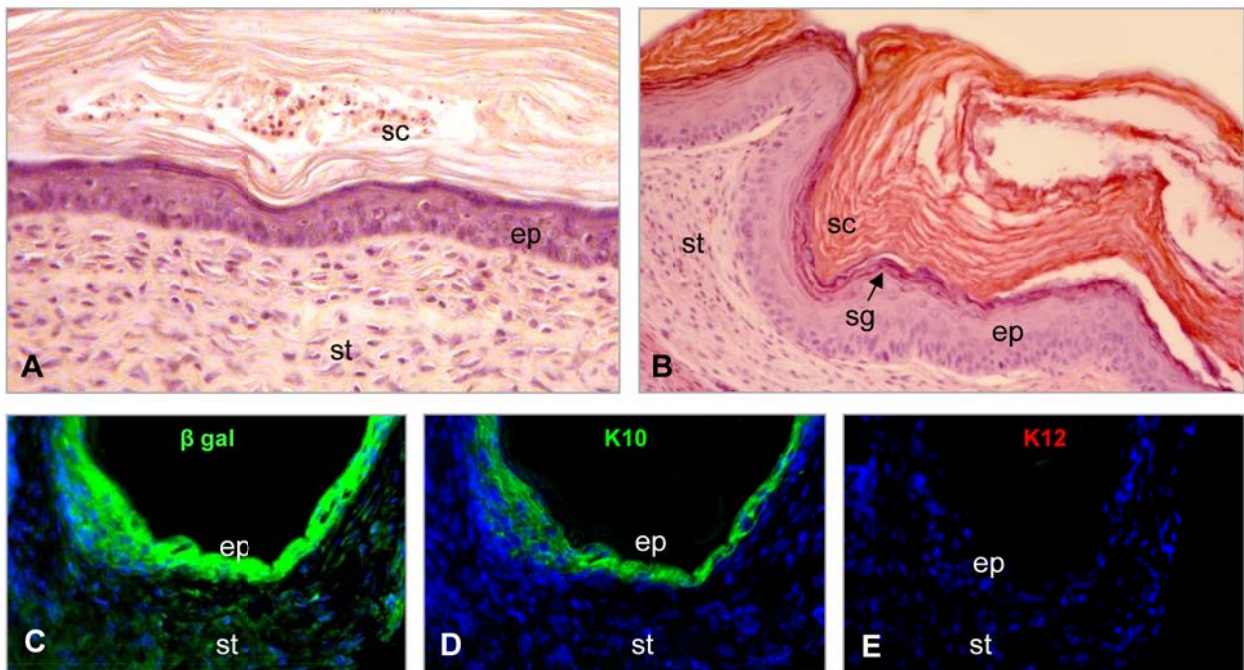


Figure 4. Yang et al.

# **Publication 3**



# LENS

## Lens Placode can regenerate in Chick Embryo

*Elodie Collomb, Ying Yang\*, Michel Mouillon, and Danielle Dhouailly \*\**

From the Equipe Ontogenèse et Cellules Souches du Tégument, Centre de Recherche INSERM UJF – U823, Institut Albert Bonniot, Site Santé – La Tronche, Grenoble, France.

Supported by supported by an “Association Française contre les Myopathies “ fellowship to EC, a Vision Research fellowship to YY, by INSERM, and by Université Joseph Fourier grants.

\*Current address: Institut de la Vision, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, France

[elodie.collomb@e.ujf-grenoble.fr](mailto:elodie.collomb@e.ujf-grenoble.fr)

[yingyc302000@yahoo.com](mailto:yingyc302000@yahoo.com)

[michel.mouillon@wanadoo.fr](mailto:michel.mouillon@wanadoo.fr)

\*\* Corresponding Author: [danielle.dhouailly@ujf-grenoble.fr](mailto:danielle.dhouailly@ujf-grenoble.fr)

*Running title:* lens placode regeneration

*Word count, excluding title page, legends and references:* 2650 (must be fewer than 3500)

*Author contributions:* DD and MM, the previous head of ophthalmic surgery in Grenoble hospital, designed experiments, DD wrote the manuscript, EC and YY performed experiments.





## **ABSTRACT**

**PURPOSE.** Contrary to recent previous assertions according to which lens placode regeneration cannot occur in chick embryos, several experiments are in favour of a larger lens ability of the head ectoderm. To re-examine the ectodermal competence to reform a lens, we performed ablations of the lens tissue at different stages: placodal, lens pit and lens vesicle.

**METHODS.** We used 2 day chick embryos which can be easily manipulated for surgical ablation. After opening the shell, and vital staining, the ectoderm facing the optic vesicle or the optic cup was largely removed with a tungsten needle. The embryos were analysed from 6 hours to 12 days after surgery.

**RESULTS.** In all cases, wound healing of the ectoderm was achieved 6 hours after the ablation. When the lens placode was removed, a new lens was formed in 100% of cases. When the lens tissue was ablated at the stage of lens pit invagination, the percentage of lens regeneration decreased and the regenerated lens remains open. No regeneration occurred when the lens vesicle was ablated.

**CONCLUSION.** The ectoderm which rapidly heals the ablated area is still able to respond to the signals emanated from the optic vesicle. This implies that the lens-forming ability is not limited to the head ectoderm facing the optic vesicle and that the optic vesicle signal lasts long enough. However, by the time the lens placode invaginates, the ectoderm's regenerative ability is rapidly lost.

Key words: lens, ectoderm, optic vesicle, optic cup, wound healing



## INTRODUCTION

The morphogenesis of the vertebrate eye involves the coordinated development of three tissue components: two types of epithelia: the ectoderm from the body surface, and the neuroderm from the optic vesicle; and a peripheral mesenchyme which is derived from the neural crest in chick (1), and from both the neural crest and mesoderm in mice (2). Interactions between the surface head ectoderm and the optic vesicle lead to the formation of the lens placode, which invaginates to form the lens pit which subsequently detaches from the overlying ectoderm to form the lens vesicle. Concurrently, the optic vesicle invaginates and forms the optic cup, while retinas differentiate.

The mechanism of lens formation is a complex multistep process (3; 4; 5; 6). Many downstream genes involved in eye morphogenesis are regulated by Pax6, a paired homeodomain containing transcription factor (see 7 for review). In the ectoderm, expression of *Pax6* starts before lens placode formation and persists in the adult lens (8; 9). Conditional deletion of Pax6 in mice results in the loss of the lens placode (10). The early appearance of crystalline mRNA in the lens placode (11) has allowed lens development to be studied in great detail. These include studies on the regulation of crystalline synthesis in chick by the cooperative action of Pax6 and Sox2. The expression of Sox2 is enhanced in the ectoderm facing the optic vesicle just before lens placode formation, the optic vesicle being the major source of BMP4, the main signal that is required for this last step of lens specification (12; 13; reviewed in 14). According to the original model (15), the optic vesicle is potentially capable of inducing a lens from ectoderm anywhere in the embryo but a key experiment using a host–donor cell-marking technique revealed that the optic vesicle is unable to induce lens in ectopic ectoderm taken at a great distance from the eye field (16). In chick embryos, studies from the Hyer group (17; 18) have shown that surgical removal of the surface pre-placodal or placodal ectoderm at 2 days of incubation results in lensless embryonic eyes. The interpretation of those results would be that lens ability is limited to the head ectoderm facing the optic vesicle. However, different findings show that this could not be the case. Head ectoderm far away from the influence of the optic vesicle will form lens cells when isolated in organotypic cell culture (19). The ablation of neural crest cells results in ectopic lens formation (6). Moreover, it should be noted that Pax6 and Sox2 are expressed at low levels outside the lens placode area (13). Altogether, these findings may account for a latent lens-forming ability in the head ectoderm at early embryonic stages, and we therefore thought that a

re-examination of the regenerative abilities of the lens placode was needed. Using the chicken model system, we initiated a series of studies with two different methods of vital staining, required for ectodermal surgical ablation. Our results demonstrate that the head ectoderm of a 2-day chick embryo remains able to regenerate a lens placode. Further, restriction of the lens placodal fate in the ectoderm starts only when the placode is transformed to a pit, and is complete by 3 days of incubation, when the lens vesicle is formed.

## **MATERIALS and METHODS**

### **Materials**

Fertilized eggs (JA957 strain, St Marcellin, France) were incubated at 38°C until the embryos reached the required Hamburger Hamilton stages (20). All procedures were performed according to the French Animal Protection and Health Ministry, authorization number 04622 (to D.D.)

### **Microsurgery in chick embryo**

We were aware of the need to use a very low concentration of Neutral red (in our first experimental series) or of Nile blue sulfate (in our second series). Thus, embryos were very lightly stained for 2 minutes with a piece of agar impregnated with 0,001% Neutral red or with a tiny drop of 0,05% Nile blue sulfate. Stage of development during the second day of incubation was determined by the number of somites: i.e. from 17 somites (HH stage 13) to 28 somites (HH stage 16). Lens tissue was surgically removed from the right eye with sharpened tungsten needles. The pre-lens ectoderm was ablated at distinct points during development: at HH stage 13- formation of the lens placode; HH stage 14- when the lens placode starts to invaginate; HH15 and HH16 - when the lens vesicle is detaching, and finally detached from the ectoderm. In each case, 4 embryos were recovered at time 0 (t<sub>0</sub>) to confirm for the surgical ablation by histology. In the majority of cases, the eggs were resealed and the operated embryos allowed to develop and observed every day, then fixed at t<sub>0</sub> + 6 hours, t<sub>0</sub> + 24h (3 days of overall incubation), E5 and E14 (5 days and 14 days of incubation respectively).

### **In situ hybridization and histology**

Alkaline phosphatase-labelled in situ hybridization was carried out as previously described (21). The chick *delta crystalline* probe was a gift from Dr M. Uchikawa (Osaka University, Japan). Most of specimens were processed for routine histology and stained with Haematoxylin/Biebrich Scarlet.

## RESULTS

### **The lens regeneration ability of chick head ectoderm is total at the placodal stage**

A preliminary series of experiments was done using neutral red staining to remove the placodal ectoderm over the optic vesicle of stage HH 13 chick embryos (18 to 20 somites) ( Fig. 1, A-B). Based on the results of the Hyer group, we would expect no lens regeneration. We harvested the embryos only 12 days after surgery in order to examine the eye area differentiation. Surprisingly, 100% of the surviving embryos (n=48) had two perfect eyes, almost of the same size, with a lens. We then performed a second series of experiments. Four embryos were recovered at time 0: the right eye was effectively deprived of the lens placode in contrast with the left, control eye (Fig. 1, C-D). By 3 to 12 days after the surgery, 100% of operated eyes (n=20) harbored a lens. Finally, we decided to use the same vital staining as the Hyer' group at the same concentration (Nile blue sulfate at 1.5 %). Twenty-four hours after surgery, there were no survivors among the operated embryos (n= 85). Being aware that Cheryll Tickle in her chapter in Paul Sharpe's and Ivor Mason's book on embryological methods (22) recommended the use of 0.01 to 0, 1% of Nile blue sulfate and her warning "that Nile blue sulfate at high concentration can be toxic, and signaling ability is reduced in parallel with the deepness of the shade of blue" we conducted a final set of experiments, using 0,05% Nile blue sulfate. We harvested 4 embryos at time 0 (Fig.1, E-F) and then 6 hours, 24 hours, 3 and 12 days after the ablation. Six hours after the ablation, the head ectoderm was perfectly healed in all of the four cases (Fig. 1, G-H). Twenty-four hours after surgery, four/four harvested embryos had a typical right lens vesicle with delta-crystalline expression (Fig. 1, I), although the size of these regenerated lens vesicles were

half that of the control unoperated left eye. At 3 (Fig. 1, J –K), and 12 days (Fig. 1, L) after surgery, 100% of the surviving embryos (26 and 8 respectively) contained a right lens just slightly smaller than the control left eye.

### **The lens regeneration capacity of chick head ectoderm is gradually lost at the lens pit stage**

When surgery was conducted after Neutral red staining at early HH stage 14 (21-22 somites) (Fig. 2, A-B), the lens pit and its surrounding ectoderm was also ablated and the optic cup reformed a vesicle (Fig. 2. C-D). The lens still regenerated in 88% of cases (n = 16). However, in 50% of cases the regenerated lens was abnormal, remaining much smaller than the control eye (data not shown) and/or remained open and did not detach from the ectoderm (Fig. 2, E). When the ablation of the invaginating lens placode was performed at late HH stage 14 (23 somites) or early HH stage 15 (24 somites) (n = 12), it resulted in abnormal lens regeneration (n=10) (data not shown) and in two cases, the lens did not regenerate (Fig. 2, F).

### **The lens regeneration capacity of chick head ectoderm is lost at the lens vesicle stage**

When the lens vesicle was ablated after Neutral red staining at HH stage 15 (25-27 somites) (Fig. 3, A-D), in almost all cases (n=6/ 8) there was no lens regeneration at all, and by 3 days after the surgery, the retinas were extensively folded (compare Fig. 3 E and F). However, not only the pigmented retina, but also the neural retina were well differentiated (Fig.3, G). In these cases the size of the eyeball was significantly reduced, about 1/6th of the normal size (Fig.3, H). In two out of eight cases some abnormal lens tissue was observed (data not shown). When surgery was performed after Neutral red staining at HH stage 16 (28-29 somites) lens regeneration never took place (n= 15).

## DISCUSSION

Contrary to previous results (17; 18), we show here that the chick head ectoderm is able to regenerate a lens placode after its surgical removal at the placodal stage, but lost this ability progressively at the lens pit stage, which coincides with the onset of expression of *Sox1* (13). This implies that the lens forming ability is not limited to the head ectoderm facing the optic vesicle until the lens vesicle formation. Our results are thus consistent with those of the Grainger laboratory (23) according to which a lens-forming bias is initially established in large regions of chick head ectoderm, and then progressively restricted. Indeed, at early neurula stages, cells fated to become lens have been demonstrated to be part of a unique domain in the cranial ectoderm which contains the precursors for all sensory placodes and thus termed the ‘preplacodal region’ (24). This preplacodal region has been shown to be specified initially as lens tissue (6), and is rapidly subdivided into distinct sensorial-type placode primordia (25; 26; 27; for a review: 3). Moreover, in contrast with previous results (17), according to which in most cases any re-growth of ectoderm was observed 24 h later over the ablated area, we show here that by 6 hours the head ectoderm re-growth is accomplished. This is in conformity with previous observations according to which the wound healing of the dorsal ectoderm of 2 to 3 day chick embryo occurs within a few hours (28; 29). Furthermore, our results show that the inductive effect of the optic vesicle is not strictly limited to a precise short timing, as it can still be effective after a few hours in a wound healing ectoderm.

Otherwise, the removal of the pre-lens ectoderm (17) resulted not only in the lack of lens placode, but also in optic vesicles that failed to invaginate. These results suggested that in chick, the optic vesicle neuro-epithelium requires a temporally specific association with pre-lens ectoderm in order to undergo optic cup morphogenesis. However, experiments in mice showed that ablation of the Pax6 expressing head ectoderm by the targeted expression of Tox176 (an attenuated version of Diphtheria toxin A), using a modified Pax6 promoter, resulted in lens-less eyes, but does not eliminate optic cup formation (30). These authors concluded that the reasons for the observed differences in retina morphogenesis between mice and chicks were unclear. Now, our own experience in the developmental field has taught us that fundamental events are often very similar between these two species (31). Here we show effectively that the removal of the pre-lens ectoderm, as early as 18 somite chick embryos, does not preclude optic cup



invagination, which in our experiments is already underway when the wound healing of the ectoderm is completed.

**In conclusion**, the striking difference between our results and those of the Hyer group (17; 18) after surgical ablation of the pre-lens tissues in chick embryo might be a result of the concentration of the vital dyes used. Nile blue sulfate at high concentrations is toxic, not only for the ectoderm, but also for the optic vesicle, which even in the rare cases of ectodermal-regrowth (17) could no longer be able to translate its inductive messages to the new ectoderm

### ***Acknowledgements***

The authors thank Prof. Marianne Bronner-Fraser for her advice, Dr. Pritinder Kaur and Dr. David Pearton for their critical reading, and Mrs Brigitte Peyrusse for iconography.

### **REFERENCES**

- 1-Johnston MC, Noden DM, Hazelton RD, Coulombre, JL, Coulombre AJ. Origins of avian ocular and periocular tissues. *Exp Eye Res.* 1979; 29(1): 27-43.
- 2-Gage PJ, Rhoades W, Prucka SK, Hjalt T. Fate maps of neural crest and mesoderm in the mammalian eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005; 46, 4200–4208.
- 3-Bhattacharyya S, Bronner-Fraser ME. Hierarchy of regulatory events in sensory placode development. *Current Opinions in Development and Genetics* 2004; 14: 520-526.
- 4-Kondoh H, Uchikawa M, Kamachi Y. Interplay of Pax6 and Sox2 in lens development as a paradigm of genetic switch mechanisms for cell differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 2004; 48, 819-828.
- 5-Cvekl A, Yang Y, Chauhan BK, Cveklova K. Regulation of gene expression by Pax6 in ocular cells: a case of tissue-preferred expression of crystallines in lens. *Int. J. Dev. Biol.* 2004; 48(8-9): 829-844.

6-Bailey AP, Bhattacharyya S, Bronner-Fraser ME, Streit A. Lens specification is the ground state of all sensory placodes, from which FGF promotes olfactory identity. *Devel. Cell* 2006; 11: 505-17.

7-Gehring WJ. The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. *Int. J. Dev. Biol.* 2002; 46(1):65-73.

8-Walther C, Gruss P. Pax-6 a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development.* 1991; 113:1435–1449.

9-Collinson JM, Quinn JC, Hill RE, West JD. The role of Pax6 in the cornea, retina, and olfactory epithelium of the developing mouse embryo. *Dev. Biol.* 2003; 255(2): 303 -312.

10-Ashery-Padan R, Marquardt T, Zhou X, Gruss P. Pax6 activity in the lensprimordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev.* 2000; 14: 2701–2711.

11-ShinoharaT, Piatigorsky J. Quantitation of delta-crystalline messenger RNA during lens induction in chick embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1976; 73(8): 2808-12.

12-Furuta Y, Hogan BL. BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes Dev.* 1998; 12: 3764-3775.

13-Kamachi Y, Uchikawa M, Collignon J, Lovell-Badge R, Kondoh H. Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development* 1998; 125: 2521-2532.

14-Chow RL, Lang RA. Early eye development in vertebrates. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2001; 17: 255–296.

15-Spemmann H. (Uber Korrelationen in der Entwicklung des Auges). *Verh. Anat. Ges.* 1901; 15: 61–79.

16-Grainger RM, Henry JJ, Henderson,RA. Reinvestigation of the role of the optic vesicle in embryonic lens induction. *Development* 1988; 102: 517-526.

17-Hyer J, Kuhlman J, Afif E, Mikawa T. Optic cup morphogenesis requires pre-lens ectoderm but not lens differentiation. *Dev. Biol.* 2003; 259: 351–363.

- 18-Dias Da Silva MR, Tiffin N, Mima T, Mikawa T, Hyer J. FGF-mediated induction of ciliary body tissue in the chick eye. *Dev Biol.* 2007; 304(1): 272-285.
- 19-Barabanov VM, Fedtsova NG. The distribution of lens differentiation capacity in the head ectoderm of chick embryos. *Differentiation.* 1982; 21(3): 183-90.
- 20-Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* 1951; 88: 49- 92.
- 21-Wilkinson DG, Nieto M A. Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Meth. Enzymol.* 1993; 225,361-373.
- 22-Sharpe PT, Mason I. Molecular embryology: methods and protocols. *University of Chicago Press.* Humana press Ed. PT Sharpe and I Mason. 1999.
- 23- Sullivan CH, Braunstein L, Hazard-Leonards RM, Holen AL, Samaha F, Stephens L, Grainger RM. A re-examination of lens induction in chicken embryos: in vitro studies of early tissue interactions. *Int. J. Dev. Biol.* 2004; 48(8-9): 771-82.
- 24-Kozlowski DJ, Murakami T, Ho RK, Weinberg ES. Regional cell movement and tissue patterning in the zebrafish embryo revealed by fate mapping with caged fluorescein. *Biochem. Cell Biol.* 1997; 75: 551-562.
- 25-Baker CV, Bronner-Fraser M. Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev. Biol.* 2001; 232(1): 1-61.
- 26-Streit A. Extensive cell movements accompany formation of the otic placode. *Dev. Biol.* 2002; 249: 237– 254.
- 27- Bhattacharyya S, Andrew P, Bailey B, Bronner-Fraser M E, Streit A, Segregation of lens and olfactory precursors from a common territory: cell sorting and reciprocity of Dlx5 and Pax6 expressions. *Dev Biol.* 2004; 271(2): 403-14.
- 28-Thévenet A. Sur les modalités de la cicatrisation de l'ectoderme dorsal chez l'embryon de poulet au cours du 3<sup>ème</sup> jour d'incubation. *Ann. Embryol.Morpholog.* 1969; 2 : 71-85.

29-Olivera-Martinez I, Missier S, Fraboulet S, Thélu J, Dhouailly D. *Development*. 2002; 129 (20): 4763-72.

30-Zhang,Y, Burgess D, Overbeek PA, Govindarajan V. Dominant inhibition of lens placode formation in mice. *Dev Biol*. 2008; 323(1): 53-63.

31-Dhouailly D. Dermo-epidermal interactions during morphogenesis of cutaneous appendages in amniotes. *Front Matrix Biol*. 1977; 4: 86-121.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1. At stage HH 13, the chick head ectoderm is able to regenerate a lens.**

The ablation after Neutral red staining (A-D) or Nile blue low staining (E-F) of placodal lens ectoderm (lepl) on the right eye was followed by a rapid wound healing of the ectoderm (ect) ( G-H), which was complete after 6 hours. After 24 hours, a lens vesicle expressing  $\delta$ -crystalline had formed (I). Three days later, (J-K), the regenerated lens (le) was still notably smaller than the control. Finally, after 12 days an almost normal sized right eye is formed (L).

ce: cornea epithelium; lv: lens vesicle; nr: neural retina; oc: optic cup; ov: optic vesicle; pr: pigmented retina; r: retina.

### **Figure 2. The ability of the chick head ectoderm to regenerate a lens is progressively lost by stage HH 14.**

A large ablation of the invaginating lens placode or lens pit (lept) and of its surrounding ectoderm (ect) was performed at stage HH 14, using Neutral red staining (A-B). Note at time 0

(t0) the protruding of the optic cup (oc) that looked again like an optic vesicle (C-D). At t0 plus 12 days, this ablation resulted in either the regeneration of an abnormal opened lens (le) structure (E) when carried out at early HH14 stage, or the absence of a lens (F) if carried out at late HH14 stage (F). In both cases, the retinas (r) had differentiated.

eyl: eyelid; ir: iris; neuro: neuroderm; r: retina; scl: sclerotic.

**Figure 3. The ability of the head ectoderm to regenerate a lens is lost by stage HH 15.**

If the lens vesicle was ablated at stage HH15 after Neutral red staining (A-D), there was no lens regeneration three days later (F). The retinas were folded but a cornea epithelium (ce) was formed. The lens-less eye was smaller (F) than the control (E), but the pigmented (pr) and neural (nr) retina were nevertheless well differentiated (G). Twelve days after the lens vesicle ablation, the eyeball was microphthalmic (H).

am: amnion; ect: ectoderm; le: lens; lv: lens vesicle; me: mesenchyme, nl : nuclear layers; opn: optic nerve; ph: photoreceptors; plex: plexiform layer, r: retina, ro + co: rod and cone.

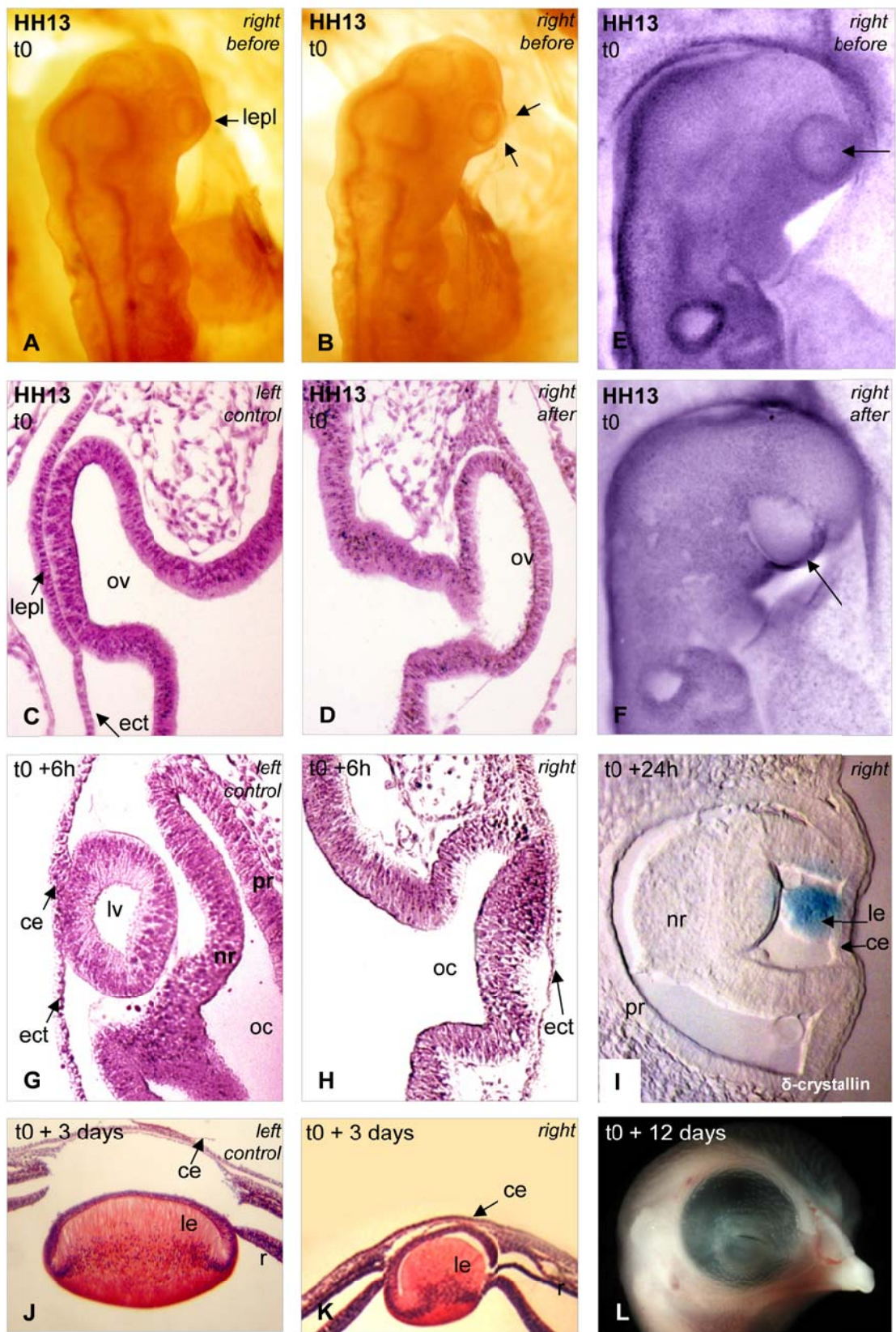


Figure1. Collomb et al.

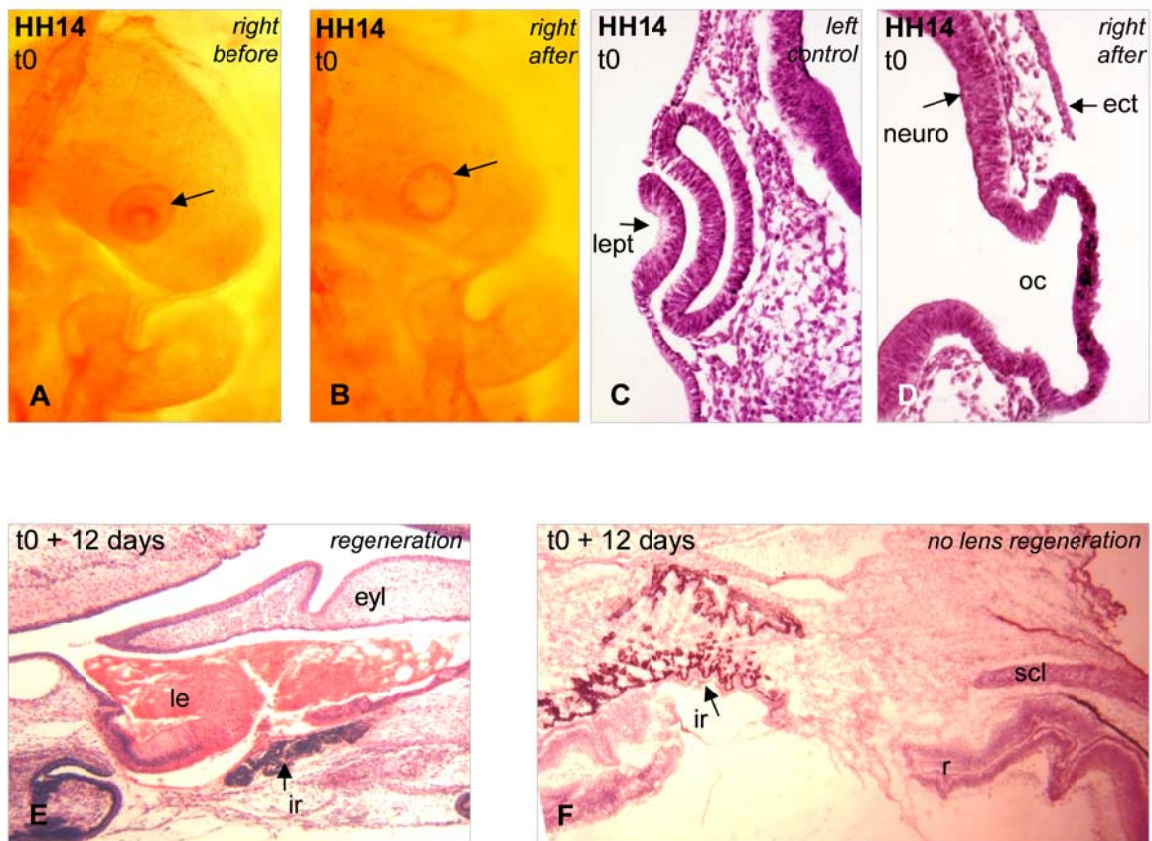


Figure 2. Collomb et al.



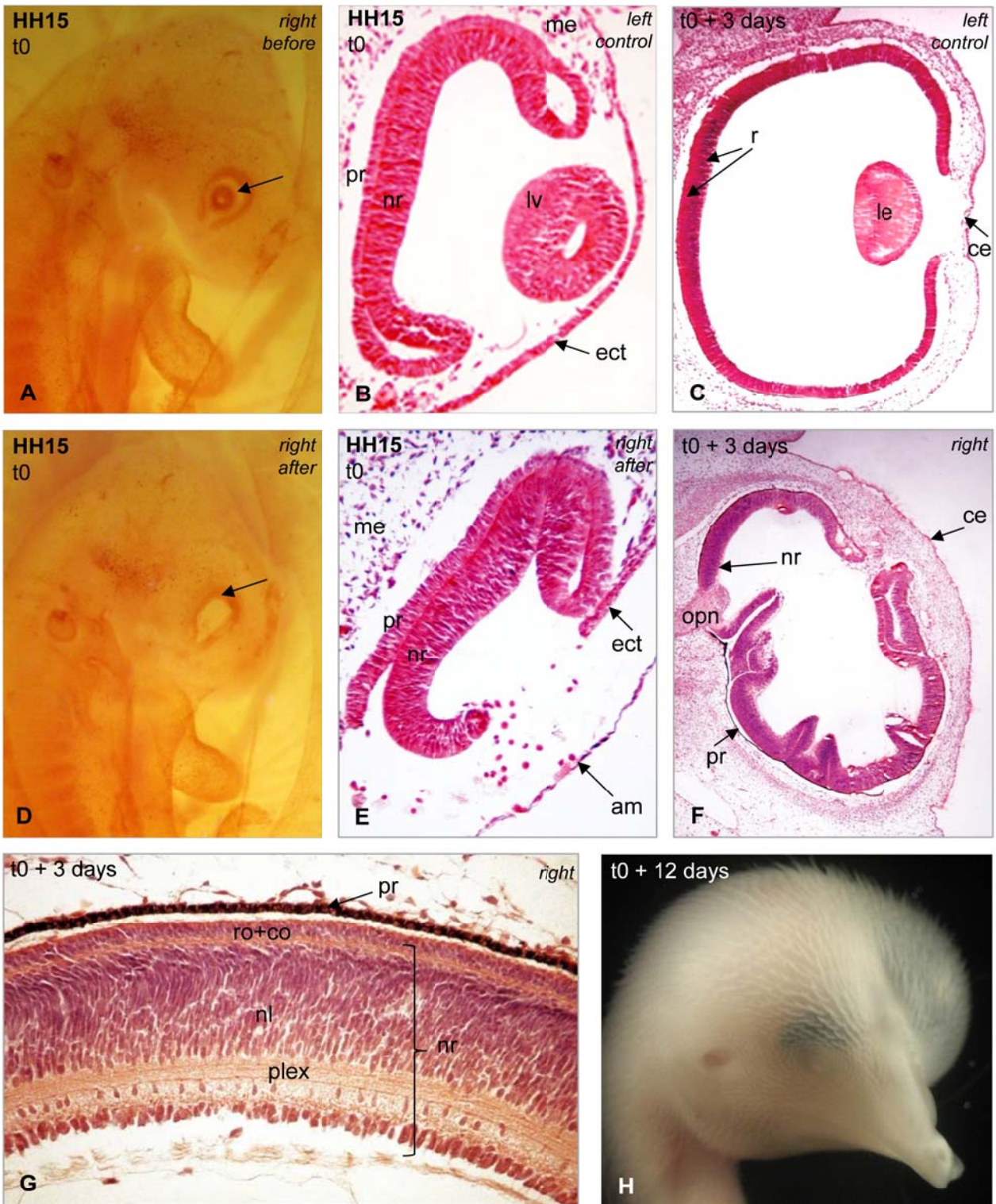


Figure 3. Collomb et al.





# **Publication 4**



# Corneal epithelium: the last but one step to lens specification

*Elodie Collomb<sup>1</sup> and Danielle Dhouailly<sup>1, 2</sup>*

<sup>1</sup> Equipe Ontogenèse et Cellules Souches du Tégument, Centre de Recherche INSERM UJF – U823, Institut Albert Bonniot, Site Santé– La Tronche, Grenoble, France.

<sup>2</sup>Correspondence should be addressed to D.D. (e-mail: [danielle.dhouailly@ujf-grenoble.fr](mailto:danielle.dhouailly@ujf-grenoble.fr))

*Word count excluding the references: 3040*



## **ABSTRACT**

In 1901, Hans Spemann reported that the optic cup causes head ectoderm to form a lens (Spemann, 1901). More than a century later, two relevant advances showed that the optic vesicle is not the primary inducer, but that it contributes to the final phase of lens formation (reviewed by (Sullivan et al., 2004), and that cells fated to become lens are part of a preplacodal domain in the neurula ectoderm (Bhattacharyya and Bronner-Fraser, 2004). In contrast, cornea formation remains still an enigma. Genetic (Zhang et al., 2008) and surgical (Collomb et al., Submitted) ablations both showed that contrary to an old dogma, rather than the lens vesicle, the lens placode might be critical for corneal epithelium specification. Based on the fact that BMPs, the major actors of lens placode formation (Furuta and Hogan, 1998), are expressed in the chick ectoderm which overlies the optic vesicle (Trousse et al., 2001), loss of function experiments were carried out in chick embryos by ectodermal overexpression of Gremlin, an inhibitor of BMP signaling. The corneal epithelium that differentiates in the resulting lens-less eye shows that its precursors are common with that of the lens, their partition being dependant on the inhibition of the last step of lens specification in its peripheral ectoderm.

**Key words:** BMPs, chick, embryo, Gremlin, lens.



## INTRODUCTION

Organ formation requires the establishment of pattern in relatively broad domains, leading to specific fate choices by individual cells, along with coordinated proliferation. The vertebrate eye is an excellent organ in which to investigate these processes. Particularly, the ocular surface ectoderm is a multipotent patch of head surface ectoderm that, when appropriately patterned, is fated to contribute the lens, all epithelia of the eye surface, cornea and conjunctiva, as well as ectoderm-derived components of the lacrima glands, and eyelid epidermis (Ashery-Padan and Gruss, 2001). The cornea consists of an anterior epithelium and a posterior endothelium with the corneal stroma within between, and the basis of its embryonic development in chick was summarized in great detail by Hay (Hay, 1980). Cornea was usually considered until now as a result of the last series of inductive events in eye development, with the lens vesicle interacting with the overlying surface ectoderm (Graw, 2010). However, the lens placode formation, rather than the lens vesicle itself, might be critical for the proper formation of cornea. Our recent results of surgical ablation of the invaginating lens vesicle showed that the corneal epithelium is already specified by HH stage 14 in chick embryo (Yang et al., Submitted). In other words, starting by the lens pit stage, the restriction of the lens fate occurs in its peripheral ectoderm, with these cells becoming only able to assume a corneal epithelium fate. However, we were unable to conclude via surgical ablation to what might occur in the absence of lens placode. Indeed, contrary to previous results (Dias da Silva et al., 2007; Hyer et al., 2003), we recently showed (Collomb et al., Submitted) that the lens placode invariable regenerates after its surgical ablation in chick embryo. On the other hand, when lens placode is permanently removed via targeted genetic destruction of its preplacodal precursors, skin forms instead of cornea in mice (Zhang et al., 2008). Thus, the corneal epithelium and lens precursors have their fates inextricably linked, and altogether these results led to two different interpretations. The genetic destruction of the lens preplacodal precursors might kill both lens and corneal epithelium precursors, or lens placode could be the corneal epithelium inducer.

At early neurula stages, in both amphibian and birds, cells fated to become lens have been demonstrated to be part of a unique domain in the cranial ectoderm which contains the precursors for all sensory placodes and thus has been termed the “preplacodal region” (Kozlowski et al., 1997). Within the preplacodal region, precursors then separate to form



individual placodes at discrete positions along the neural tube (Baker and Bronner-Fraser, 2001; Streit, 2002; Bhattacharyya et al., 2004); for review, (Bhattacharyya and Bronner-Fraser, 2004).

Surprisingly, the entire preplacodal region has been shown to be initially specified as lens tissue and progressive restrictions may allow the different placodal derivatives to form (Bailey et al., 2006). Indeed, by HH Stage 6 the entire chick preplacodal domain is specified to form lens and inhibitory signals and additional inductive events are required to establish alternative placode fates. Thus a fundamental similarity in placodal precursors exists in that, in the chick they all default to a lens fate prior to acquiring features of specific sensory or neurogenic placodes. Lens specification becomes progressively restricted in the head ectoderm, initially by FGF from the anterior neural ridge and subsequently by signals derived from migrating neural crest cells (Bailey et al., 2006). They showed in particular that ablation of neural crest cells results in ectopic lens formation. Likewise, chick head ectoderm far away from influence of the optic vesicle will form lens cells when isolated as early as stage HH5 (Barabanov and Fedtsova, 1982). Thus, we advanced that the inhibition of lens fate in its peripheral ectoderm at stage HH 14 in chick embryo might originate via a planar induction from the lens placode itself, and be further stabilized by the migration of neural crest cells, or alternatively that BMP expression might be stronger in the ectoderm right opposite to the optic vesicle.

Indeed, two types of bone morphogenetic proteins (BMPs) are critical for lens fate. In mice, *Bmp4* and *Bmp7* are expressed early in the developing optic vesicle and low levels of *Bmp4* and *Bmp7* are also found in the prospective lens placode ectoderm (Wawersik et al., 1999; Furuta and Hogan, 1998; Dudley and Robertson, 1997). In mutant for *Bmp4* (Furuta and Hogan, 1998) or *Bmp7* (Wawersik et al., 1999), a lens placode fails to form. In *BMP4*<sup>tm1</sup> homozygous embryos, the OV closely apposes the surface ectoderm, but no lens placode is induced and the specification marker, *Sox2*, is not expressed (Furuta and Hogan, 1998). Introduction of BMP4 beads to explant cultures of *BMP4*<sup>tm1</sup> embryos restores both lens induction and *Sox2* expression, while substitution of BMP4n beads for OV does not induce lenses in wild-type surface ectoderm (Thevenet, 1969). Thus, BMP4 is necessary but not sufficient for lens specification. Likewise, *Bmp7*-null mice indicates that BMP7 is required for the early steps of lens induction and for proper retinal differentiation (Wawersik et al., 1999; Dudley et al., 1995; Luo et al., 1995). Moreover, BMP signaling promotes placode cell survival and maintains full expression of *Sox2* protein in a Smad-dependent manner (Rajagopal et al., 2009). A complete analysis of BMP4

function via the study of *Bmp4*-null homozygous mice was impaired by the high embryo lethality caused by gastrulation defects (Winnier et al., 1995). However, homozygous mutant embryos that reach midgestation show an alteration of lens formation (Furuta and Hogan, 1998). In chick embryos, *Bmp4* mRNAs were first localized to the eye region at HH10–HH11 (Trousse et al., 2001). Overall *Bmp4* and *Bmp7* mRNA distribution in the neural component of the chick optic cup is largely overlapping with the expression pattern reported for the mouse (Dudley and Robertson, 1997). In contrast with mice, however, chick lens placode ectoderm did not express *Bmp7* but displayed strong *Bmp4* expression (Trousse et al., 2001), which instead has been detected only at very low levels in mice (Furuta and Hogan, 1998; Dudley and Robertson, 1997; Solloway and Robertson, 1999; Wawersik et al., 1999). In chick, *Bmp4* mRNAs are visible in the eye field as soon as the optic vesicles are formed but only in the prospective lens placode ectoderm. In the neuroepithelium, *Bmp4* expression starts, in the dorsal half, only after optic vesicle invagination. In contrast, *Bmp7* was not detected in the eye until HH13, after which its expression is limited to the PE. Therefore, in chick, only *Bmp4* is present at the time of lens placode induction, whereas in the neuroepithelium, *Bmp4* and *Bmp7* localized to different compartments. Therefore, signaling between these tissues, although leading to the same morphogenetic events, might be mediated by different BMPs in chick and mouse, as suggested previously (Dudley and Robertson, 1997). This exchange of competence will not be difficult to achieve because BMP4 and BMP7 share some of the components of their signaling cascade (Cho and Blitz, 1998; Massague, 1998). Interestingly, as far as known, BMP receptor distribution appears similar in both species (Furuta and Hogan, 1998; Trousse et al., 2001; Dewulf et al., 1995; Zou et al., 1997). In HH Stage 7 chick explant cultures, lens placodes do not form if the OV is ablated and *Sox2* expression is lost in the surface ectoderm of these cultures. Thus, chick lens placode formation and *Sox2* head ectoderm expression are dependent upon the OV, although the window of OV-dependence is earlier in chick than in mouse. Furthermore, recent conditional knockouts of the genes coding for the BMP receptors *Acvr1* and *Bmpr1a* demonstrated that only the deletion of both genes reduced lens thickening and prevented lens invagination, leading to eyes without lenses (Rajagopal et al., 2009).

The BMPs activities are modulated by extracellular binding proteins, including Noggin, Chordin, Cerberus, Follistatin and Gremlin. These proteins bind one or more of the BMPs,

preventing their interactions with BMP receptors (reviewed by reviewed by (Mehler et al., 1997; Smith, 1999). As the neural crest cells are a source of Bmp antagonists (i.e. Gremlin and Noggin) (Bardot et al., 2001; Tzahor et al., 2003), it may be hypothesized that they control the expression of *Sox2* by downregulating the activity of *Bmp* through their production. It should be noted that the ablation of the detaching lens vesicle in chick embryo (Yang et al., Submitted; Lwigale and Bronner-Fraser, 2009) leads to an early migration of neural crest cells under the eye surface ectoderm, and that by that time, the ectoderm is no more able to regenerate a lens (Collomb et al., Submitted). Previous loss of-function experiments were carried out in chick embryos (Adler and Belecky-Adams, 2002), by intraocular overexpression of noggin. At optic vesicle stages of development, this treatment resulted in microphthalmia with concomitant disruption of the developing retina, and small lens formation. The goal of our experiments was to completely prevent lens placode formation in chick embryo, using in ovo electroporation of the eye surface ectoderm at optic vesicle stage (HH stage 10), and to check for keratin 12 (K12) expression, that is typical of corneal epithelium differentiation at E15 (Chaloin-Dufau et al., 1990). Disruption of Bmp signaling by overexpressing the Bmp binding protein Gremlin in the eye ectoderm resulted in lens-less microphthalmic eye, which nevertheless formed a corneal epithelium.

## RESULTS

A first series of *in ovo* electroporation of RCAS retroviruses coding for Gremlin were done at vesicle HH stage 9-17 through the ectoderm facing the right optic vesicle. Twelve hours later most of the embryos showed a micro head, which is easily understood as the Bmps play several different roles in head morphogenesis, and did not survive.). The majority (10/ 27) of surviving embryos of which right eye received the Gremlin retrovirus at HH stage 10 were clearly microphthalmic. However, some of the embryos treated between HH stage 11 and stage 12 appeared to have a small lens (31/121), and after HH stage 13 the size of the eyeball was almost normal (Fig. 1).

Thus, a second series of experiments were performed at HH stage 9-10 (Fig.2 A). Twenty-four hours later, Gremlin expression was more pronounced than in control on the right head of the electroporated embryos (Fig 2B). It should be noted that HH stage 16 chick embryo shows Gremlin normal expression around the eye (Fig. 2C). Some embryos showed no eye at all (Fig. 2D). At E5, the right eye of surviving embryos (n= 10) was clearly microphthalmic (Fig. 2E) by comparison with the left control eye (Fig. 2F), nevertheless, almost normal shaped eyelids were present (Fig. 2 E). Among the five embryos which survived until E15, three showed no lens at histological sectioning. The external phenotype of the right side of the head appeared to be deprived of any eye structure (compare the left (Fig. 2 G) and the right (Fig. 2 H). At high magnification, a tiny eyelid split appeared (Fig.2 I and J). At dissection of the eye region a small and black ball, the retina was observed. After histological staining , the section (Fig. 3 A), showed a round structure, with both a nervous and a pigmented retina no lens at all, and a winding cavity , which was fringed by an epithelium labeled by the antibody to K14 and K18, and opened by the eyelid split (Fig. 3B). Labeling with the antiK12 antibody showed that the inner part of the cavity was fringed by a differentiated corneal epithelium (Fig. 3 C and D). Additional abnormalities included often crossed beak (Fig. 2 G, H).

## DISCUSSION

A unique domain in the cranial ectoderm which contains the precursors for all sensory placodes has been termed the “preplacodal region” (Kozłowski et al., 1997). Lens specification becomes progressively restricted in the head ectoderm, as lens fate is inhibited and distinct other sensory fates are reinforced by local inducing signals from adjacent tissues (reviewed by (Bhattacharyya and Bronner-Fraser, 2004)). The non-lens head ectoderm could retain lens specification and lens induction appears to be a stepwise process, the optic vesicle being not the primary inducer, but contributes to the final phase of lens specification (reviewed by (Sullivan et al., 2004)).

Our previous experiments (Collomb et al., Submitted) showed that restriction of the lens placodal fate occurs in its peripheral ectoderm, starting by HH stage 14, with these cells becoming only able to assume a corneal epithelium fate. This inhibition might originate via a planar interaction from the lens placode itself, and be stabilized by the migration of neural crest cells under the eye surface ectoderm when the lens vesicle is detached from the ectoderm, and does not preclude a positive final induction to make a corneal epithelium. The second possibility is that the precursors of lens and cornea are not individualized. Indeed, the cornea does not form, the eye ectoderm being replaced by a hairy skin in mice, when the lens placode is removed by targeted genetic destruction of the preplacodal precursors (Zhang et al., 2008). In contrast, when in our experiments the formation of only the lens placode is prevented by inhibition of Bmps signaling, the eye is microphthalmic as the lens, the major source of FGF10, does not form (Govindarajan et al., 2000), but the corneal epithelium differentiated. Epidermis might therefore be considered as the default ectodermal state, as already suggested by our experiments of transdifferentiation of corneal epithelium into an epidermis (Pearson et al., 2005). It should be noted that the eyelids appear to be independent of lens formation in the present experiments, as well as corneal epithelium as already shown when the lens vesicle is replaced by a dorsal dermis (Yang et al., Submitted).

Sox2 expression is required together with Pax6 expression in order to enhance lens fate with the expression of crystallin (Reza and Yasuda, 2004). Sox2, which is early expressed at a low level in the head ectoderm, is then enhanced in front of the optic vesicle (Kamachi et al.,

1998). We therefore suggest that loss of Sox2 expression may give rise to the placodal corneal epithelium precursors, which becomes then distinct from the lens placode precursors. The possibility that Sox2 expression might be a target for neural crest-derived Bmps inhibitory signals has been already suggested (Bailey et al., 2006). The presence of Gremlin and Noggin in migrating neural crests might delimit the cornea by restricting the activation in the surface ectoderm of Sox2 by BMP4/BMP7.

**In conclusion**, we propose that lens, corneal (and perhaps conjunctival) precursors are common, and can therefore be termed precursors of the eye ectoderm derivatives. Consequently, a hierarchy might exist: the lens specification being the last step, the corneal epithelium the one beyond last step, and finally the epidermis the banal default fate of the embryonic ectoderm.

## **MATERIAL and METHODS**

### **Embryos**

Fertilized SPF (pathogen-free) White Leghorn eggs were provided by Cerveloup (Vourey, France) and incubated at 38°C in a humidified incubator. At one day and half day of incubation, three ml of albumin were removed, a window opened on the top of the shell and embryos were lightly stained with neutral red. Then the embryos were staged according to Hamburger and Hamilton (1951).

### **Retroviral production**

Replication-competent RCAS BP(A) retrovirus encoding murine *drm* (RCAS/*mdrm*) was obtained by inserting a 1202-bp containing the coding region and 5' and 3' untranslated sequences of mouse *drm* cDNA (Zhang et al., 2000) into the RCAS(BP)A retroviral vector.

### **In ovo electroporation**

Plasmid solution at 1, 5 µg/µl was mixed with a 1/3 volume of 0.5% Fast Green dye (Sigma) just before use. One µl of the DNA solution was injected across the vitelline membrane on the right side of the head of HH stage 9–10 or HH stage 11-17 embryos. More precisely the solution was laid down around ectoderm and underneath the optic vesicle. A 25-V 50-msec square pulse was applied eight times. Eggs were sealed with tape and returned to the incubator. Embryos were harvested at day 2-15 (E2- E15).

### **In situ hybridization, immunofluorescence and histology**

After paraformaldehyde fixation of embryos 24h after treatment, alkaline phosphatase-labelled in situ hybridization was carried out as previously described (Wilkinson and Nieto, 1993). The Gremlin probe was a gift from Dr. M. Max laboratory.

Heads were embedded directly in OCT and immunohistochemistry was performed on cryosections (7µm) according to standard protocols (Harlow and Lane, 1988). Primary antibodies were detected with a secondary antibody against the appropriate species labelled with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 548 (Molecular Probes). We used AK12 monoclonal antibody monospecific for the acidic corneal-type keratin K12 and 11E1O monoclonal antibodies against Keratins K3, K5 and K14 ( both produced in D.D's laboratory, Chaloin-Dufau et al., 1990), and goat second antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Nuclei were counterstained with DAPI, and the slides mounted in Molviol 4.88 anti-fading medium (Callbiochem). Some cryostat sections were stained with Haematoxylin/Biebrich Scarlet.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Prof. Marianne Bronner-Fraser for her advice, Dr. Jean P. Viallet for teaching *in ovo* electroporation to EC, and Mrs Brigitte Peyrusse for iconography.

Supported by an "Association Française contre les Myopathies" fellowship to EC and by INSERM and by Université Joseph Fourier grants.

## REFERENCES

- Adler, R., and Belecky-Adams, T.L. (2002) The role of bone morphogenetic proteins in the differentiation of the ventral optic cup. *Development* 129:3161-3171.
- Ashery-Padan, R., and Gruss, P. (2001) Pax6 lights-up the way for eye development. *Current opinion in cell biology* 13:706-714.
- Bailey, A.P., Bhattacharyya, S., Bronner-Fraser, M., and Streit, A. (2006) Lens specification is the ground state of all sensory placodes, from which FGF promotes olfactory identity. *Dev Cell* 11:505-517.
- Baker, C.V., and Bronner-Fraser, M. (2001) Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev Biol* 232:1-61.
- Barabanov, V.M., and Fedtsova, N.G. (1982) The distribution of lens differentiation capacity in the head ectoderm of chick embryos. *Differentiation* 21:183-190.
- Bardot, B., Lecoin, L., Huillard, E., Calothy, G., and Marx, M. (2001) Expression pattern of the *drm/gremlin* gene during chicken embryonic development. *Mech Dev* 101:263-265.
- Bhattacharyya, S., Bailey, A.P., Bronner-Fraser, M., and Streit, A. (2004) Segregation of lens and olfactory precursors from a common territory: cell sorting and reciprocity of *Dlx5* and *Pax6* expression. *Dev Biol* 271:403-414.
- Bhattacharyya, S., and Bronner-Fraser, M. (2004) Hierarchy of regulatory events in sensory placode development. *Curr Opin Genet Dev* 14:520-526.
- Chaloin-Dufau, C., Sun, T.T., and Dhouailly, D. (1990) Appearance of the keratin pair K3/K12 during embryonic and adult corneal epithelial differentiation in the chick and in the rabbit. *Cell Differ Dev* 32:97-108.
- Collomb, E., Yang, Y., Mouillon, M., and Dhouailly, D. (Submitted) Lens placode can regenerate in chick embryo.
- Dewulf, N., Verschuere, K., Lonnoy, O., Moren, A., Grimsby, S., Vande Spiegle, K., Miyazono, K., Huylebroeck, D., and Ten Dijke, P. (1995) Distinct spatial and temporal expression patterns of two type I receptors for bone morphogenetic proteins during mouse embryogenesis. *Endocrinology* 136:2652-2663.
- Dias da Silva, M.R., Tiffin, N., Mima, T., Mikawa, T., and Hyer, J. (2007) FGF-mediated induction of ciliary body tissue in the chick eye. *Dev Biol* 304:272-285.
- Dudley, A.T., Lyons, K.M., and Robertson, E.J. (1995) A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 9:2795-2807.
- 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* 208:349-362.
- Furuta, Y., and Hogan, B.L. (1998) BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes Dev* 12:3764-3775.
- Govindarajan, V., Ito, M., Makarenkova, H.P., Lang, R.A., and Overbeek, P.A. (2000) Endogenous and ectopic gland induction by FGF-10. *Dev Biol* 225:188-200.



- Graw, J. (2010) Eye development. *Current topics in developmental biology* 90:343-386.
- Hay, E.D. (1980) Development of the vertebrate cornea. *International review of cytology* 63:263-322.
- Hyer, J., Kuhlman, J., Afif, E., and Mikawa, T. (2003) Optic cup morphogenesis requires pre-lens ectoderm but not lens differentiation. *Dev Biol* 259:351-363.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Collignon, J., Lovell-Badge, R., and Kondoh, H. (1998) Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development* 125:2521-2532.
- Kozlowski, D.J., Murakami, T., Ho, R.K., and Weinberg, E.S. (1997) Regional cell movement and tissue patterning in the zebrafish embryo revealed by fate mapping with caged fluorescein. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 75:551-562.
- Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A.L., Sohocki, M., Bradley, A., and Karsenty, G. (1995) BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* 9:2808-2820.
- Lwigale, P.Y., and Bronner-Fraser, M. (2009) Semaphorin3A/neuropilin-1 signaling acts as a molecular switch regulating neural crest migration during cornea development. *Dev Biol* 336:257-265.
- Mehler, M.F., Mabie, P.C., Zhang, D., and Kessler, J.A. (1997) Bone morphogenetic proteins in the nervous system. *Trends in neurosciences* 20:309-317.
- Pearton, D.J., Yang, Y., and Dhouailly, D. (2005) Transdifferentiation of corneal epithelium into epidermis occurs by means of a multistep process triggered by dermal developmental signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3714-3719.
- Rajagopal, R., Huang, J., Dattilo, L.K., Kaartinen, V., Mishina, Y., Deng, C.X., Umans, L., Zwijsen, A., Roberts, A.B., and Beebe, D.C. (2009) The type I BMP receptors, *Bmpr1a* and *Acvr1*, activate multiple signaling pathways to regulate lens formation. *Dev Biol* 335:305-316.
- Reza, H.M., and Yasuda, K. (2004) Lens differentiation and crystallin regulation: a chick model. *Int J Dev Biol* 48:805-817.
- Smith, W.C. (1999) TGF beta inhibitors. New and unexpected requirements in vertebrate development. *Trends Genet* 15:3-5.
- Solloway, M.J., and Robertson, E.J. (1999) Early embryonic lethality in *Bmp5*;*Bmp7* double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. *Development* 126:1753-1768.
- Spemann, H. (1901) Uber Korrelationen in der Entwicklung des Auges. *Verh. Anat. Ges.* 15:61-79.
- Streit, A. (2002) Extensive cell movements accompany formation of the otic placode. *Dev Biol* 249:237-254.
- Sullivan, C.H., Braunstein, L., Hazard-Leonards, R.M., Holen, A.L., Samaha, F., Stephens, L., and Grainger, R.M. (2004) A re-examination of lens induction in chicken embryos: in vitro studies of early tissue interactions. *Int J Dev Biol* 48:771-782.

- Thevenet, A. (1969) Sur les modalités de la cicatrisation de l'ectoderme dorsal chez l'embryon de poulet au cours du 3ème jour d'incubation. *Ann. Embryol. Morpholog.*:71-85.
- Trousse, F., Esteve, P., and Bovolenta, P. (2001) Bmp4 mediates apoptotic cell death in the developing chick eye. *J Neurosci* 21:1292-1301.
- Tzahor, E., Kempf, H., Mootosamy, R.C., Poon, A.C., Abzhanov, A., Tabin, C.J., Dietrich, S., and Lassar, A.B. (2003) Antagonists of Wnt and BMP signaling promote the formation of vertebrate head muscle. *Genes Dev* 17:3087-3099.
- Wawersik, S., Purcell, P., Rauchman, M., Dudley, A.T., Robertson, E.J., and Maas, R. (1999) BMP7 acts in murine lens placode development. *Dev Biol* 207:176-188.
- Wilkinson, D.G., and Nieto, M.A. (1993) Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods in enzymology* 225:361-373.
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A., and Hogan, B.L. (1995) Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 9:2105-2116.
- Yang, Y., Collomb, E., Cadau, S., Pearton, D.J., and Dhouailly, D. (Submitted) Specification of corneal epithelium occurs concurrently with the lens placode, its reversibility dependent on its ability to down regulate Pax6.
- Zhang, Y., Burgess, D., Overbeek, P.A., and Govindarajan, V. (2008) Dominant inhibition of lens placode formation in mice. *Dev Biol* 323:53-63.
- Zhang, Z., Yu, X., Zhang, Y., Geronimo, B., Lovlie, A., Fromm, S.H., and Chen, Y. (2000) Targeted misexpression of constitutively active BMP receptor-IB causes bifurcation, duplication, and posterior transformation of digit in mouse limb. *Dev Biol* 220:154-167.
- Zou, H., Choe, K.M., Lu, Y., Massague, J., and Niswander, L. (1997) BMP signaling and vertebrate limb development. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 62:269-272.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1. Influence of the stage of performed RCAS-Gremlin electroporation in the ectoderm facing the optic vesicle.**

**Fig. 2 . Microphthalmic right eyes formed after RCAS-Gremlin electroporation.**

(A) Time zero, stage HH 10, showing the fast green staining of the electroporated ectoderm.

(B - C) Fourteen hours later, the overexpression of Gremlin is shown by in situ hybridization in the electroporated embryo (B) by comparison with a control (C).

(D) Fourteen hours later, absence of a lens vesicle on the right side of the head (arrowhead).

(E-F) At E8, the right eye was microphthalmic, by comparison with the right one. Note the presence of the eyelids (eyl).

(G-H) At E15, the right eye appeared totally absent (arrow). Note the crossed beak.

(I-J) Two highest magnifications at E15 showed the eyelid split (spl), which was deprived of feathers (f).

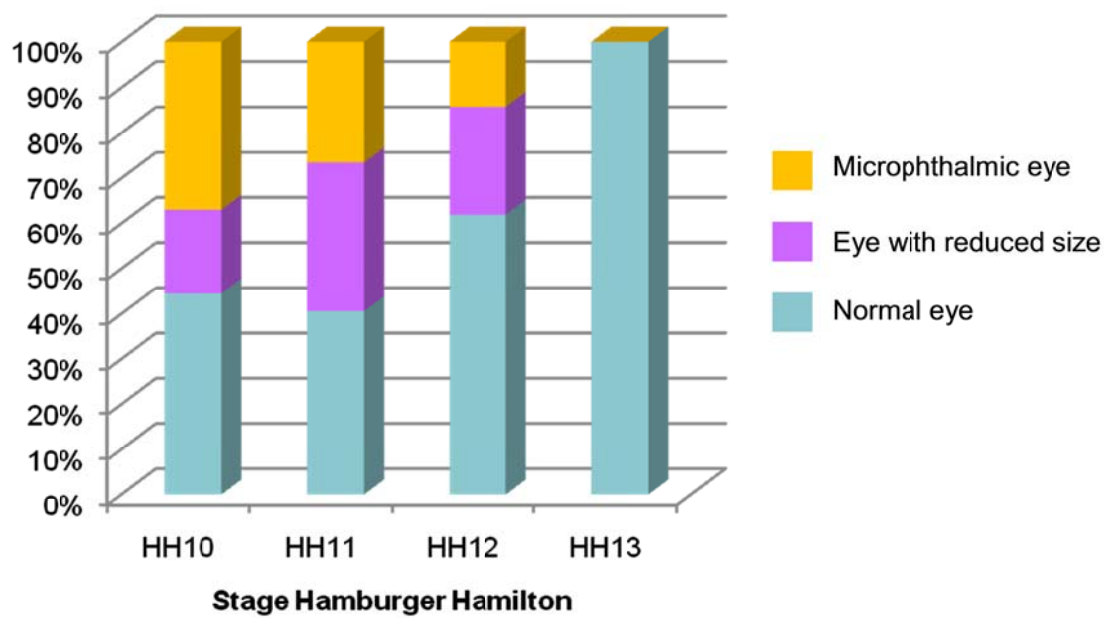
ey: eye, gm: gremlin RNA, ov: optic vesicle; np: nasal pit, b:beak.

**Fig. 3 . Differentiation at E15 of a corneal epithelium in the lens-less right eye, formed after RCAS-Gremlin electroporation at HH stage 10.**

(A-B) Cryostat section stained with Hematoxylin/Biebrich scarlet (A), showed the different components of the lens-less eye. Both neural (nr) and pigmented (pr) retina were differentiated and formed a tiny ball. They are surrounded by a sclerotic (scl). A sinuous cavity started from the eye split (spl) and is fringed by an epithelium (ept) labeled with the 11E10 antibody against Keratins K3, K5 and K14 (B).

(B) The labeling with the AK12 antibody, specific for Keratin 12 allowed to distinguished the differentiated corneal epithelium (ce).

cj: conjunctiva?, epd: epidermis, eyl: eyelid, f: feather.



**Figure 1. Collomb and Dhouailly**

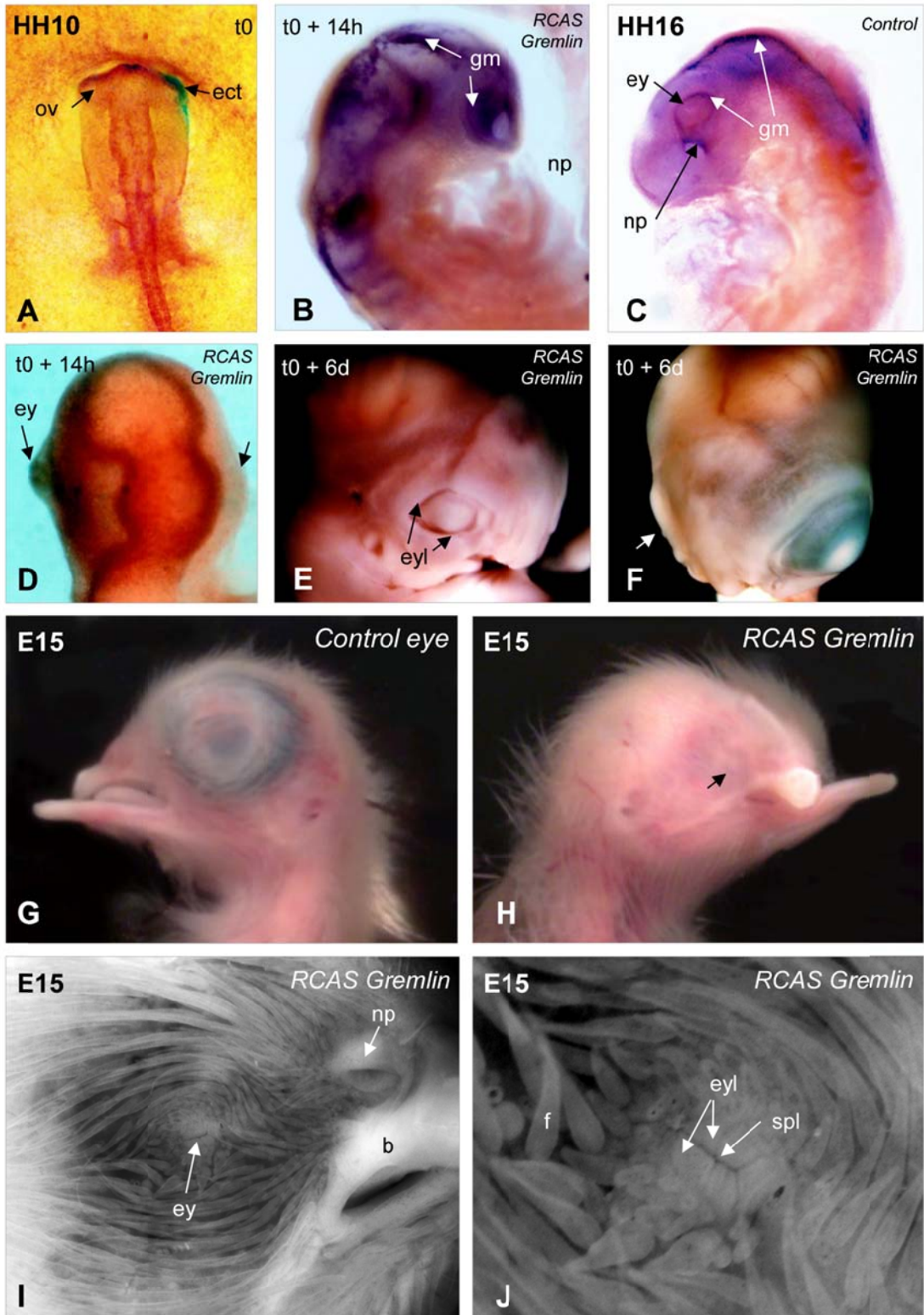


Figure 2. Collomb and Dhouailly

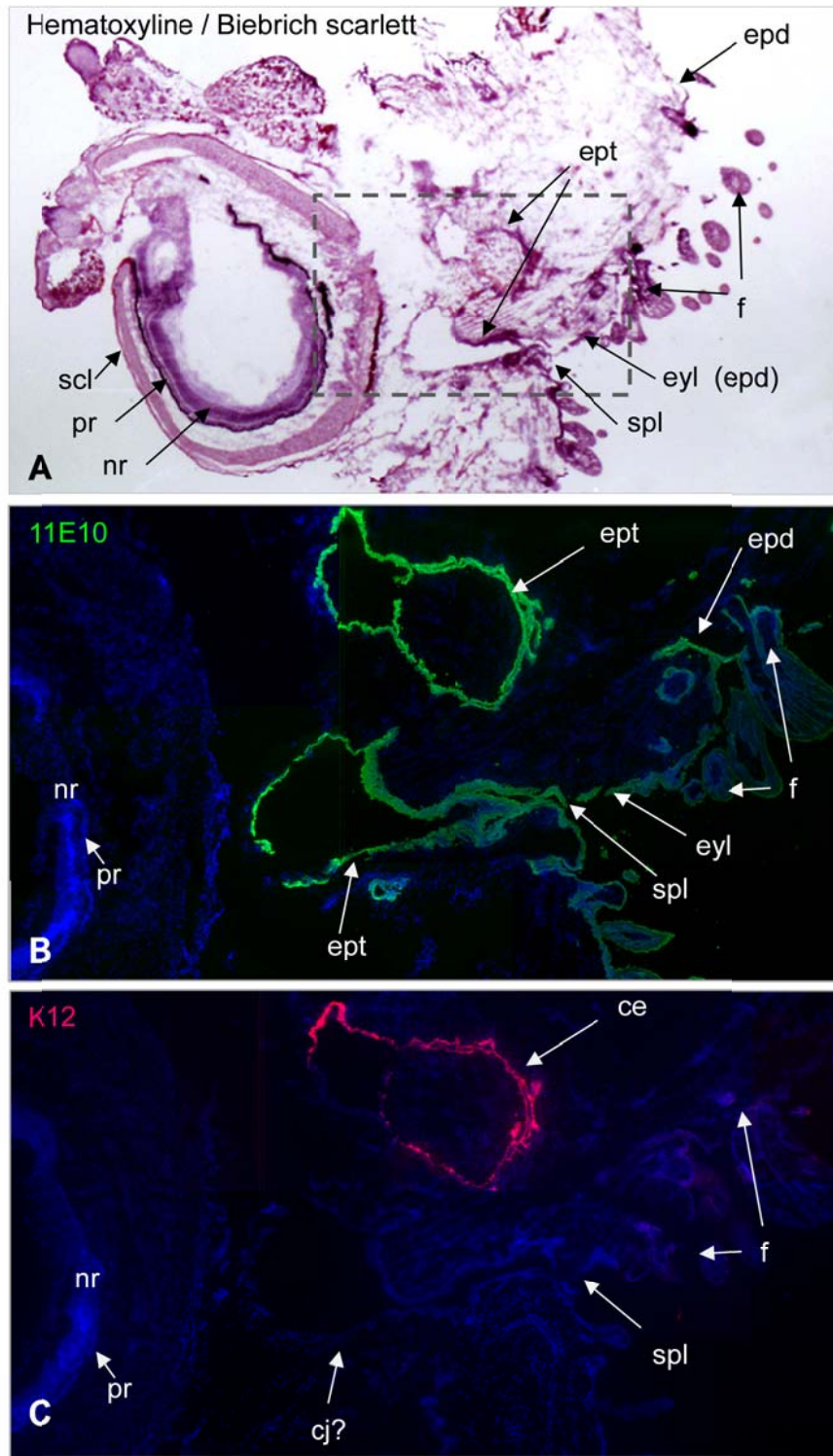


Figure 3. Collomb and Dhouailly



# **DISCUSSION**





# DISCUSSION

La mise en place du tégument au cours du développement implique des interactions tissulaires qui avaient été jusqu'à présent beaucoup plus étudiées dans le cas de la peau et de ses annexes cutanées, que dans celui de la cornée.

## **1. Les BMPs jouent un rôle positif lors de l'organisation du derme.**

Les BMPs ont été considérés jusqu'à récemment comme des inhibiteurs de la formation de phanère, suite à des expériences de surexpression qui inhibent la formation de primordia (entre autres : Jung et al., 1998a; Noramly and Morgan, 1998b; Botchkarev et al., 1999; Pummila et al., 2007). Cependant, nos travaux (Publication 1, Michon, Forest, Collomb et al., 2008) ont montré que les différents membres de la famille des BMPs jouent des rôles différents mais requis lors de l'organisation du derme et de la formation des condensations dermiques inductrices des phanères. On savait depuis plus de 40 ans que la prolifération n'est pas à l'origine de la formation de la condensation dermique (Wessells and Roessner, 1965). Nous avons montré que cette dernière est la résultante d'une migration cellulaire impliquant l'engagement des Intégrines et la nature de la matrice extracellulaire, en particulier la présence de l'exon EIIIA de la fibronectine. BMP-7 est le premier à être exprimé dans le primordium par les cellules épidermiques et favorise, comme FGF, la migration des fibroblastes vers la condensation dermique. L'effet inhibiteur de BMP-2 sur cette migration contrôle le diamètre de cette condensation. Cette étude sur la mise en place de la condensation dermique met en évidence la complexité de la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués. En effet, la connaissance des voies de signalisation présentes ne suffit pas toujours à expliquer les événements morphologiques et une fine régulation de ces voies est souvent impliquée. Nos résultats ont été confortés peu après leur parution par ceux du laboratoire d'E. Fuchs, montrant que la signalisation BMP est nécessaire au maintien de la papille dermique et à la poursuite du cycle pileux (Rendl et al., 2008).

## **2. Le stroma jouerait un rôle limité, lors de la détermination du programme de l'épithélium cornéen.**

L'étude de la labilité de l'épithélium cornéen au cours du développement est très informative du moment où ce programme est déterminé (Publication 2 : Yang, Collomb et al., soumis). Des associations d'épithélium cornéen embryonnaire de lapin ou de poulet avec des dermes embryonnaires compétents pour induire la formation de phanères ont montré que l'épithélium cornéen est labile à E12.5 chez le lapin et E4 chez le poulet. Cette labilité se traduit par une perte très rapide de l'expression de Pax6 et la formation d'un épiderme et de ses annexes, bourgeons pileux ou plumaires, sous l'influence du derme embryonnaire. L'épithélium cornéen à ce stade est spécifié mais pas encore déterminé. À partir d'au moins E23 chez le lapin (et sans doute dès E16, mais des expériences complémentaires sont requises) et de 6 jours de développement chez le poulet, l'expression de Pax6 persiste, et l'épithélium cornéen est déterminé. Chez le lapin, son expression se perd lors du phénomène

prolifératif qui est nécessaire à la formation d'un bourgeon pileux. Chez le poulet, les premières étapes de la formation des primordia ne nécessitent pas de prolifération mais un allongement des cellules. Les différences morphologiques entre la formation d'un bourgeon pileux et d'un bourgeon plumaire pourraient expliquer le fait que chez le poulet, Pax6 ne pouvant pas s'éteindre, aucune transformation de l'épithélium cornéen n'est observée au-delà de 5 jours d'incubation, et donc sa détermination est irréversible. L'épithélium cornéen embryonnaire de lapin, à partir au moins de 23 jours de développement se comporte comme un épithélium cornéen adulte.

Le stade de détermination de l'épithélium cornéen, étroitement lié à la capacité de maintien de l'expression de Pax6, correspond au stade où commence la migration des crêtes qui forment le stroma cornéen. Ces dernières dont nous verrons le rôle crucial par la suite dans la spécification de l'épithélium cornéen, pourraient contribuer à stabiliser l'expression de Pax6 et à déterminer le programme cornéen.

### **3. Contrairement au derme, le stroma ne peut induire la spécification du programme de l'épithélium cornéen dans un ectoderme banal.**

Mes travaux de thèse m'ont conduite à formuler différentes hypothèses concernant les tissus pouvant influencer la spécification de l'épithélium cornéen et à conclure sur la réalisation de celle-ci. La cornée, comme la peau, est un organe épithélio- mésenchymateux. L'investigation sur la cornée en faisant un parallèle avec la peau laissait supposer que le stroma pouvait jouer un rôle inducteur. Nos résultats (Publication 2 : Yang, Collomb et al. soumis) montrent qu'il n'en est rien, le stroma cornéen ne peut pas modifier le programme d'un ectoderme embryonnaire dorsal. Ils apparaissent donc en opposition avec ceux d'équipes ayant montré la différenciation d'un épithélium de cornée à partir de cellules souches embryonnaires (Wang et al., 2005). Une critique vis-à-vis de ces auteurs est qu'aucun marqueur de l'origine de ces cellules souches embryonnaires n'a été utilisé. En début de thèse, j'ai réalisé des expériences similaires avec une lignée de cellules souches embryonnaires exprimant le marqueur fluorescent tomato, fournie par le Dr. D. Aberdam, semée après reconstitution d'un film épithélial sur une cornée dénudée de souris nude *in vivo*. Mes résultats ont montré la reconstitution rapide d'un épithélium cornéen de souris, bien que je me sois efforcée d'enlever l'intégralité non seulement de l'épithélium cornéen, mais également du limbe. Ces expériences ont montré la capacité stupéfiante de régénération des rares cellules souches limbiques ayant échappées à la destruction du limbe par l'utilisation de solution alcoolique. La seule explication que je peux proposer pour les résultats inverses d'autres équipes, s'ils s'avéraient confirmés avec une lignée marquée de cellules souches embryonnaires, est la suivante. Les cellules souches embryonnaires sont connues pour se différencier dans les différents types cellulaires, donc y compris celui de cellules épithéliales cornéennes, pour peu que le milieu de culture ne contienne pas de facteurs inhibant la différenciation, comme le LIF pour les cellules de souris. Ces cellules, exprimant Pax6 et K12, semées sur un stroma cornéen pourraient être maintenues (voir paragraphe 2.2 des résultats) dans leur spécificité.

D'autre part, nous remarquons que si le derme est responsable de la transformation de l'ectoderme en épiderme (Olivera-Martinez et al., 2002), la formation de la cornée montre un processus inverse : c'est l'ectoderme, futur épithélium cornéen, qui est responsable de l'expression de l'acide rétinoïque par les cellules migrantes des crêtes neurales. À partir de E10.5 chez l'embryon de souris, l'ectoderme cornéen sécrète les enzymes RALDH1 et RALDH3 responsables de la formation de l'acide rétinoïque par les cellules des crêtes neurales (Matt et al., 2005). De plus, il a été récemment montré que l'acide rétinoïque provoque l'expression de Ptx2, dans les crêtes neurales, qui est responsable de l'induction de l'expression de Dkk2 par les cellules des crêtes neurales (Gage et al., 2008). L'inhibiteur de la signalisation Wnt, Dkk2, a été montré comme essentiel à la formation de l'épithélium cornéen (Mukhopadhyay et al., 2006).

#### **4. La spécification de l'épithélium cornéen intervient dans l'ectoderme dès le stade neurula, lors de la spécification du domaine préplacodal.**

Nous avons confirmé (Publication 2, Yang, Collomb et al., soumis) des travaux montrant que la vésicule cristallinienne ne joue aucun rôle dans la spécification de l'épithélium cornéen (Zhang et al., 2007), contrairement à un dogme encore en vogue actuellement comme cela a été récemment publié dans *Current Topics in Developmental Biology* (Graw, 2010). D'autres travaux précédents, détruisant les précurseurs du cristallin (Zhang et al., 2008), avaient suggéré que la placode du cristallin devait être l'inducteur. Confiant dans des travaux publiés dans *Development* et *Developmental Biology* par le groupe de Hyer (Hyer et al., 2003; Dias da Silva et al., 2007) selon lesquels l'ablation de la placode cristallinienne ne régénérerait pas après son ablation, nous avons décidé de refaire ces expériences en récupérant les embryons opérés au 14ème jour pour pouvoir observer la différenciation de l'épithélium cristallinien, caractérisé par l'expression de la kératine K12 (Chaloin-Dufau et al., 1990). À notre grande surprise, l'ectoderme cicatriciel régénérerait une placode, puis un cristallin (Publication 3 : Collomb et al., soumis). La différence des résultats obtenus provient de la toxicité du sulfate de bleu de nile utilisé à une concentration toxique par l'autre groupe.

Nous avons montré que, lors de l'ablation de la vésicule du cristallin, ce dernier jouait un rôle répulsif sur la migration des cellules des crêtes neurales. La base moléculaire de ce rôle répulsif a été démontrée par l'équipe de M. Bronner-Fraser (Lwigale and Bronner-Fraser, 2009). En effet, après l'ablation de la vésicule se produit une migration précoce et accélérée de ces cellules, connues pour sécréter Gremlin et Noggin, deux inhibiteurs de la signalisation BMP (Bardot et al., 2001; Tzahor et al., 2003). De plus, dès ce stade, la régénération du cristallin est inhibée (Publication 3 : Collomb et al., soumis).

Nous avons alors formulé l'hypothèse d'une inhibition venant stabiliser la formation de l'épithélium cornéen. En repensant aux résultats d'inhibition des précurseurs du cristallin (Zhang et al., 2008) qui conduisaient également à une inhibition de l'épithélium cornéen, nous avons aussi pensé que les précurseurs du cristallin et de l'épithélium cornéen pourraient être communs. Cette hypothèse était en ligne des travaux ayant montré que le domaine préplacodal avait une identité « cristallin » qui devait être inhibée lors de la formation des autres placodes, telles que la placode olfactive (Bhattacharyya et al., 2004). Lors de la

formation de la placode cristallinienne, l'expression de *Sox2*, qui est à un niveau de base dans l'ectoderme de la tête, est fortement augmentée dans l'ectoderme situé au contact de la vésicule optique (Kamachi et al., 1998). Bien que l'expression de *Bmp4* et de *Bmp7* ne présente pas des localisations identiques chez le poulet et la souris (Trousse et al., 2001), leur signalisation est inhibée par Gremlin ou Noggin (Mehler et al., 1997). Nous avons alors décidé de surexprimer l'un des deux par électroporation de l'ectoderme situé en face de la vésicule optique. Nous disposons dans le laboratoire depuis l'an 2000 de la construction RCAS-Gremlin, qui nous avait été fournie par le Dr. M. Marx. La surexpression de Gremlin au stade HH 10 chez l'embryon de poulet induit la formation d'oeil microphthalmique. Cette microphthalmie résulte de l'absence de facteurs de croissance, en particulier FGF10, secrétés par le cristallin, qui affecte la croissance du globe oculaire dans sa totalité (Govindarajan et al., 2000). L'expression de *Sox2* étant augmentée au stade HH 10 suite à la signalisation BMP4 (Kamachi et al., 1998), l'inhibition de cette dernière conduit à la formation d'un épithélium cornéen en face de la vésicule optique. L'identité cornéenne est attestée par la présence de kératine 12 (Chaloin-Dufau et al., 1990). Nous pouvons donc en conclure que les précurseurs de l'épithélium cornéen sont communs avec ceux du cristallin, et que la spécification de l'identité cornéenne est établie quand la dernière étape de la spécification du cristallin est contrecarrée (publication 4, Collomb et al., en préparation, première version jointe à ce manuscrit).

## **5. Lors de sa formation embryonnaire, le stroma, ou plutôt les cellules des crêtes neurales qui le constituent, stabiliseraient la spécification du programme cornéen provoquant sa détermination.**

Nous pouvons également proposer que lors du développement normal, l'ectoderme oculaire qui n'est pas strictement en face de la vésicule optique, ne voit pas l'expression de *Sox2* augmenter, et que celle-ci est même diminuée lors de la migration des crêtes neurales venant constituer le stroma. La spécification de l'épithélium cornéen serait alors confirmée, c'est-à-dire déterminée.

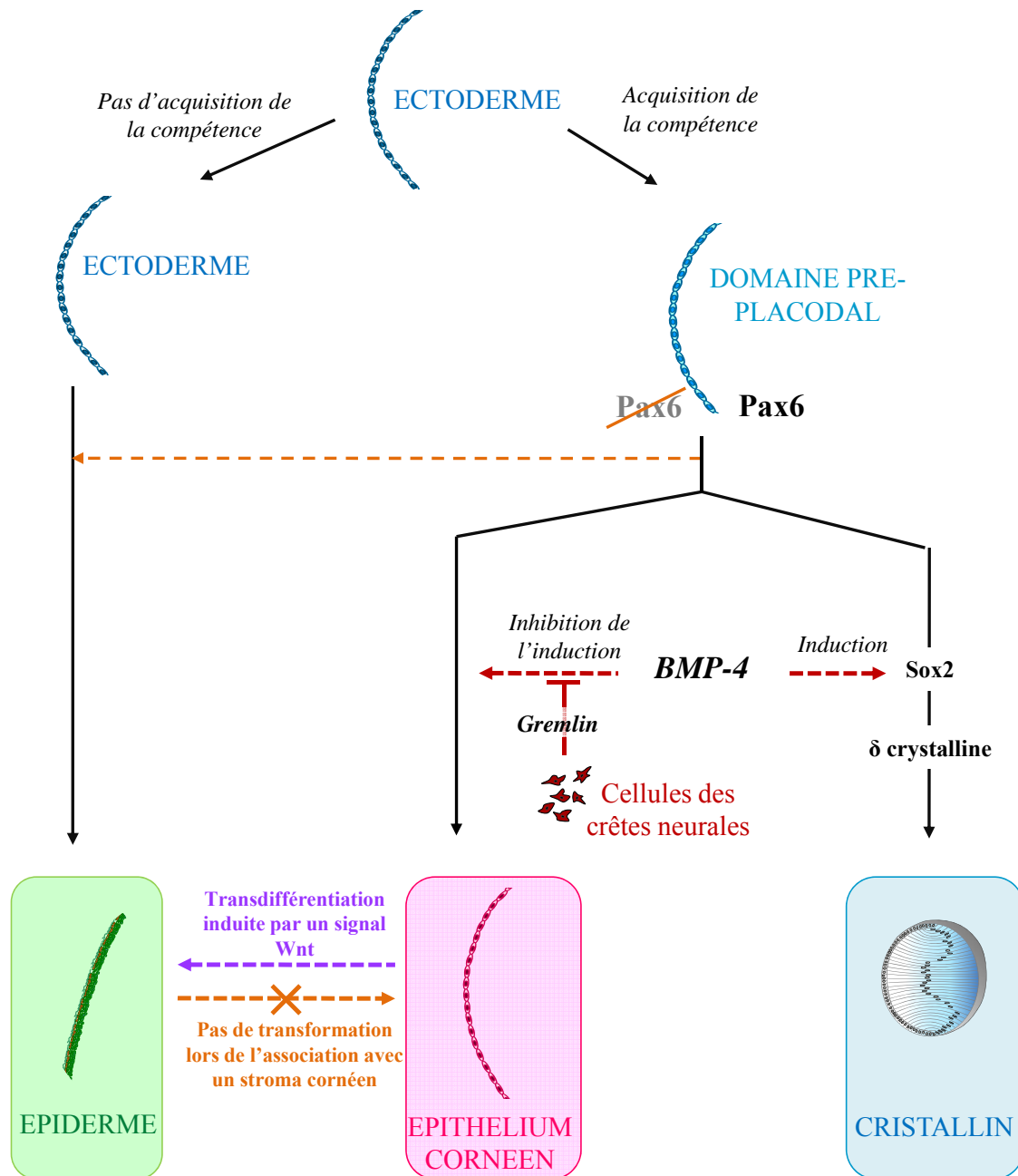
## **6. Les cellules souches cornéennes, localisation et différences avec les cellules souches épidermiques du bulge.**

La formation au cours du développement et le maintien de la niche limbique dans la cornée adulte demeurent inconnus. La très faible quantité de cellules présentes dans le stroma cornéen central et l'absence de vascularisation ne suggèrent guère qu'un rôle de support de celui-ci. Cependant, les cellules souches limbiques sont habituellement situées dans un microenvironnement optimal qui doit favoriser le maintien de l'état indifférencié. Bien que la thèse de la localisation limbique des cellules souches de l'épithélium cornéen ait été établie par le laboratoire de T. T. Sun (Schermer et al., 1986) et confirmée par de nombreux travaux (voir introduction), elle a été mise en défaut par une publication récente du groupe de Y. Barrandon (Majo et al., 2008). Ce dernier a montré que la cornée centrale de souris comportait des cellules souches. Or le laboratoire de Kao (Tanifuji-Terai et al., 2006) avait

posé la question suivante : à l'âge de 6 mois, il reste encore dans l'épithélium de la cornée centrale de cette espèce des cellules qui n'expriment pas la kératine 12 (K12), s'agirait-il de cellules souches ? La réponse est apportée par Y. Barrandon: ce sont bien des cellules souches, pas encore ségréguées, mais cette conclusion ne doit pas être généralisée aux différentes espèces.

La maturation de la cornée de souris est tardive. Comment établir le moment de la formation de la niche du limbe ? Pour répondre à cette question il faut avoir identifié des marqueurs de l'identité des cellules souches cornéennes autres que l'expression de K12. Grâce à des travaux de microarray, j'ai pu établir une base de données concernant l'identité des cellules souches cornéennes et épidermiques du bulge. Je n'ai pas encore eu le temps d'exploiter ces résultats.

**En conclusion**, le principal apport de mes travaux de thèse est d'avoir montré à quel moment et comment se produisent la spécification puis la détermination cornéenne. Contrairement à la spécification de l'épiderme, celle de l'épithélium cornéen a lieu très tôt au cours du développement. Le mésenchyme cornéen ne joue pas de rôle inducteur, comme le derme vis-à-vis de l'ectoderme. Il est cependant indispensable pour la stabilisation de l'épithélium cornéen. Finalement, le devenir par défaut de l'ectoderme est la formation d'un épiderme (Fig. 29). L'acquisition de la compétence lors de la formation du domaine pré-placodal conduit l'ectoderme à former un cristallin et par défaut de la dernière étape, un épithélium cornéen.



**Figure 29 : Trois programmes de différenciation issus de l'ectoderme.**

La suppression des précurseurs du domaine préplacodal aboutit à la formation d'un épiderme (Zhang et al. 2008). L'inhibition de BMP-4 avant la formation de la placode cristallinienne aboutit à la formation d'un épithélium cornéen (Collomb and Dhouailly, *en préparation*). Les précurseurs du cristallin et de l'épithélium cornéen sont donc communs. L'épiderme est un programme par défaut par rapport à l'épithélium cornéen qui suit le programme cristallinien mais est arrêté avant la dernière étape.

# **PERSPECTIVES**





## PERSPECTIVES

1° Au cours de ce travail de thèse, j'ai démontré que les précurseurs de la cornée et du cristallin sont communs, et que le programme cornéen s'effectue par défaut par rapport à celui du cristallin : la dernière étape n'a pas lieu. Or le programme cristallinien de « base » est établi très tôt au cours du développement (revue : Bhattacharyya and Bronner-Fraser, 2004). Lorsque l'ectoderme du domaine préplacodal est cultivé *in vitro*, la formation de cellules exprimant les cristallines a été observée (Barabanov and Fedtsova, 1982). Ces dernières expériences pourront être reprises, en augmentant le temps d'observation afin de tester à l'aide de l'anticorps AK12 la différenciation potentielle de cellules exprimant la kératine 12. **Les résultats de cette expérience pourraient confirmer l'absence d'induction positive supplémentaire requise pour l'établissement du programme cornéen, en plus de la « non finition » du programme cristallinien. Dans le cas contraire, ces recherches devraient déboucher sur l'identification de cette induction ainsi que des tissus dont elle serait issue.**

2° La transdifférenciation des cellules basales de l'épithélium cornéen en épiderme s'effectue en plusieurs étapes d'inductions négatives, mais aussi positives sous l'influence d'un derme embryonnaire (Pearson et al., 2005). La première est le retour des cellules cornéennes à l'état de cellules souches limniques. La seconde est l'inhibition de l'expression de Pax6 et la constitution de cellules souches épidermiques. J'ai réalisé une étude comparative par **microarray** des gènes exprimés dans les cellules souches de l'épithélium cornéen et les cellules souches épidermiques du bulge. J'ai montré l'expression commune d'au moins **17959 gènes, celle de 1768 gènes spécifiques aux cellules souches de cornée et 1853 spécifiques aux cellules souches épidermiques**. J'avais entrepris ces travaux dans le but de palier les inconvénients liés à la disponibilité des tissus pour les greffes d'épithélium de cornée, puisque des autogreffes pourraient être envisagées à partir de cellules souches transformées prélevées sur des follicules pileux. Ce but, poursuivi par de nombreux laboratoires sur le plan international, apparaît à présent très aléatoire. La première constatation de mes résultats de microarray est que si le programme ectodermique est un programme par défaut par rapport au programme « épithélium oculaire », l'établissement d'un programme « cellules souches épidermiques » sous-entend l'activation au cours de la morphogenèse de la peau d'environ 1853 gènes propres. Or si les potentialités inductrices du derme sont bien établies, il n'en est pas de même pour le stroma cornéen. Mes résultats montrent que tout au plus **le stroma pourrait permettre le maintien de l'expression de Pax6, nécessaire à la différenciation de l'épithélium cornéen. Quels sont les facteurs permettant ce maintien ?** Une autre perspective de ces travaux serait **d'identifier un facteur de transcription** dont l'activation est propre au programme « cellules souches cornéennes » et **dont l'expression serait activée au cours du développement embryonnaire de l'épithélium cornéen**, puis d'identifier la signalisation et le tissu responsable de cette activation.



# **BIBLIOGRAPHIE**



## BIBLIOGRAPHIE

- Abdelhak, S., Kalatzis, V., Heilig, R., Compain, S., Samson, D., Vincent, C., Weil, D., Cruaud, C., Sahly, I., Leibovici, M., Bitner-Glindzicz, M., Francis, M., Lacombe, D., Vigneron, J., Charachon, R., Boven, K., Bedbeder, P., Van Regemorter, N., Weissenbach, J., and Petit, C. (1997) A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat Genet* 15:157-164.
- Aberle, H., Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., Kemler, R., and Hoschuetzky, H. (1994) Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *Journal of cell science* 107 ( Pt 12):3655-3663.
- Adler, R., and Canto-Soler, M.V. (2007) Molecular mechanisms of optic vesicle development: complexities, ambiguities and controversies. *Dev Biol* 305:1-13.
- Alonso, L., and Fuchs, E. (2003) Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1:11830-11835.
- Amano, S., Yamagami, S., Mimura, T., Uchida, S., and Yokoo, S. (2006) Corneal stromal and endothelial cell precursors. *Cornea* 25:S73-77.
- Andl, T., Reddy, S.T., Gaddapara, T., and Millar, S.E. (2002) WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Developmental cell* 2:643-653.
- Ashery-Padan, R., Marquardt, T., Zhou, X., and Gruss, P. (2000) Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev* 14:2701-2711.
- Bailey, A.P., Bhattacharyya, S., Bronner-Fraser, M., and Streit, A. (2006) Lens specification is the ground state of all sensory placodes, from which FGF promotes olfactory identity. *Dev Cell* 11:505-517.
- Baker, C.V., and Bronner-Fraser, M. (2001) Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev Biol* 232:1-61.
- Barabanov, V.M., and Fedtsova, N.G. (1982) The distribution of lens differentiation capacity in the head ectoderm of chick embryos. *Differentiation* 21:183-190.
- Bardot, B., Lecoin, L., Fliniaux, I., Huillard, E., Marx, M., and Viallet, J.P. (2004) *Drm/Gremlin*, a BMP antagonist, defines the interbud region during feather development. *Int J Dev Biol* 48:149-156.
- Bardot, B., Lecoin, L., Huillard, E., Calothy, G., and Marx, M. (2001) Expression pattern of the *drm/gremlin* gene during chicken embryonic development. *Mech Dev* 101:263-265.
- Barrandon, Y. (1998) [The biology of epidermal stem cells]. *Annales de dermatologie et de vénéréologie* 125 Suppl 2:S5-6.
- Belecky-Adams, T.L., Adler, R., and Beebe, D.C. (2002) Bone morphogenetic protein signaling and the initiation of lens fiber cell differentiation. *Development* 129:3795-3802.
- Bhasin, N., Maynard, T.M., Gallagher, P.A., and LaMantia, A.S. (2003) Mesenchymal/epithelial regulation of retinoic acid signaling in the olfactory placode. *Dev Biol* 261:82-98.
- Bhattacharyya, S., Bailey, A.P., Bronner-Fraser, M., and Streit, A. (2004) Segregation of lens and olfactory precursors from a common territory: cell sorting and reciprocity of *Dlx5* and *Pax6* expression. *Dev Biol* 271:403-414.
- Bhattacharyya, S., and Bronner-Fraser, M. (2004) Hierarchy of regulatory events in sensory placode development. *Curr Opin Genet Dev* 14:520-526.
- Bickenbach, J.R. (1981) Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *Journal of dental research* 60 Spec No C:1611-1620.
- Bickenbach, J.R., and Mackenzie, I.C. (1984) Identification and localization of label-retaining cells in hamster epithelia. *J Invest Dermatol* 82:618-622.

- Blanpain, C., Lowry, W.E., Geoghegan, A., Polak, L., and Fuchs, E. (2004) Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 118:635-648.
- Blazejewska, E.A., Schlotzer-Schrehardt, U., Zenkel, M., Bachmann, B., Chankiewicz, E., Jacobi, C., and Kruse, F.E. (2009) Corneal limbal microenvironment can induce transdifferentiation of hair follicle stem cells into corneal epithelial-like cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 27:642-652.
- Bonini, N.M., Leiserson, W.M., and Benzer, S. (1993) The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell* 72:379-395.
- Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Nakamura, M., Huber, O., Funa, K., Lauster, R., Paus, R., and Gilchrist, B.A. (2001) Noggin is required for induction of the hair follicle growth phase in postnatal skin. *Faseb J* 15:2205-2214.
- Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Roth, W., Nakamura, M., Chen, L.H., Herzog, W., Lindner, G., McMahon, J.A., Peters, C., Lauster, R., McMahon, A.P., and Paus, R. (1999) Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction. *Nature cell biology* 1:158-164.
- Botchkarev, V.A., and Kishimoto, J. (2003) Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling. *J Investig Dermatol Symp Proc* 8:46-55.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., and Robertson, E. (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309:255-256.
- Buck, R.C. (1985) Measurement of centripetal migration of normal corneal epithelial cells in the mouse. *Investigative ophthalmology & visual science* 26:1296-1299.
- Cadi, R., Dhouailly, D., and Sengel, P. (1983) Use of retinoic acid for the analysis of dermal-epidermal interactions in the tarsometatarsal skin of the chick embryo. *Dev Biol* 100:489-495.
- Challen, G.A., and Little, M.H. (2006) A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24:3-12.
- Chaloin-Dufau, C., Pavitt, I., Delorme, P., and Dhouailly, D. (1993) Identification of keratins 3 and 12 in corneal epithelium of vertebrates. *Epithelial Cell Biol* 2:120-125.
- Chaloin-Dufau, C., Sun, T.T., and Dhouailly, D. (1990) Appearance of the keratin pair K3/K12 during embryonic and adult corneal epithelial differentiation in the chick and in the rabbit. *Cell Differ Dev* 32:97-108.
- Chan, L.S. (1997) Human skin basement membrane in health and in autoimmune diseases. *Front Biosci* 2:d343-352.
- Chang, B., Smith, R.S., Peters, M., Savinova, O.V., Hawes, N.L., Zabaleta, A., Nusinowitz, S., Martin, J.E., Davisson, M.L., Cepko, C.L., Hogan, B.L., and John, S.W. (2001) Haploinsufficient *Bmp4* ocular phenotypes include anterior segment dysgenesis with elevated intraocular pressure. *BMC genetics* 2:18.
- Chang, C.H., Jiang, T.X., Lin, C.M., Burrus, L.W., Chuong, C.M., and Widelitz, R. (2004) Distinct Wnt members regulate the hierarchical morphogenesis of skin regions (spinal tract) and individual feathers. *Mechanisms of development* 121:157-171.
- Charrier, J.B., Catala, M., Lapointe, F., Le-Douarin, N., and Teillet, M.A. (2005) Cellular dynamics and molecular control of the development of organizer-derived cells in quail-chick chimeras. *Int J Dev Biol* 49:181-191.
- Chen, C.W., Jung, H.S., Jiang, T.X., and Chuong, C.M. (1997) Asymmetric expression of Notch/Delta/Serrate is associated with the anterior-posterior axis of feather buds. *Dev Biol* 188:181-187.
- Cheyette, B.N., Green, P.J., Martin, K., Garren, H., Hartenstein, V., and Zipursky, S.L. (1994) The *Drosophila sine oculis* locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron* 12:977-996.
- Chiambaretta, F., Blanchon, L., Rabier, B., Kao, W.W., Liu, J.J., Dastugue, B., Rigal, D., and Sapin, V. (2002) Regulation of corneal keratin-12 gene expression by the human Kruppel-like transcription factor 6. *Investigative ophthalmology & visual science* 43:3422-3429.

- Chiang, C., Swan, R.Z., Grachtchouk, M., Bolinger, M., Litingtung, Y., Robertson, E.K., Cooper, M.K., Gaffield, W., Westphal, H., Beachy, P.A., and Dlugosz, A.A. (1999) Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Dev Biol* 205:1-9.
- Chuang, P.T., and McMahon, A.P. (1999) Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 397:617-621.
- Chuong, C.M. (1998a) Molecular basis of epithelial appendage morphogenesis. Landes biosciences, Austin, TX: Landes bioscience.
- Chuong, C.M. (1998b) Molecular basis of epithelial appendage morphogenesis. R. G. Landes Company, Georgetown, Texas, USA, Molecular Biology Intelligence Unit Vol.1.
- Chuong, C.M., Widelitz, R.B., Ting-Berreth, S., and Jiang, T.X. (1996a) Early events during avian skin appendage regeneration: dependence on epithelial-mesenchymal interaction and order of molecular reappearance. *The Journal of investigative dermatology* 107:639-646.
- Chuong, C.M., Widelitz, R.B., Ting-Berreth, S., and Jiang, T.X. (1996b) Early events during avian skin appendage regeneration: dependence on epithelial-mesenchymal interaction and order of molecular reappearance. *J Invest Dermatol* 107:639-646.
- Collinson, J.M., Chanas, S.A., Hill, R.E., and West, J.D. (2004) Corneal development, limbal stem cell function, and corneal epithelial cell migration in the Pax6(+/-) mouse. *Investigative ophthalmology & visual science* 45:1101-1108.
- Collinson, J.M., Morris, L., Reid, A.I., Ramaesh, T., Keighren, M.A., Flockhart, J.H., Hill, R.E., Tan, S.S., Ramaesh, K., Dhillon, B., and West, J.D. (2002) Clonal analysis of patterns of growth, stem cell activity, and cell movement during the development and maintenance of the murine corneal epithelium. *Dev Dyn* 224:432-440.
- Collomb, E., Yang, Y., Mouillon, M., and Dhouailly, D. (Submitted) Lens placode can regenerate in chick embryo.
- Cotsarelis, G., Cheng, S.Z., Dong, G., Sun, T.T., and Lavker, R.M. (1989) Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* 57:201-209.
- Cotsarelis, G., Sun, T.T., and Lavker, R.M. (1990) Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61:1329-1337.
- Couly, G., and Le Douarin, N.M. (1988) The fate map of the cephalic neural primordium at the presomitic to the 3-somite stage in the avian embryo. *Development (Cambridge, England)* 103 Suppl:101-113.
- Couly, G.F., Coltey, P.M., and Le Douarin, N.M. (1992) The developmental fate of the cephalic mesoderm in quail-chick chimeras. *Development* 114:1-15.
- Cross, P.C., and Mercer, R. (1995) Ultrastructure cellulaire et tissulaire. Approche fonctionnelle.
- Crowe, R., Henrique, D., Ish-Horowitz, D., and Niswander, L. (1998) A new role for Notch and Delta in cell fate decisions: patterning the feather array. *Development* 125:767-775.
- Davanger, M., and Evensen, A. (1971) Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 229:560-561.
- Davis, J., Duncan, M.K., Robison, W.G., Jr., and Piatigorsky, J. (2003) Requirement for Pax6 in corneal morphogenesis: a role in adhesion. *J Cell Sci* 116:2157-2167.
- Delaye, M., and Tardieu, A. (1983) Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency. *Nature* 302:415-417.
- Desbiens, X., Queva, C., Jaffredo, T., Stehelin, D., and Vandembunder, B. (1991) The relationship between cell proliferation and the transcription of the nuclear oncogenes c-myc, c-myb and c-ets-1 during feather morphogenesis in the chick embryo. *Development (Cambridge, England)* 111:699-713.
- Dhouailly, D. (1973) Dermo-epidermal interactions between birds and mammals: differentiation of cutaneous appendages. *J Embryol Exp Morphol* 30:587-603.



- Dhouailly, D. (1977) Dermo-epidermal interactions during morphogenesis of cutaneous appendages in amniotes. In: Robert, L. (ed) *Frontiers of Matrix Biology*. S. Karger, Basel, pp. 86-121.
- Dhouailly, D. (1984) Specification of feather and scale patterns. In: Malacinski, G.M.B., S.V. (ed) *Pattern Formation*. Macmillan Pub. Co., New York, London, pp. 581-601.
- Dhouailly, D., Olivera-Martinez, I., Fliniaux, I., Missier, S., Viallet, J.P., and Thelu, J. (2004) Skin field formation: morphogenetic events. *Int J Dev Biol* 48:85-91.
- Dhouailly, D., Prin, F., Kanzler, B., and Viallet, J.P. (1998) Variations of cutaneous appendages: regional specification and cross-species signals. In "Molecular basis of epithelial appendage morphogenesis". R. G. Landes Company, Georgetown, Texas, USA, *Molecular Biology Intelligence Unit Vol.1*.
- Dhouailly, D., and Sawyer, R.H. (1984) Avian scale development. XI. Initial appearance of the dermal defect in scaleless skin. *Dev Biol* 105:343-350.
- Dhouailly, D., and Sengel, P. (1975) [Feather- and hair-forming properties of dermal cells of glabrous skin from bird and mammals]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 281:1007-1010.
- Dias da Silva, M.R., Tiffin, N., Mima, T., Mikawa, T., and Hyer, J. (2007) FGF-mediated induction of ciliary body tissue in the chick eye. *Dev Biol* 304:272-285.
- Dimanlig, P.V., Faber, S.C., Auerbach, W., Makarenkova, H.P., and Lang, R.A. (2001) The upstream ectoderm enhancer in Pax6 has an important role in lens induction. *Development* 128:4415-4424.
- Du, Y., Funderburgh, M.L., Mann, M.M., SundarRaj, N., and Funderburgh, J.L. (2005) Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 23:1266-1275.
- Dua, H.S., and Forrester, J.V. (1990) The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing. *American journal of ophthalmology* 110:646-656.
- Dua, H.S., Joseph, A., Shanmuganathan, V.A., and Jones, R.E. (2003) Stem cell differentiation and the effects of deficiency. *Eye (London, England)* 17:877-885.
- 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* 208:349-362.
- Ebato, B., Friend, J., and Thoft, R.A. (1988) Comparison of limbal and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Investigative ophthalmology & visual science* 29:1533-1537.
- Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Jr., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., and Svendsen, C.N. (2009) Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457:277-280.
- Elder, M.J., Hiscott, P., and Dart, J.K. (1997) Intermediate filament expression by normal and diseased human corneal epithelium. *Human pathology* 28:1348-1354.
- Engelmann, K., Bohnke, M., and Friedl, P. (1988) Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 29:1656-1662.
- Faber, S.C., Robinson, M.L., Makarenkova, H.P., and Lang, R.A. (2002) Bmp signaling is required for development of primary lens fiber cells. *Development* 129:3727-3737.
- Favier, B., Fliniaux, I., Thelu, J., Viallet, J.P., Demarchez, M., Jahoda, C.A., and Dhouailly, D. (2000) Localisation of members of the notch system and the differentiation of vibrissa hair follicles: receptors, ligands, and fringe modulators. *Dev Dyn* 218:426-437.
- Fernig, D.G., and Gallagher, J.T. (1994) Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. *Progress in growth factor research* 5:353-377.
- Ferraris, C., Chevalier, G., Favier, B., Jahoda, C.A., and Dhouailly, D. (2000) Adult corneal epithelium basal cells possess the capacity to activate epidermal, pilosebaceous and sweat gland genetic programs in response to embryonic dermal stimuli. *Development* 127:5487-5495.
- Fini, M.E. (1999) Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Prog Retin Eye Res* 18:529-551.
- Fliniaux, I., Viallet, J.P., and Dhouailly, D. (2004) Signaling dynamics of feather tract formation from the chick somatopleure. *Development* 131:3955-3966.

- Fokina, V.M., and Frolova, E.I. (2006) Expression patterns of Wnt genes during development of an anterior part of the chicken eye. *Dev Dyn* 235:496-505.
- Freter, S., Muta, Y., Mak, S.S., Rinkwitz, S., and Ladher, R.K. (2008) Progressive restriction of otic fate: the role of FGF and Wnt in resolving inner ear potential. *Development* 135:3415-3424.
- Frisen, J. (2002) Stem cell plasticity? *Neuron* 35:415-418.
- Fuchs, E., Merrill, B.J., Jamora, C., and DasGupta, R. (2001) At the roots of a never-ending cycle. *Dev Cell* 1:13-25.
- Fuhrmann, S., Levine, E.M., and Reh, T.A. (2000) Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick. *Development* 127:4599-4609.
- Fujiwara, M., Uchida, T., Osumi-Yamashita, N., and Eto, K. (1994) Uchida rat (rSey): a new mutant rat with craniofacial abnormalities resembling those of the mouse Sey mutant. *Differentiation* 57:31-38.
- Funderburgh, M.L., Du, Y., Mann, M.M., SundarRaj, N., and Funderburgh, J.L. (2005) PAX6 expression identifies progenitor cells for corneal keratocytes. *Faseb J* 19:1371-1373.
- Furuta, Y., and Hogan, B.L. (1998a) BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes Dev* 12:3764-3775.
- Furuta, Y., and Hogan, B.L. (1998b) BMP4 is essential for lens induction in twhe mouse embryo. *Genes Dev* 12:3764-3775.
- Gage, P.J., Qian, M., Wu, D., and Rosenberg, K.I. (2008) The canonical Wnt signaling antagonist DKK2 is an essential effector of PITX2 function during normal eye development. *Dev Biol* 317:310-324.
- Gao, N., Wang, Z., Huang, B., Ge, J., Lu, R., Zhang, K., Fan, Z., Lu, L., Peng, Z., and Cui, G. (2007) Putative epidermal stem cell convert into corneal epithelium-like cell under corneal tissue in vitro. *Science in China* 50:101-110.
- Garcia-Castro, M.I., Marcelle, C., and Bronner-Fraser, M. (2002) Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science* 297:848-851.
- Gat, U., DasGupta, R., Degenstein, L., and Fuchs, E. (1998) De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell* 95:605-614.
- Ghazizadeh, S., and Taichman, L.B. (2001) Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *Embo J* 20:1215-1222.
- Ghazizadeh, S., and Taichman, L.B. (2005) Organization of stem cells and their progeny in human epidermis. *J Invest Dermatol* 124:367-372.
- Gipson, I.K. (1989) The epithelial basement membrane zone of the limbus. *Eye (London, England)* 3 (Pt 2):132-140.
- Glaser, T., Walton, D.S., and Maas, R.L. (1992) Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. *Nat Genet* 2:232-239.
- Goetinck, P.F., and Abbott, U.K. (1963) Tissue interactions in the scaleless mutant and the use of scaleless as an ectodermal marker in studies of normal limb differentiation. *J Exp Zool* 154:7-19.
- Govindarajan, V., Ito, M., Makarenkova, H.P., Lang, R.A., and Overbeek, P.A. (2000) Endogenous and ectopic gland induction by FGF-10. *Dev Biol* 225:188-200.
- Grainger, R.M., Herry, J.J., and Henderson, R.A. (1988) Reinvestigation of the role of the optic vesicle in embryonic lens induction. *Development* 102:517-526.
- Graw, J. (2010) Eye development. *Current topics in developmental biology* 90:343-386.
- Griep, A.E. (2006) Cell cycle regulation in the developing lens. *Seminars in cell & developmental biology* 17:686-697.
- Guillemot, F., and Cepko, C.L. (1992) Retinal fate and ganglion cell differentiation are potentiated by acidic FGF in an in vitro assay of early retinal development. *Development* 114:743-754.
- Hamburger, V., and Hamilton, H.L. (1992) A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* 195:231-272.

- Hammerschmidt, M., Brook, A., and McMahon, A.P. (1997) The world according to hedgehog. *Trends Genet* 13:14-21.
- Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.W., Meissner, A., Cassady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.C., Townes, T.M., and Jaenisch, R. (2007) Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science (New York, N.Y)* 318:1920-1923.
- Harris, M.P., Linkhart, B.L., and Fallon, J.F. (2004) Bmp7 mediates early signaling events during induction of chick epidermal organs. *Dev Dyn* 231:22-32.
- Hashimoto, O., Nakamura, T., Shoji, H., Shimasaki, S., Hayashi, Y., and Sugino, H. (1997) A novel role of follistatin, an activin-binding protein, in the inhibition of activin action in rat pituitary cells. Endocytotic degradation of activin and its acceleration by follistatin associated with cell-surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 272:13835-13842.
- Haskjold, E., and Nicolaissen, B., Jr. (1988) Isolation and culture of basal cells of the human corneal epithelium. *Acta ophthalmologica* 66:387-392.
- Hay, E.D. (1980) Development of the vertebrate cornea. *International review of cytology* 63:263-322.
- Hay, E.D., Linsenmayer, T.F., Trelstad, R.L., and von der Mark, K. (1979) Origin and distribution of collagens in the developing avian cornea. *Current topics in eye research* 1:1-35.
- Headon, D.J., and Overbeek, P.A. (1999) Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction. *Nature genetics* 22:370-374.
- Herzog, W., Sonntag, C., von der Hardt, S., Roehl, H.H., Varga, Z.M., and Hammerschmidt, M. (2004) Fgf3 signaling from the ventral diencephalon is required for early specification and subsequent survival of the zebrafish adenohypophysis. *Development* 131:3681-3692.
- Hill, R.E., Favor, J., Hogan, B.L., Ton, C.C., Saunders, G.F., Hanson, I.M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N.D., and van Heyningen, V. (1991) Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354:522-525.
- Hogan, B.L. (1996) Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 6:432-438.
- Hogan, B.L., Horsburgh, G., Cohen, J., Hetherington, C.M., Fisher, G., and Lyon, M.F. (1986) Small eyes (Sey): a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 97:95-110.
- Horne, K.A., and Jahoda, C.A. (1992) Restoration of hair growth by surgical implantation of follicular dermal sheath. *Development* 116:563-571.
- Houghton, L., Lindon, C., and Morgan, B.A. (2005) The ectodysplasin pathway in feather tract development. *Development (Cambridge, England)* 132:863-872.
- Hsieh, J.J., Henkel, T., Salmon, P., Robey, E., Peterson, M.G., and Hayward, S.D. (1996) Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Molecular and cellular biology* 16:952-959.
- Hu, S., Mamedova, A., and Hegde, R.S. (2008) DNA-binding and regulation mechanisms of the SIX family of retinal determination proteins. *Biochemistry* 47:3586-3594.
- Huelsken, J., Vogel, R., Erdmann, B., Cotsarelis, G., and Birchmeier, W. (2001) beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* 105:533-545.
- Hyer, J., Kuhlman, J., Afif, E., and Mikawa, T. (2003) Optic cup morphogenesis requires pre-lens ectoderm but not lens differentiation. *Dev Biol* 259:351-363.
- Imanishi, J., Kamiyama, K., Iguchi, I., Kita, M., Sotozono, C., and Kinoshita, S. (2000) Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Progress in retinal and eye research* 19:113-129.
- Ishihara, T., Ikeda, K., Sato, S., Yajima, H., and Kawakami, K. (2008) Differential expression of Eya1 and Eya2 during chick early embryonic development. *Gene Expr Patterns* 8:357-367.
- Ito, M., Liu, Y., Yang, Z., Nguyen, J., Liang, F., Morris, R.J., and Cotsarelis, G. (2005) Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nature medicine* 11:1351-1354.
- Jamora, C., DasGupta, R., Kocieniewski, P., and Fuchs, E. (2003) Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* 422:317-322.

- Jang, Y.Y., Collector, M.I., Baylin, S.B., Diehl, A.M., and Sharkis, S.J. (2004) Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nature cell biology* 6:532-539.
- Jayasena, C.S., Ohshima, T., Segil, N., and Groves, A.K. (2008) Notch signaling augments the canonical Wnt pathway to specify the size of the otic placode. *Development* 135:2251-2261.
- Jensen, K.B., and Watt, F.M. (2006) Single-cell expression profiling of human epidermal stem and transit-amplifying cells: *Lrig1* is a regulator of stem cell quiescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11958-11963.
- Jester, J.V. (2008) Corneal crystallins and the development of cellular transparency. *Seminars in cell & developmental biology* 19:82-93.
- Jester, J.V., Barry, P.A., Lind, G.J., Petroll, W.M., Garana, R., and Cavanagh, H.D. (1994) Corneal keratocytes: in situ and in vitro organization of cytoskeletal contractile proteins. *Investigative ophthalmology & visual science* 35:730-743.
- Johnson, R.L., and Tabin, C. (1995) The long and short of hedgehog signaling. *Cell* 81:313-316.
- Jones, P.H., and Watt, F.M. (1993) Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* 73:713-724.
- Joyce, N.C. (2005) Cell cycle status in human corneal endothelium. *Exp Eye Res* 81:629-638.
- Joyce, N.C., Harris, D.L., and Mello, D.M. (2002) Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium: contact inhibition and TGF-beta2. *Investigative ophthalmology & visual science* 43:2152-2159.
- Jung, H.S., Francis-West, P.H., Widelitz, R.B., Jiang, T.X., Ting-Berreth, S., Tickle, C., Wolpert, L., and Chuong, C.M. (1998a) Local inhibitory action of BMPs and their relationships with activators in feather formation: implications for periodic patterning. *Dev Biol* 196:11-23.
- Jung, H.S., Francis-West, P.H., Widelitz, R.B., Jiang, T.X., Ting-Berreth, S., Tickle, C., Wolpert, L., and Chuong, C.M. (1998b) Local inhibitory action of BMPs and their relationships with activators in feather formation: implications for periodic patterning. *Dev Biol* 196:11-23.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Collignon, J., Lovell-Badge, R., and Kondoh, H. (1998) Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development* 125:2521-2532.
- Kaur, P. (2006) Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential. *The Journal of investigative dermatology* 126:1450-1458.
- Kawakami, K., Sato, S., Ozaki, H., and Ikeda, K. (2000) Six family genes--structure and function as transcription factors and their roles in development. *Bioessays* 22:616-626.
- Kenyon, K.R., and Tseng, S.C. (1989) Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 96:709-722; discussion 722-703.
- Kinoshita, S., Adachi, W., Sotozono, C., Nishida, K., Yokoi, N., Quantock, A.J., and Okubo, K. (2001) Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Progress in retinal and eye research* 20:639-673.
- Kinoshita, S., Friend, J., Kiorpes, T.C., and Thoft, R.A. (1983) Keratin-like proteins in corneal and conjunctival epithelium are different. *Investigative ophthalmology & visual science* 24:577-581.
- Knecht, A.K., and Bronner-Fraser, M. (2002) Induction of the neural crest: a multigene process. *Nat Rev Genet* 3:453-461.
- Koc, O.N., Day, J., Nieder, M., Gerson, S.L., Lazarus, H.M., and Krivit, W. (2002) Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone marrow transplantation* 30:215-222.
- Koc, O.N., Gerson, S.L., Cooper, B.W., Dyhouse, S.M., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., and Lazarus, H.M. (2000) Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 18:307-316.
- Kolega, J., Manabe, M., and Sun, T.T. (1989) Basement membrane heterogeneity and variation in corneal epithelial differentiation. *Differentiation; research in biological diversity* 42:54-63.

- Kos, R., Reedy, M.V., Johnson, R.L., and Erickson, C.A. (2001) The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. *Development* 128:1467-1479.
- Kroeber, M., Davis, N., Holzmann, S., Kritzenberger, M., Shelah-Goraly, M., Ofri, R., Ashery-Padan, R., and Tamm, E.R. Reduced expression of Pax6 in lens and cornea of mutant mice leads to failure of chamber angle development and juvenile glaucoma. *Human molecular genetics* 19:3332-3342.
- Krull, C.E., Lansford, R., Gale, N.W., Collazo, A., Marcelle, C., Yancopoulos, G.D., Fraser, S.E., and Bronner-Fraser, M. (1997) Interactions of Eph-related receptors and ligands confer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. *Curr Biol* 7:571-580.
- Kruse, F.E. (1994) Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye (London, England)* 8 ( Pt 2):170-183.
- Kruse, F.E., Chen, J.J., Tsai, R.J., and Tseng, S.C. (1990) Conjunctival transdifferentiation is due to the incomplete removal of limbal basal epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science* 31:1903-1913.
- Kulesa, H., Turk, G., and Hogan, B.L. (2000) Inhibition of Bmp signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle. *Embo J* 19:6664-6674.
- Kumar, A., Eby, M.T., Sinha, S., Jasmin, A., and Chaudhary, P.M. (2001) The ectodermal dysplasia receptor activates the nuclear factor-kappaB, JNK, and cell death pathways and binds to ectodysplasin A. *The Journal of biological chemistry* 276:2668-2677.
- Kurpakus-Wheat, M., Kernacki, K.A., and Hazlett, L.D. (2001) Maintaining corneal integrity how the "window" stays clear. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 36:185-259.
- Kurpakus, M.A., Maniaci, M.T., and Esco, M. (1994) Expression of keratins K12, K4 and K14 during development of ocular surface epithelium. *Current eye research* 13:805-814.
- LaBonne, C., and Bronner-Fraser, M. (1998) Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model. *Development* 125:2403-2414.
- Ladher, R.K., Anakwe, K.U., Gurney, A.L., Schoenwolf, G.C., and Francis-West, P.H. (2000) Identification of synergistic signals initiating inner ear development. *Science* 290:1965-1967.
- Lajtha, L.G. (1979) Stem cell concepts. *Differentiation; research in biological diversity* 14:23-34.
- LaMantia, A.S., Bhasin, N., Rhodes, K., and Heemskerk, J. (2000) Mesenchymal/epithelial induction mediates olfactory pathway formation. *Neuron* 28:411-425.
- Laurikkala, J., Mikkola, M., Mustonen, T., Aberg, T., Koppinen, P., Pispá, J., Nieminen, P., Galceran, J., Grosschedl, R., and Thesleff, I. (2001) TNF signaling via the ligand-receptor pair ectodysplasin and edar controls the function of epithelial signaling centers and is regulated by Wnt and activin during tooth organogenesis. *Dev Biol* 229:443-455.
- Laurikkala, J., Pispá, J., Jung, H.S., Nieminen, P., Mikkola, M., Wang, X., Saarialho-Kere, U., Galceran, J., Grosschedl, R., and Thesleff, I. (2002) Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodysplasin and its receptor Edar. *Development* 129:2541-2553.
- Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Gotherstrom, C., Hassan, M., Uzunel, M., and Ringden, O. (2004) Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363:1439-1441.
- Le Douarin, N.M., Ziller, C., and Couly, G.F. (1993) Patterning of neural crest derivatives in the avian embryo: in vivo and in vitro studies. *Dev Biol* 159:24-49.
- Li, C., Guo, H., Xu, X., Weinberg, W., and Deng, C.X. (2001) Fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) plays an important role in eyelid and skin formation and patterning. *Dev Dyn* 222:471-483.
- Linsenmayer, T.F. (1972) Control of integumentary patterns in the chick. *Dev Biol* 27:244-271.
- Linsenmayer, T.F., Fitch, J.M., Gordon, M.K., Cai, C.X., Igoe, F., Marchant, J.K., and Birk, D.E. (1998) Development and roles of collagenous matrices in the embryonic avian cornea. *Prog Retin Eye Res* 17:231-265.
- Lopez-Rios, J., Tessmar, K., Loosli, F., Wittbrodt, J., and Bovolenta, P. (2003) Six3 and Six6 activity is modulated by members of the groucho family. *Development* 130:185-195.

- Lovicu, F.J., Kao, W.W., and Overbeek, P.A. (1999) Ectopic gland induction by lens-specific expression of keratinocyte growth factor (FGF-7) in transgenic mice. *Mechanisms of development* 88:43-53.
- Lovicu, F.J., and McAvoy, J.W. (2005) Growth factor regulation of lens development. *Dev Biol* 280:1-14.
- Lucas, A.M., and Stettenheim, P.R. (1972) Avian anatomy integument. Part II.
- Lwigale, P.Y., and Bronner-Fraser, M. (2009) Semaphorin3A/neuropilin-1 signaling acts as a molecular switch regulating neural crest migration during cornea development. *Dev Biol* 336:257-265.
- Lyle, S., Christofidou-Solomidou, M., Liu, Y., Elder, D.E., Albelda, S., and Cotsarelis, G. (1998) The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. *Journal of cell science* 111 ( Pt 21):3179-3188.
- Mackenzie, I.C. (1997) Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure. *J Invest Dermatol* 109:377-383.
- Majo, F., Rochat, A., Nicolas, M., Jaoude, G.A., and Barrandon, Y. (2008) Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature* 456:250-254.
- Maroon, H., Walshe, J., Mahmood, R., Kiefer, P., Dickson, C., and Mason, I. (2002) Fgf3 and Fgf8 are required together for formation of the otic placode and vesicle. *Development* 129:2099-2108.
- Martin, K., and Groves, A.K. (2006) Competence of cranial ectoderm to respond to Fgf signaling suggests a two-step model of otic placode induction. *Development* 133:877-887.
- Matic, M., Petrov, I.N., Chen, S., Wang, C., Dimitrijevic, S.D., and Wolosin, J.M. (1997) Stem cells of the corneal epithelium lack connexins and metabolite transfer capacity. *Differentiation* 61:251-260.
- Matt, N., Dupe, V., Garnier, J.M., Dennefeld, C., Chambon, P., Mark, M., and Ghyselinck, N.B. (2005) Retinoic acid-dependent eye morphogenesis is orchestrated by neural crest cells. *Development* 132:4789-4800.
- Mauger, A., and Sengel, P. (1970) [The spinal pterygia of the chick embryo: presumptive area, arrangement and embryonic development]. *Dev Biol* 23:609-633.
- Mayerson, P.L., and Fallon, J.F. (1985) The spatial pattern and temporal sequence in which feather germs arise in the white Leghorn chick embryo. *Developmental biology* 109:259-267.
- McCrea, P.D., Turck, C.W., and Gumbiner, B. (1991) A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science (New York, N.Y)* 254:1359-1361.
- McElwee, K.J., Kissling, S., Wenzel, E., Huth, A., and Hoffmann, R. (2003) Cultured peribulbar dermal sheath cells can induce hair follicle development and contribute to the dermal sheath and dermal papilla. *The Journal of investigative dermatology* 121:1267-1275.
- McGowan, S.L., Edelhauser, H.F., Pfister, R.R., and Whitehart, D.R. (2007) Stem cell markers in the human posterior limbus and corneal endothelium of unwounded and wounded corneas. *Molecular vision* 13:1984-2000.
- McGrew, L.L., Hoppler, S., and Moon, R.T. (1997) Wnt and FGF pathways cooperatively pattern anteroposterior neural ectoderm in *Xenopus*. *Mech Dev* 69:105-114.
- McKinnell, I.W., Turmaine, M., and Patel, K. (2004) Sonic Hedgehog functions by localizing the region of proliferation in early developing feather buds. *Developmental biology* 272:76-88.
- Mehler, M.F., Mabie, P.C., Zhang, D., and Kessler, J.A. (1997) Bone morphogenetic proteins in the nervous system. *Trends in neurosciences* 20:309-317.
- Merrill, B.J., Gat, U., DasGupta, R., and Fuchs, E. (2001) Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev* 15:1688-1705.
- Mic, F.A., Molotkov, A., Molotkova, N., and Duester, G. (2004) Raldh2 expression in optic vesicle generates a retinoic acid signal needed for invagination of retina during optic cup formation. *Dev Dyn* 231:270-277.

- Michon, F., Charveron, M., and Dhouailly, D. (2007) Dermal condensation formation in the chick embryo: requirement for integrin engagement and subsequent stabilization by a possible notch/integrin interaction. *Dev Dyn* 236:755-768.
- Mikkola, M.L., Pispas, J., Pekkanen, M., Paulin, L., Nieminen, P., Kere, J., and Thesleff, I. (1999) Ectodysplasin, a protein required for epithelial morphogenesis, is a novel TNF homologue and promotes cell-matrix adhesion. *Mech Dev* 88:133-146.
- Mishima, N., and Tomarev, S. (1998) Chicken Eyes absent 2 gene: isolation and expression pattern during development. *Int J Dev Biol* 42:1109-1115.
- Mizrak, D., Brittan, M., and Alison, M.R. (2008) CD133: molecule of the moment. *The Journal of pathology* 214:3-9.
- Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., and Krepler, R. (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11-24.
- Molotkov, A., Molotkova, N., and Duester, G. (2006) Retinoic acid guides eye morphogenetic movements via paracrine signaling but is unnecessary for retinal dorsoventral patterning. *Development* 133:1901-1910.
- Morgan, B.A., Orkin, R.W., Noramly, S., and Perez, A. (1998) Stage-specific effects of sonic hedgehog expression in the epidermis. *Dev Biol* 201:1-12.
- Morris, R.J., Liu, Y., Marles, L., Yang, Z., Trempus, C., Li, S., Lin, J.S., Sawicki, J.A., and Cotsarelis, G. (2004) Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nature biotechnology* 22:411-417.
- Morris, R.J., and Potten, C.S. (1994) Slowly cycling (label-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells in vitro. *Cell proliferation* 27:279-289.
- Mukhopadhyay, M., Gorivodsky, M., Shtrom, S., Grinberg, A., Niehrs, C., Morasso, M.I., and Westphal, H. (2006) Dkk2 plays an essential role in the corneal fate of the ocular surface epithelium. *Development* 133:2149-2154.
- Newgreen, D.F., and Erickson, C.A. (1986) The migration of neural crest cells. *International review of cytology* 103:89-145.
- Nguyen, M., and Arnheiter, H. (2000) Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF. *Development* 127:3581-3591.
- Nicolas, M., Wolfer, A., Raj, K., Kummer, J.A., Mill, P., van Noort, M., Hui, C.C., Clevers, H., Dotto, G.P., and Radtke, F. (2003) Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nature genetics* 33:416-421.
- Niemann, C., Owens, D.M., Hulsken, J., Birchmeier, W., and Watt, F.M. (2002) Expression of DeltaN $\Delta$ Lef1 in mouse epidermis results in differentiation of hair follicles into squamous epidermal cysts and formation of skin tumours. *Development (Cambridge, England)* 129:95-109.
- Nishida, T., and Tanaka, T. (1996) Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Current opinion in ophthalmology* 7:2-11.
- Nishida, T., Yasumoto, K., Otori, T., and Desaki, J. (1988) The network structure of corneal fibroblasts in the rat as revealed by scanning electron microscopy. *Investigative ophthalmology & visual science* 29:1887-1890.
- Nohno, T., Kawakami, Y., Ohuchi, H., Fujiwara, A., Yoshioka, H., and Noji, S. (1995a) Involvement of the Sonic hedgehog gene in chick feather formation. *Biochem Biophys Res Commun* 206:33-39.
- Nohno, T., Kawakami, Y., Ohuchi, H., Fujiwara, A., Yoshioka, H., and Noji, S. (1995b) Involvement of the Sonic hedgehog gene in chick feather formation. *Biochemical and biophysical research communications* 206:33-39.
- Noramly, S., Freeman, A., and Morgan, B.A. (1999) beta-catenin signaling can initiate feather bud development. *Development* 126:3509-3521.
- Noramly, S., and Morgan, B.A. (1998a) BMPs mediate lateral inhibition at successive stages in feather tract development. *Development* 125:3775-3787.
- Noramly, S., and Morgan, B.A. (1998b) BMPs mediate lateral inhibition at successive stages in feather tract development. *Development* 125:3775-3787.

- Noveen, A., Jiang, T.X., Ting-Berreth, S.A., and Chuong, C.M. (1995) Homeobox genes *Msx-1* and *Msx-2* are associated with induction and growth of skin appendages. *J Invest Dermatol* 104:711-719.
- Novel, G. (1973) Feather pattern stability and reorganization in cultured skin. *J Embryol Exp Morphol* 30:605-633.
- Nowak, J.A., Polak, L., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2008) Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. *Cell stem cell* 3:33-43.
- Nusse, R. (2001) Developmental biology. Making head or tail of Dickkopf. *Nature* 411:255-256.
- Ohyama, M., Terunuma, A., Tock, C.L., Radonovich, M.F., Pise-Masison, C.A., Hopping, S.B., Brady, J.N., Udey, M.C., and Vogel, J.C. (2006a) Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *The Journal of clinical investigation* 116:249-260.
- Ohyama, T., Mohamed, O.A., Taketo, M.M., Dufort, D., and Groves, A.K. (2006b) Wnt signals mediate a fate decision between otic placode and epidermis. *Development (Cambridge, England)* 133:865-875.
- Oliver, R.F. (1966) Whisker growth after removal of the dermal papilla and lengths of follicle in the hooded rat. *J Embryol Exp Morphol* 15:331-347.
- Olivera-Martinez, I., Coltey, M., Dhouailly, D., and Pourquie, O. (2000) Mediolateral somitic origin of ribs and dermis determined by quail-chick chimeras. *Development* 127:4611-4617.
- Olivera-Martinez, I., Missier, S., Fraboulet, S., Thelu, J., and Dhouailly, D. (2002) Differential regulation of the chick dorsal thoracic dermal progenitors from the medial dermomyotome. *Development* 129:4763-4772.
- Oshima, H., Rochat, A., Kedzia, C., Kobayashi, K., and Barrandon, Y. (2001) Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* 104:233-245.
- Pajooohesh-Ganji, A., Pal-Ghosh, S., Simmens, S.J., and Stepp, M.A. (2006) Integrins in slow-cycling corneal epithelial cells at the limbus in the mouse. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24:1075-1086.
- Patel, K., Makarenkova, H., and Jung, H.S. (1999a) The role of long range, local and direct signalling molecules during chick feather bud development involving the BMPs, follistatin and the Eph receptor tyrosine kinase Eph-A4. *Mech Dev* 86:51-62.
- Patel, K., Makarenkova, H., and Jung, H.S. (1999b) The role of long range, local and direct signalling molecules during chick feather bud development involving the BMPs, follistatin and the Eph receptor tyrosine kinase Eph-A4. *Mech Dev* 86:51-62.
- Paus, R., Muller-Rover, S., Van Der Veen, C., Maurer, M., Eichmuller, S., Ling, G., Hofmann, U., Foitzik, K., Mecklenburg, L., and Handjiski, B. (1999) A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol* 113:523-532.
- Pearnton, D.J., Yang, Y., and Dhouailly, D. (2005) Transdifferentiation of corneal epithelium into epidermis occurs by means of a multistep process triggered by dermal developmental signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3714-3719.
- Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin, D., McKeon, F., and De Luca, M. (2001) p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:3156-3161.
- Pellegrini, G., Golisano, O., Paterna, P., Lambiase, A., Bonini, S., Rama, P., and De Luca, M. (1999) Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *The Journal of cell biology* 145:769-782.
- Perron, M., Boy, S., Amato, M.A., Viczian, A., Koebernick, K., Pieler, T., and Harris, W.A. (2003) A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation. *Development* 130:1565-1577.
- Phillips, B.T., Bolding, K., and Riley, B.B. (2001) Zebrafish *fgf3* and *fgf8* encode redundant functions required for otic placode induction. *Developmental biology* 235:351-365.
- Pinheiro, M., and Freire-Maia, N. (1994) Ectodermal dysplasias: a clinical classification and a causal review. *American journal of medical genetics* 53:153-162.



- Pittack, C., Grunwald, G.B., and Reh, T.A. (1997) Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos. *Development* 124:805-816.
- Porter, F.D., Drago, J., Xu, Y., Cheema, S.S., Wassif, C., Huang, S.P., Lee, E., Grinberg, A., Massalas, J.S., Bodine, D., Alt, F., and Westphal, H. (1997) Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development* 124:2935-2944.
- Poswillo, D.E. (1977) The embryological basis of craniofacial dysplasias. *Postgraduate medical journal* 53:517-524.
- Potten, C.S. (1974) The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. *Cell and tissue kinetics* 7:77-88.
- Potten, C.S. (1981) Cell replacement in epidermis (keratopoiesis) via discrete units of proliferation. *International review of cytology* 69:271-318.
- Potten, C.S., and Hendry, J.H. (1973) Letter: Clonogenic cells and stem cells in epidermis. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine* 24:537-540.
- Potten, C.S., Kovacs, L., and Hamilton, E. (1974) Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. *Cell and tissue kinetics* 7:271-283.
- Potten, C.S., and Morris, R.J. (1988) Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci Suppl* 10:45-62.
- Potten, C.S., Wichmann, H.E., Loeffler, M., Dobek, K., and Major, D. (1982) Evidence for discrete cell kinetic subpopulations in mouse epidermis based on mathematical analysis. *Cell and tissue kinetics* 15:305-329.
- Puangsricharn, V., and Tseng, S.C. (1995) Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 102:1476-1485.
- Pummila, M., Fliniaux, I., Jaatinen, R., James, M.J., Laurikkala, J., Schneider, P., Thesleff, I., and Mikkola, M.L. (2007) Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression. *Development* 134:117-125.
- Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U., and Gehring, W.J. (1994) Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science* 265:785-789.
- Rebay, I., Silver, S.J., and Tootle, T.L. (2005) New vision from Eyes absent: transcription factors as enzymes. *Trends Genet* 21:163-171.
- Reddy, S., Andl, T., Bagasra, A., Lu, M.M., Epstein, D.J., Morrisey, E.E., and Millar, S.E. (2001) Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis. *Mech Dev* 107:69-82.
- Rendl, M., Polak, L., and Fuchs, E. (2008) BMP signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties. *Genes Dev* 22:543-557.
- Reynolds, A.J., and Jahoda, C.A. (1992) Cultured dermal papilla cells induce follicle formation and hair growth by transdifferentiation of an adult epidermis. *Development* 115:587-593.
- Reynolds, A.J., Lawrence, C., Cserhalmi-Friedman, P.B., Christiano, A.M., and Jahoda, C.A. (1999) Trans-gender induction of hair follicles. *Nature* 402:33-34.
- Reza, H.M., and Yasuda, K. (2004) Lens differentiation and crystallin regulation: a chick model. *Int J Dev Biol* 48:805-817.
- Robinson, M.L. (2006) An essential role for FGF receptor signaling in lens development. *Seminars in cell & developmental biology* 17:726-740.
- Rouzankina, I., Abate-Shen, C., and Niswander, L. (2004) Dlx genes integrate positive and negative signals during feather bud development. *Developmental biology* 265:219-233.
- Sasai, N., Mizuseki, K., and Sasai, Y. (2001) Requirement of FoxD3-class signaling for neural crest determination in *Xenopus*. *Development* 128:2525-2536.
- Scaal, M., Prols, F., Fuchtbauer, E.M., Patel, K., Hornik, C., Kohler, T., Christ, B., and Brand-Saberi, B. (2002) BMPs induce dermal markers and ectopic feather tracts. *Mech Dev* 110:51-60.

- Schedl, A., Ross, A., Lee, M., Engelkamp, D., Rashbass, P., van Heyningen, V., and Hastie, N.D. (1996) Influence of PAX6 gene dosage on development: overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell* 86:71-82.
- Schermer, A., Galvin, S., and Sun, T.T. (1986) Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103:49-62.
- Schofield, R. (1983) The stem cell system. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 37:375-380.
- Schwab, I.R., Reyes, M., and Isseroff, R.R. (2000) Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea* 19:421-426.
- Sengel, P. (1976) Morphogenesis of skin. Cambridge university press.
- Sengel, P., and Mauger, A. (1976) Peridermal cell patterning in the feather-forming skin of the chick embryo. *Developmental biology* 51:166-171.
- Sengel, P., and Rusaouën, M. (1969) Modifications ultrastructurales au cours de l'histogenèse de la peau chez l'embryon de Poulet. *Archs Anat microsc Morphol exp* 58:77-96.
- Shapiro, M.S., Friend, J., and Thoft, R.A. (1981) Corneal re-epithelialization from the conjunctiva. *Investigative ophthalmology & visual science* 21:135-142.
- Shiraishi, A., Converse, R.L., Liu, C.Y., Zhou, F., Kao, C.W., and Kao, W.W. (1998) Identification of the cornea-specific keratin 12 promoter by in vivo particle-mediated gene transfer. *Investigative ophthalmology & visual science* 39:2554-2561.
- Song, H., Wang, Y., and Goetinck, P.F. (1996) Fibroblast growth factor 2 can replace ectodermal signaling for feather development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10246-10249.
- Spemann, H. (1901) Über Korrelationen in der Entwicklung des Auges. *Verh. Anat. Ges.* 15:61-79.
- Srivastava, A.K., Pispas, J., Hartung, A.J., Du, Y., Ezer, S., Jenks, T., Shimada, T., Pekkanen, M., Mikkola, M.L., Ko, M.S., Thesleff, I., Kere, J., and Schlessinger, D. (1997) The Tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:13069-13074.
- Stenn, K.S., and Paus, R. (2001) Controls of hair follicle cycling. *Physiological reviews* 81:449-494.
- Stepp, M.A., Zhu, L., Sheppard, D., and Cranfill, R.L. (1995) Localized distribution of alpha 9 integrin in the cornea and changes in expression during corneal epithelial cell differentiation. *J Histochem Cytochem* 43:353-362.
- Stern, C.D., Yu, R.T., Kakizuka, A., Kintner, C.R., Mathews, L.S., Vale, W.W., Evans, R.M., and Umesono, K. (1995) Activin and its receptors during gastrulation and the later phases of mesoderm development in the chick embryo. *Dev Biol* 172:192-205.
- Streit, A. (2004) Early development of the cranial sensory nervous system: from a common field to individual placodes. *Dev Biol* 276:1-15.
- Sullivan, C.H., Braunstein, L., Hazard-Leonards, R.M., Holen, A.L., Samaha, F., Stephens, L., and Grainger, R.M. (2004) A re-examination of lens induction in chicken embryos: in vitro studies of early tissue interactions. *Int J Dev Biol* 48:771-782.
- Sullivan, J.A. (1972) Effect of epidermal rotation on orientation of scales in the chick. *Developmental biology* 28:176-182.
- Sun, S.K., Dee, C.T., Tripathi, V.B., Rengifo, A., Hirst, C.S., and Scotting, P.J. (2007) Epibranchial and otic placodes are induced by a common Fgf signal, but their subsequent development is independent. *Dev Biol* 303:675-686.
- Sun, T.T., Tseng, S.C., Huang, A.J., Cooper, D., Schermer, A., Lynch, M.H., Weiss, R., and Eichner, R. (1985) Monoclonal antibody studies of mammalian epithelial keratins: a review. *Annals of the New York Academy of Sciences* 455:307-329.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.

- Tani, H., Morris, R.J., and Kaur, P. (2000) Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10960-10965.
- Tanifuji-Terai, N., Terai, K., Hayashi, Y., Chikama, T., and Kao, W.W. (2006) Expression of keratin 12 and maturation of corneal epithelium during development and postnatal growth. *Investigative ophthalmology & visual science* 47:545-551.
- Thoft, R.A., and Friend, J. (1983) The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Investigative ophthalmology & visual science* 24:1442-1443.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
- Tobin, D.J., Gunin, A., Magerl, M., Handijski, B., and Paus, R. (2003) Plasticity and cytokinetic dynamics of the hair follicle mesenchyme: implications for hair growth control. *The Journal of investigative dermatology* 120:895-904.
- Trempus, C.S., Morris, R.J., Bortner, C.D., Cotsarelis, G., Faircloth, R.S., Reece, J.M., and Tennant, R.W. (2003) Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *The Journal of investigative dermatology* 120:501-511.
- Trousse, F., Esteve, P., and Bovolenta, P. (2001) Bmp4 mediates apoptotic cell death in the developing chick eye. *J Neurosci* 21:1292-1301.
- Tseng, S.C. (1989) Concept and application of limbal stem cells. *Eye (London, England)* 3 ( Pt 2):141-157.
- Tzahor, E., Kempf, H., Mootoosamy, R.C., Poon, A.C., Abzhanov, A., Tabin, C.J., Dietrich, S., and Lassar, A.B. (2003) Antagonists of Wnt and BMP signaling promote the formation of vertebrate head muscle. *Genes Dev* 17:3087-3099.
- Vendrell, V., Carnicero, E., Giraldez, F., Alonso, M.T., and Schimmang, T. (2000) Induction of inner ear fate by FGF3. *Development* 127:2011-2019.
- Viallet, J.P., Prin, F., Olivera-Martinez, I., Hirsinger, E., Pourquie, O., and Dhouailly, D. (1998a) Chick Delta-1 gene expression and the formation of the feather primordia. *Mech Dev* 72:159-168.
- Viallet, J.P., Prin, F., Olivera-Martinez, I., Hirsinger, E., Pourquie, O., and Dhouailly, D. (1998b) Chick Delta-1 gene expression and the formation of the feather primordia. *Mech Dev* 72:159-168.
- Vidal, V.P., Chaboissier, M.C., Lutzkendorf, S., Cotsarelis, G., Mill, P., Hui, C.C., Ortonne, N., Ortonne, J.P., and Schedl, A. (2005) Sox9 is essential for outer root sheath differentiation and the formation of the hair stem cell compartment. *Curr Biol* 15:1340-1351.
- Wang, B., Fallon, J.F., and Beachy, P.A. (2000) Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100:423-434.
- Wang, H.U., and Anderson, D.J. (1997) Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. *Neuron* 18:383-396.
- Wang, I.J., Carlson, E.C., Liu, C.Y., Kao, C.W., Hu, F.R., and Kao, W.W. (2002) Cis-regulatory elements of the mouse Krt1.12 gene. *Molecular vision* 8:94-101.
- Wang, Z., Ge, J., Huang, B., Gao, Q., Liu, B., Wang, L., Yu, L., Fan, Z., Lu, X., and Liu, J. (2005) Differentiation of embryonic stem cells into corneal epithelium. *Science in China* 48:471-480.
- Watanabe, K., Nishida, K., Yamato, M., Umemoto, T., Sumide, T., Yamamoto, K., Maeda, N., Watanabe, H., Okano, T., and Tano, Y. (2004) Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS letters* 565:6-10.
- Wei, Z.G., Wu, R.L., Lavker, R.M., and Sun, T.T. (1993) In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix, and palpebral conjunctival epithelia. Implications on conjunctival epithelial transdifferentiation and stem cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 34:1814-1828.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448:318-324.

- Wessel, H., Anderson, S., Fite, D., Halvas, E., Hempel, J., and SundarRaj, N. (1997) Type XII collagen contributes to diversities in human corneal and limbal extracellular matrices. *Investigative ophthalmology & visual science* 38:2408-2422.
- Wessells, N.K. (1965) Morphology and proliferation during early feather development. *Dev Biol* 12:131-153.
- Wessells, N.K., and Roessner, K.D. (1965) Nonproliferation in dermal condensations of mouse vibrissae and pelage hairs. *Dev Biol* 12:419-433.
- Whikehart, D.R., Parikh, C.H., Vaughn, A.V., Mishler, K., and Edelhauser, H.F. (2005) Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium. *Molecular vision* 11:816-824.
- Whitbread, L.A., and Powell, B.C. (1998) Expression of the intermediate filament keratin gene, K15, in the basal cell layers of epithelia and the hair follicle. *Experimental cell research* 244:448-459.
- Widelitz, R.B., Jiang, T.X., Chen, C.W., Stott, N.S., Jung, H.S., and Chuong, C.M. (1999) Wnt-7a in feather morphogenesis: involvement of anterior-posterior asymmetry and proximal-distal elongation demonstrated with an in vitro reconstitution model. *Development (Cambridge, England)* 126:2577-2587.
- Widelitz, R.B., Jiang, T.X., Noveen, A., Chen, C.W., and Chuong, C.M. (1996a) FGF induces new feather buds from developing avian skin. *J Invest Dermatol* 107:797-803.
- Widelitz, R.B., Jiang, T.X., Noveen, A., Chen, C.W., and Chuong, C.M. (1996b) FGF induces new feather buds from developing avian skin. *J Invest Dermatol* 107:797-803.
- Widelitz, R.B., Jiang, T.X., Noveen, A., Ting-Berreth, S.A., Yin, E., Jung, H.S., and Chuong, C.M. (1997) Molecular histology in skin appendage morphogenesis. *Microsc Res Tech* 38:452-465.
- Wu, Y., and Wu, P.Y. (2009) CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem cells and development* 18:1127-1134.
- Yan, M., Wang, L.C., Hymowitz, S.G., Schilbach, S., Lee, J., Goddard, A., de Vos, A.M., Gao, W.Q., and Dixit, V.M. (2000) Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. *Science* 290:523-527.
- Yang, Y., and Niswander, L. (1995) Interaction between the signaling molecules WNT7a and SHH during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning. *Cell* 80:939-947.
- Yoshida, S., Shimmura, S., Shimazaki, J., Shinozaki, N., and Tsubota, K. (2005) Serum-free spheroid culture of mouse corneal keratocytes. *Investigative ophthalmology & visual science* 46:1653-1658.
- Yue, Z., Jiang, T.X., Widelitz, R.B., and Chuong, C.M. (2005) Mapping stem cell activities in the feather follicle. *Nature* 438:1026-1029.
- Zhang, X., Friedman, A., Heaney, S., Purcell, P., and Maas, R.L. (2002) Meis homeoproteins directly regulate Pax6 during vertebrate lens morphogenesis. *Genes Dev* 16:2097-2107.
- Zhang, Y., Burgess, D., Overbeek, P.A., and Govindarajan, V. (2008) Dominant inhibition of lens placode formation in mice. *Developmental biology* 323:53-63.
- Zhang, Y., Overbeek, P.A., and Govindarajan, V. (2007) Perinatal ablation of the mouse lens causes multiple anterior chamber defects. *Molecular vision* 13:2289-2300.
- Zhu, C.C., Dyer, M.A., Uchikawa, M., Kondoh, H., Lagutin, O.V., and Oliver, G. (2002) Six3-mediated auto repression and eye development requires its interaction with members of the Groucho-related family of co-repressors. *Development* 129:2835-2849.
- Zieske, J.D. (1994) Perpetuation of stem cells in the eye. *Eye (London, England)* 8 ( Pt 2):163-169.
- Zieske, J.D., Bukusoglu, G., Yankauckas, M.A., Wasson, M.E., and Keutmann, H.T. (1992) Alpha-enolase is restricted to basal cells of stratified squamous epithelium. *Developmental biology* 151:18-26.





## RESUME

Le tégument est formé de deux tissus, un épithélium et un mésenchyme. Il comprend la peau et la cornée. Au niveau de la face, ces derniers ont une origine embryonnaire commune: ectoderme et cellules des crêtes neurales. J'ai tout d'abord contribué à la mise en évidence de l'acquisition par le derme embryonnaire de ses capacités inductrices sur l'épiderme, et de l'indépendance de la différenciation de l'épithélium cornéen vis-à-vis de son mésenchyme, le stroma. Mes travaux principaux ont été d'établir quelle était la signature moléculaire du programme cornéen, et à quel moment et comment ce programme est mis en place chez l'embryon. La comparaison des transcriptomes des cellules souches de la cornée à celui des cellules souches épidermiques chez la souris montre 3621 gènes communs et 1768 gènes cornéens propres, en plus de Pax6, le gène clé de l'œil, et de K12, la kératine type de la différenciation terminale de l'épithélium cornéen. La cornée résultant, selon un dogme ancien, d'une induction par le cristallin, j'ai effectué des expériences chez l'embryon de poulet de 2 jours afin de le vérifier. L'ablation chirurgicale de la placode cristallinienne ayant mis en évidence sa régénération, j'ai prévenu sa formation en électroporant Gremlin, un inhibiteur de BMP4, requis lors la spécification du cristallin par la vésicule optique. L'obtention d'œil sans cristallin mais avec un épithélium cornéen exprimant K12 montre que le programme cornéen s'effectue par défaut lorsque le programme cristallinien est interrompu. Cet arrêt se produit normalement à la périphérie de la placode cristallinienne qui s'invagine, lors de la migration des cellules des crêtes neurales, productrices de Gremlin. Les précurseurs de l'épithélium cornéen sont donc communs avec ceux du cristallin, qui sont connus pour se ségréger chez l'embryon lors de la formation du domaine préplacodal au stade neurula.

*Mots clés: épiderme, épithélium cornéen, cristallin, différenciation, Gremlin, Kératine 12.*

## SUMMARY

The integument includes skin and cornea, which are both formed by the association of an epithelium and a mesenchyme. In the face, they are coming from the same embryonic layers, ectoderm and neural crest cells. During the first year of my thesis, I contributed to understand the acquisition by the dermis of its inductive capacities on the epidermis, and demonstrate that the corneal epithelium differentiation is independent of its mesenchyme. My principal aim was about the corneal epithelium program, its molecular profile, and how and when this program is established during embryogenesis. Mouse microarrays comparing gene expression of corneal epithelium and hair follicle stem cells revealed that 3621 genes were co-expressed while 1768 genes were exclusively expressed in the cornea, including Pax6, the master regulator of eye, and K12, a keratin indicative of corneal-type differentiation. The current dogma is that the establishment of the corneal program is dependent on signals from the lens. In order to test this model, we decided to ablate the lens primordium of 2-day chick embryos. Firstly, I surgically ablated the lens placode, and showed that the lens was subsequently regenerated in every single case. Then, I was able to prevent lens placode formation by *in ovo* electroporation of Gremlin, which is a BMP inhibitor. Indeed, BMP4 is the main known signal which allows the final step of what is a multistep program in lens differentiation. The result of inhibiting BMP signaling was the development of small eyes without a lens, and the presence of a K12 positive corneal epithelium. During normal eye development, the lens formation program is interrupted at its periphery when it starts to invaginate, by the migration of neural crest cells that express Gremlin. Altogether, I have shown that the lens and cornea both originate from common precursor cells that are delineated in the preplacodal domain at the neurula stage, and that the corneal program is the over-riding default program.

*Keywords: epidermis, corneal epithelium, lens, differentiation, Gremlin, Keratin 12.*