

Aspects histologiques et ultrastructuraux de la mort cellulaire programmée et induite par deux agents tératogènes dans les arcs viscéraux de l'embryon de souris

Histologic and ultrastructural features of cell death both physiological and induced by two different teratogens in branchial arches of mouse embryo

N. Vanmuylder¹, L. Evrard¹, R. Glineur¹, I. Salmon², J. Gashegu¹, M. Rooze¹ et S. Louryan¹

¹Laboratoire d'Anatomie et Embryologie, Faculté de Médecine, U.L.B.,

²Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Erasme, U.L.B.

RESUME

But du travail : observer et comparer les processus de mort cellulaire physiologique et associés à l'administration de deux agents tératogènes distincts (irradiation et administration d'acide rétinoïque) au sein du mésectoderme céphalique. **Matériel et méthodes :** souris irradiées : 2 Gy sont administrés à 9 jours de gestation. Acide rétinoïque : 60 mg/kg sont administrés par gavage à 8 ou 9 jours de gestation. Les embryons sont prélevés à 9 - 9,5 et 10 jours. Des embryons témoins sont recueillis à 9 - 9,5 et 10 jours. Des coupes semi-fines sont préparées, et des coupes ultra-fines sont observées au microscope électronique à transmission.

Résultats : le processus dominant demeure l'apoptose ; celle-ci est en nette augmentation dans les deux modèles tératologiques par rapport aux embryons témoins. Toutefois, un processus d'autophagie semble accompagner l'administration d'acide rétinoïque, tandis que l'irradiation provoque un processus marginal de nécrose.

Conclusion : si le processus commun de base s'assimile à l'apoptose, il est néanmoins possible de différencier les deux modèles par les remaniements plus marginaux qu'ils entraînent. Ces différences pourraient s'expliquer par les modes d'action spécifiques des deux agents : réaction ligand-récepteurs et perturbation de la régulation Hox dans le cas de l'acide rétinoïque, atteinte directe de l'ADN et vagues massives de mort cellulaire après irradiation. Du reste, les malformations observées ultérieurement sont différentes, ce qui s'explique partiellement par une atteinte différentielle de diverses sous-populations cellulaires.

Rev Med Brux 2004 ; 25 : 14-20

ABSTRACT

Aim of the study : to observe and compare cell death process both physiological and associated with the administration of two different teratogens (irradiation and retinoic acid) inside cephalic mesectoderm.

Material and methods : irradiated mice : 2 Gy were administered to E 9 embryos. Retinoic acid : 60 mg/kg were gave to E 8 or E 9 embryos. E 9 - 9,5 and E 10 embryos were removed. E 9 - E 9,5 and E 10 control specimens were collected. We used semi-thin sections and ultra-thin sections observed with transmission electron microscope. **Results :** the major process is apoptosis, which is increased in experimental embryos compared to control specimens. However, autophagy was observed in retinoic acid-treated embryos, while necrosis can rarely occurs after irradiation.

Conclusion : if the common process seems to be apoptosis, both teratological models differs owing to their respective secondary features. These differences should be explained by the specific pathogenesis of both teratological agents : ligand-receptor reaction and Hox system disruption in retinoic acid administration, direct aggression against DNA and diffuse cell death process following irradiation. Furthermore, congenital malformations induced by these teratogens are quite different. This can be partially explained by a specific blow of different cellular subpopulations.

Rev Med Brux 2004 ; 25 : 14-20

Key words : mouse, embryo, branchial arches, neural crest, retinoic acid, irradiation, apoptosis, cell death

INTRODUCTION

Depuis les travaux de Glücksmann¹, d'Illies^{2,3}, de Liu-Bin et Milaire⁴ et de Sulik et al⁵, le rôle joué par le phénomène de " mort cellulaire programmée " au cours de l'embryogenèse des vertébrés est de mieux en mieux connu et pris en considération (synthèse dans la référence 6). De nombreux systèmes se caractérisent par un intense processus de mort cellulaire " programmée " : ainsi le jeune bourgeon de membre, les espaces interdigitaux, les somites, le bourgeon caudal se caractérisent-ils par des vagues de morts cellulaires " morphogènes ", dont le rôle est bien établi actuellement.

Dans la sphère céphalique, les coulées de cellules méséctodermiques des arcs viscéraux (contenant majoritairement des cellules issues des crêtes neurales céphaliques et des microplacodes épibranchiales) contiennent des foyers de mort cellulaire programmée, qui ont fait l'objet de cartographies spatio-temporelles détaillées⁷.

Il est par ailleurs bien établi que diverses agressions tératologiques sont en mesure d'entraîner une extension en taille ou en intensité de ces foyers, ou plus simplement d'en faire apparaître *de novo* dans des zones habituellement épargnées par ce processus.

Ainsi, l'administration de rétinoïdes entraîne-t-elle une nette augmentation en densité et en extension des foyers de mort cellulaire présents dans les deux premiers arcs branchiaux^{5,7-9}. Le mécanisme en jeu a fait l'objet de nombreuses interprétations ; une rostralisation de l'expression de certains gènes du groupe Hox, ainsi qu'une induction du gène MSX2, qui agit sur le processus d'apoptose, ont été invoquées (synthèse dans la référence 10). A l'inverse, l'irradiation suscite un processus très diffus et peu spécifique de mort cellulaire dans l'ensemble des ébauches céphaliques¹¹.

Parallèlement à ces observations, la notion de " mort cellulaire programmée " a fait l'objet de considérations plus nuancées. Par opposition au processus devenu classique de nécrose est apparue la notion d'apoptose, véritable processus " actif " de mort cellulaire mettant en jeu le métabolisme de la cellule, et dont les aspects cytologiques sont bien connus maintenant (synthèse dans la référence 12). Diverses observations relatives aux modèles de " mort cellulaire programmée " chez l'embryon, ainsi qu'à leur majoration induite par divers tératogènes, tendent à démontrer que le processus d'apoptose prédomine chez l'embryon, et que la nécrose est exceptionnelle. Diverses techniques histochimiques permettent d'observer ces foyers d'apoptose : coloration supra-vitale au bleu de Nil, Feulgen, pyronine-vert de méthyle, méthode TUNEL, expression de la protéine de choc thermique HSP 110^{9,13}, et même la révélation de l'antigène de prolifération Ki 67¹⁴. L'objectif du présent travail est de préciser la morphologie générale et surtout l'ultrastructure des cellules impliquées dans le processus de mort cellulaire chez des embryons normaux et d'autres sou-

mis à l'action de deux agents tératogènes : l'acide all-trans rétinoïque et l'irradiation, aux fins de préciser les contributions respectives de l'apoptose et de la nécrose dans le processus de mort cellulaire.

MATERIEL ET METHODES

Administration d'acide rétinoïque

Le modèle implique l'administration par gavage de 60 mg/kg d'acide all-trans rétinoïque à 8 ou à 9 jours de gestation, chez des souris gestantes de race NMRI. Ce protocole a été validé car il génère des malformations crânio-faciales évoquant la dysostose mandibulo-faciale et il majore le processus de mort cellulaire dans les deux premiers arcs viscéraux⁹. Les embryons sont prélevés 4, 12 et 24 heures plus tard.

Irradiation

Une dose de 2 Gy est administrée à des souris gestantes de 9 jours, selon un protocole décrit antérieurement¹¹. Si la grossesse est poursuivie, l'agression se solde par des malformations centro-faciales évoquant quelque peu le syndrome de Crouzon. Des morts cellulaires disséminées sont observées en grande quantité dans le système nerveux et les bourgeons faciaux.

Collecte des embryons et réalisation des coupes

Les embryons destinés à faire l'objet des colorations de Feulgen ou d'Unna-Brachet (pyronine-vert de méthyle) ont été fixés dans le liquide de Serra. Des coupes à la paraffine de 5 µm ont été pratiquées (protocole détaillé dans la référence 13).

Les embryons destinés aux coupes semi-fines et à la microscopie électronique ont été fixés à la glutaraldéhyde, rincés dans le tampon cacodylate, et post-fixés dans le tétr oxyde d'osmium. Ils ont été enrobés dans une résine époxy. Des coupes semi-fines ont été obtenues à l'aide d'un ultratome 2088-LKB, et ont été colorées au bleu de toluidine 0,5 %-borax 1 % à chaud¹³. Pour la microscopie électronique à transmission, des coupes ultra-fines ont été réalisées. Les coupes inférieures à 1 µm ont été obtenues à l'aide d'un couteau diamanté. Les coupes ont été placées sur des grilles, qui furent immergées dans du Reynolds pendant 15 minutes. Le microscope électronique utilisé est un Philips EM.400.T.

Toutes les coupes ont été pratiquées dans un plan transversal parallèle à l'axe des arcs viscéraux (Figure 1B). Des embryons témoins ont bénéficié du même traitement histologique que les embryons traités.

RESULTATS

Embryons témoins

Les embryons témoins de 9 et 10 jours présentent de nombreuses cellules affectées des signes de mort cellulaire au sein des coulées méséctodermiques

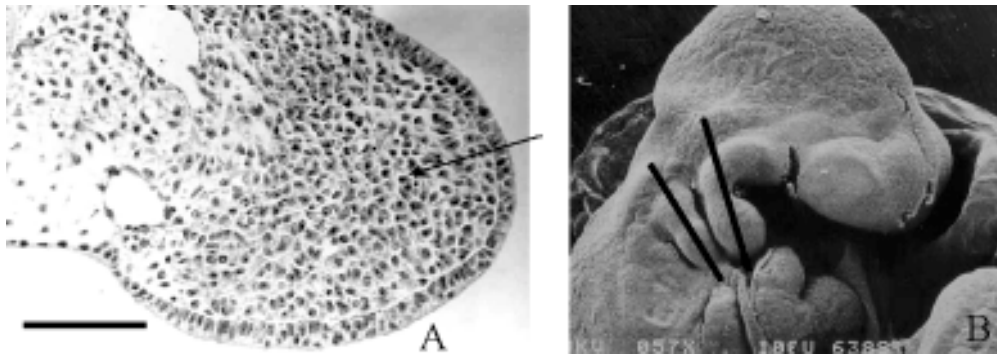


Figure 1 : A : Coupe en paraffine colorée au Feulgen pratiquée dans le premier arc branchial d'un embryon témoin de 9,5 jours, démontrant de nombreuses cellules affectées par des signes de mort cellulaire évoquant l'apoptose (essentiellement à ce grossissement la présence de corps apoptotiques) (flèche) ; B : Image tridimensionnelle d'un embryon de souris de 9 jours obtenue à l'aide du microscope électronique à balayage. Les lignes noires matérialisent les plans correspondant aux coupes de microscopie optique des Figures 1, 2, 5, 6 (arc 1) et 11 (arc 2) (échelle = 100 µm).

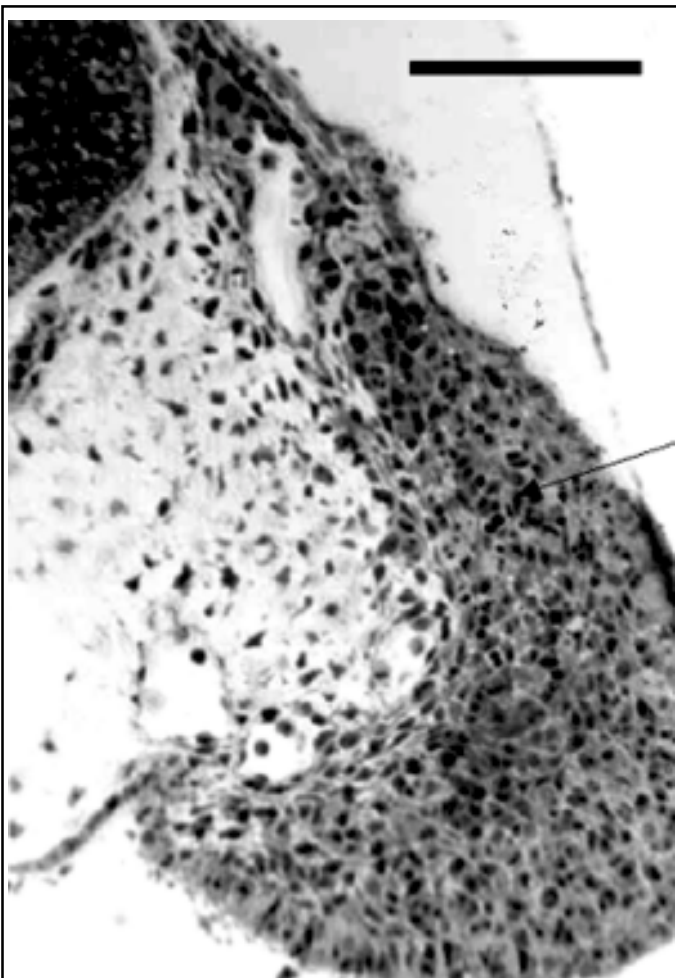


Figure 2 : Coupe semi-fine réalisée dans les mêmes conditions que la Figure 1, et démontrant également de nombreuses cellules affectées par le processus de mort cellulaire programmée (échelle = 100 µm).

des deux premiers arcs viscéraux (Figures 1 et 2) ainsi que dans l'otocyste. Elles sont parfaitement identifiables sur les coupes en paraffine colorées au Feulgen et sur les semi-fines. Les images réalisées à l'aide du microscope électronique en démontrent clairement la nature apoptotique. Les différentes phases de l'apoptose sont repérables, depuis la margination de l'ADN jusqu'à la formation des corps apoptotiques (Fi-

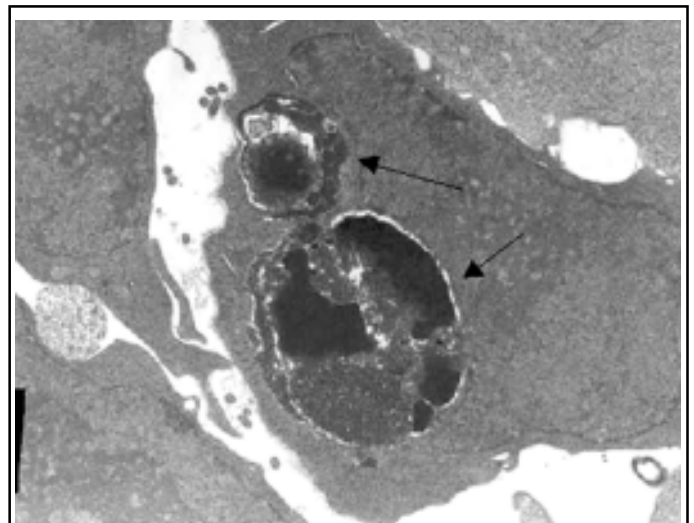


Figure 3 : Micrographie électronique pratiquée chez un embryon témoin de 9,5 jours au sein de l'arc mandibulaire. Une cellule présente deux volumineux corps d'apoptose (flèches) (x 8.000).

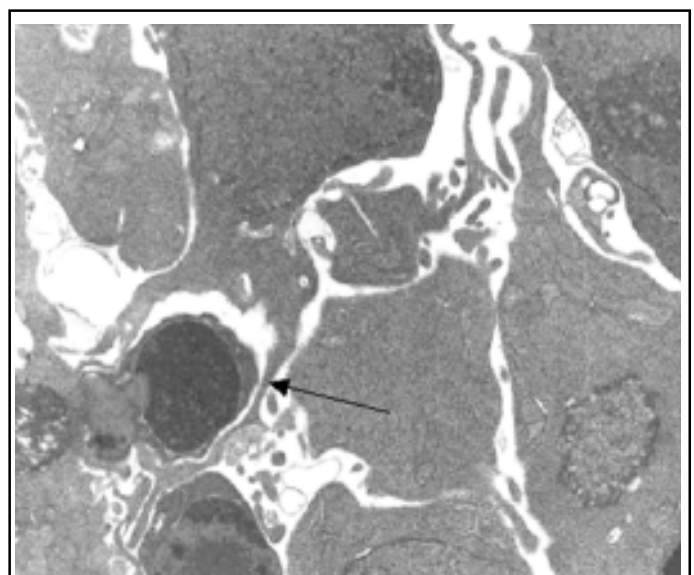


Figure 4 : Micrographie électronique réalisée chez le même embryon que la Figure 3. Une cellule apoptotique affectée d'un gros corps d'apoptose est phagocytée par une cellule voisine (flèche).

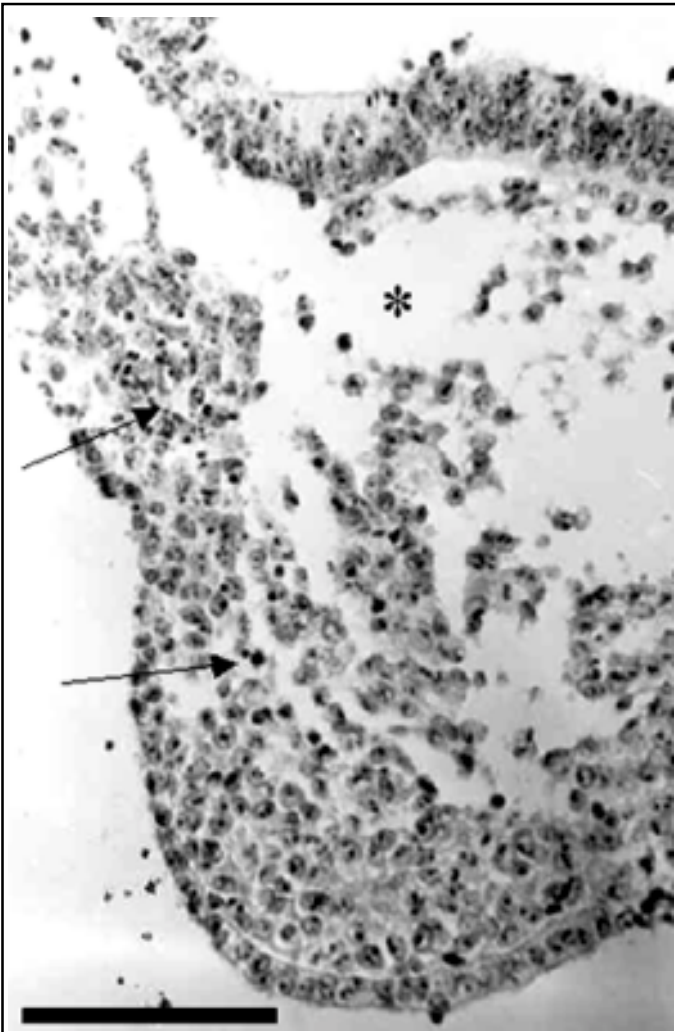


Figure 5 : Coupe en paraffine colorée au Feulgen pratiquée dans le premier arc d'un embryon de 9 jours dont la mère a reçu de l'acide rétinoïque 3 heures auparavant. Le nombre de cellules mortes est manifestement plus élevé que chez le témoin (flèches) et on peut observer une " dissociation " tissulaire (astérisque) (échelle = 100 μ m).

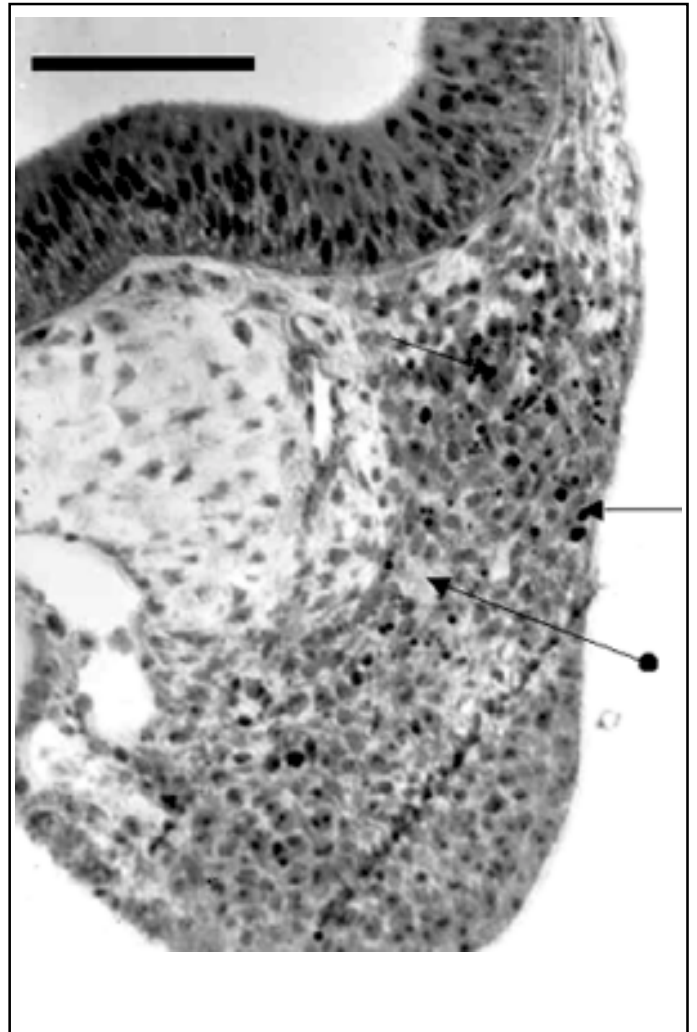


Figure 6 : Coupe semi-fine réalisée dans les mêmes conditions que la Figure 5. Le grand nombre de cellules en apoptose est manifeste (flèches). Des zones de " vide " intercellulaire sont observées (flèche à bout arrondi) et expliquent la dissociation tissulaire présente sur les coupes en paraffine (échelle = 100 μ m).

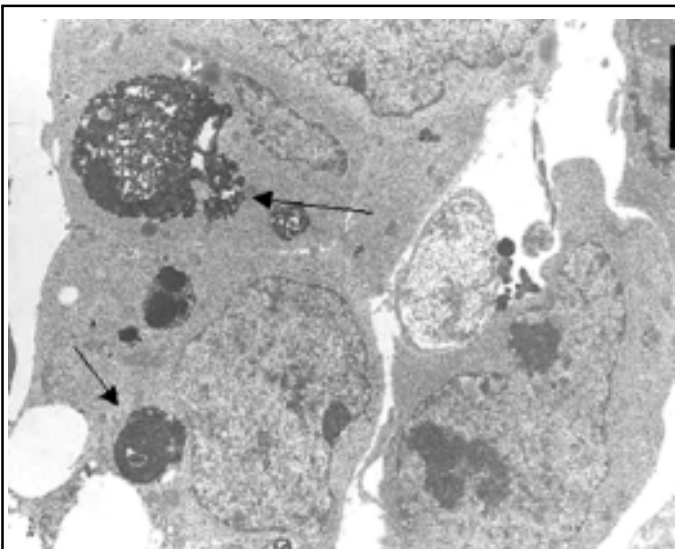


Figure 7 : Micrographie électronique pratiquée chez un embryon de 9,5 jours, 4 heures après l'exposition à l'acide rétinoïque, et entreprenant l'arc mandibulaire. Des cellules en apoptose sont affectées de corps apoptotiques de taille variable (flèches) (x 4.600).

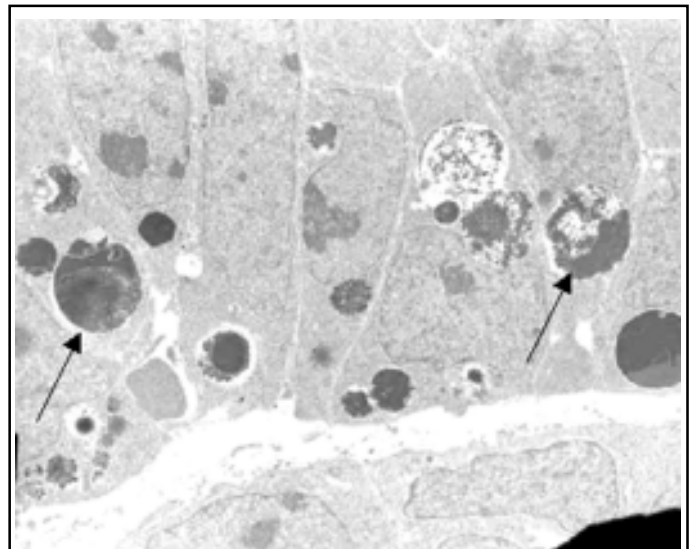


Figure 8 : Micrographie électronique pratiquée chez un embryon de 10 jours exposé à 9 jours à l'action de l'acide rétinoïque, et entreprenant la vésicule otique. Ici aussi, de nombreux corps apoptotiques sont visibles (flèches) (x 3.600).

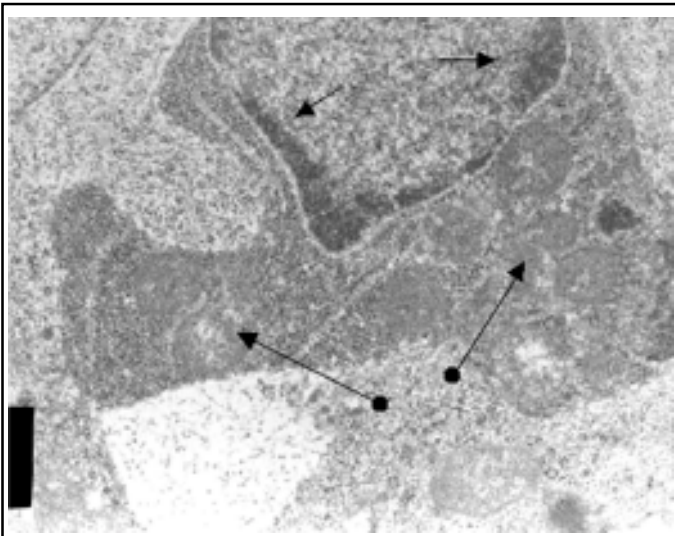


Figure 9 : Micrographie électronique chez un embryon de 10 jours exposé à 9 jours à l'action de l'acide rétinoïque (arc mandibulaire). Une cellule typiquement en apoptose montre deux signes du processus : margination chromatinienne (flèches) et remaniement mitochondrial caractérisé par une disparition des crêtes (flèches à bout arrondi) (x 17.000).

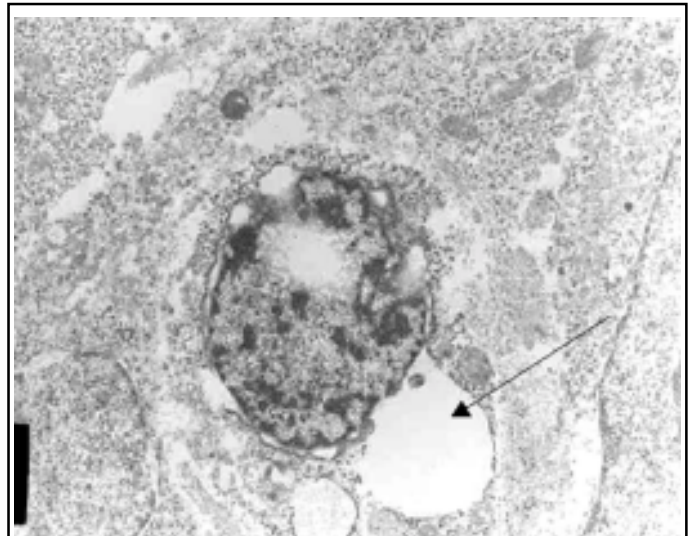


Figure 10 : Micrographie électronique chez un embryon de 10 jours exposé à 9 jours à l'action de l'acide rétinoïque (arc mandibulaire). Une cellule montre des signes d'autophagie : dissociation et vacuolisation cytoplasmiques (flèche), noyau encore intact (x 10.000).

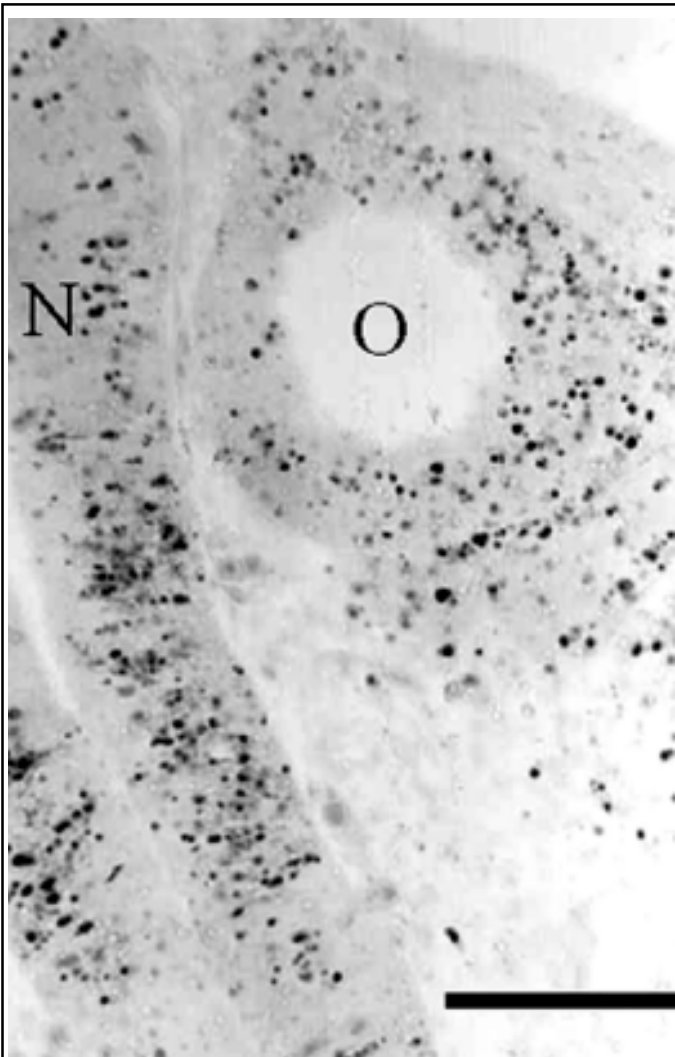


Figure 11 : Coupe semi-fine réalisée chez un embryon de souris de 9,5 jours irradié à 9 jours. Une vague de mort cellulaire diffuse est présente de manière ubiquitaire, notamment dans le tube neural (N) et l'otocyste (O) (échelle = 100 µm).

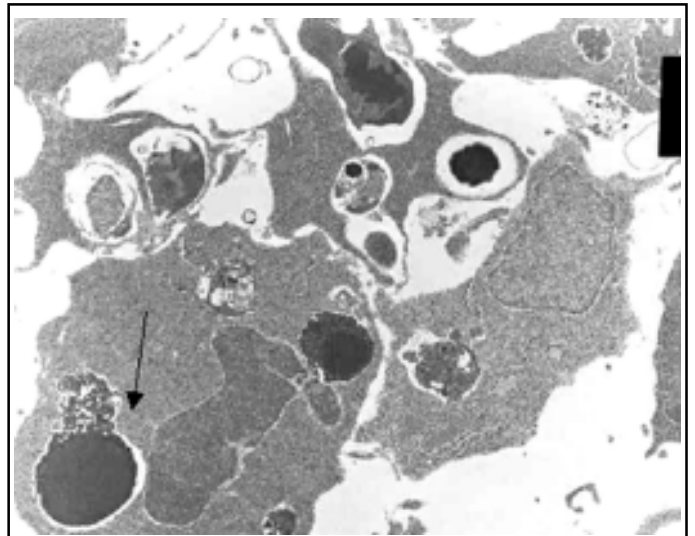


Figure 12 : Micrographie électronique au sein du bourgeon mandibulaire d'un embryon de 10 jours irradié à 9 jours. De nombreuses cellules apoptotiques sont présentes, avec d'innombrables corps d'apoptose (flèche). Au-dessus de la cellule fléchée, un processus de phagocytose est observable (x 6.000).

gure 3), correspondant à des fragments agglutinés de cytoplasme, et la phagocytose des cellules mortes (Figure 4). Aucune figure de nécrose n'a été repérée.

Embryons traités à l'acide rétinoïque

Les documents histologiques nous démontrent une majoration quantitative du processus de mort cellulaire (Figures 5 et 6). Les coupes colorées au Feulgen nous révèlent de surcroît une sorte de dispersion cellulaire, avec majoration nette des espaces intercellulaires (Figure 5), tandis que les coupes semi-fines, plus respectueuses de la cohésion tissulaire, nous dévoilent des zones où certains espaces intercellulaires sont

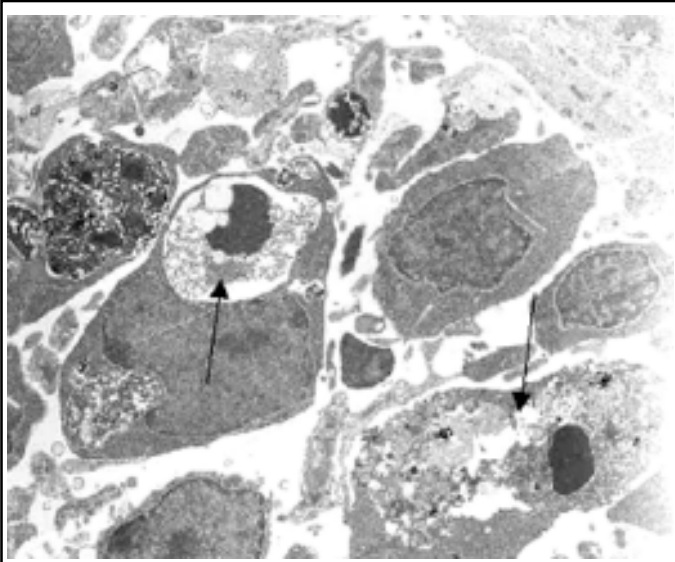


Figure 13 : Micrographie électronique dans l'otocyste d'un embryon de 10 jours irradié à 9 jours. Le cytoplasme d'une cellule apoptotique se disjoint (flèche inférieure), tandis qu'une souffrance mitochondriale est relevée. Un débris d'apoptose est également phagocyté (flèche supérieure) (x 4.600).

élargis (flèches sur Figure 6, à comparer avec la Figure 2 du témoin). Les documents issus du microscope électronique (Figures 7 à 10) exhibent ici également tous les stades de l'apoptose : corps apoptotiques (Figure 8), margination de l'ADN (Figure 9), remaniement mitochondrial (Figure 9). Toutefois, et bien que ce processus s'avère marginal, on distingue parfois des cellules présentant des signes d'autophagie, à savoir essentiellement une vacuolisation cytoplasmique (Figure 10). Le noyau demeure intact.

Embryons irradiés

Ici, le processus de mort cellulaire est diffus et ubiquitaire (Figure 11), et apparaît très précocement. Le processus d'apoptose domine très largement, avec ses différentes phases morphologiques, y compris la phagocytose des débris (Figures 12 et 13). Néanmoins, de manière marginale s'observent des cellules affectées par un phénomène nécrotique : pycnose nucléaire et éclatement complet du cytoplasme (Figure 14).

DISCUSSION

Naguère encore appelée " mort cellulaire programmée " ou " nécrose programmée ", l'apoptose constitue un processus de régulation très répandu chez l'embryon¹⁵. Il est présent dans de nombreuses ébauches, comme les bourgeons de membres, les structures axiales, le bourgeon caudal et, bien entendu, le mésectoderme branchial issu des crêtes neurales céphaliques. Le contrôle génétique de l'apoptose " embryonnaire " est partiellement connu, et on sait maintenant que des gènes homéobox tels que MSX2, mais également la présence des rétinoïdes et de leurs récepteurs participent au contrôle de ce processus¹⁰.

L'administration exogène d'acide rétinoïque est

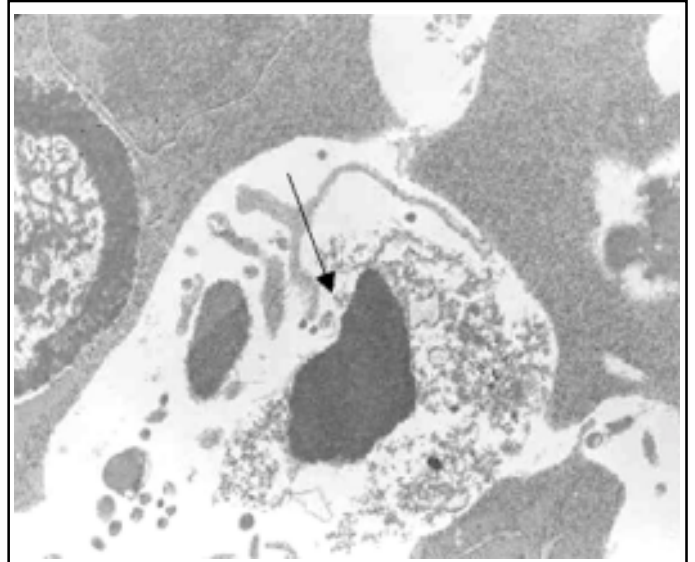


Figure 14 : Micrographie électronique dans le bourgeon mandibulaire d'un embryon de 10 jours irradié à 9 jours. Démonstration d'une cellule nécrotique à noyau pycnotique (flèche) et à cytoplasme totalement fragmenté (x 10.000).

responsable de la genèse de malformations crânio-faciales caractérisées, chez l'homme comme chez la souris, par une hypoplasie maxillo-mandibulaire s'associant à des malformations de l'oreille voire à des fentes labio-palatines^{16,17}. Des malformations cardiaques ont été relevées dans l'espèce humaine. On connaît par ailleurs le rôle majeur joué par les cellules dérivées des crêtes neurales céphaliques dans la genèse du mésectoderme céphalique, mais aussi dans celle du septum bulbaire du cœur (synthèse dans la référence 18). De nombreuses approches expérimentales ont clairement démontré que l'acide rétinoïque majore quantitativement le processus d'apoptose dans la partie proximale des deux premiers arcs branchiaux⁷⁻⁹. Du reste, il est également connu que l'acide rétinoïque " rostralise " et étend à l'arc mandibulaire l'expression des gènes Hoxb1 et Hoxb2, ainsi que celle de son propre récepteur RARb, normalement non exprimés dans le premier arc branchial¹⁰. Il semble donc acquis que l'acide rétinoïque n'agit pas comme un agent cytotoxique, mais interfère avec le programme propre de la cellule. Il n'est, dans ces conditions, guère étonnant que le processus d'apoptose domine dans ce modèle particulier, et que celui-ci nous permette d'en visualiser toutes les phases. Il est à noter par ailleurs que la perte de contact entre les cellules correspond à un remaniement précoce de l'apoptose, et que la majoration des espaces intercellulaires que nous avons observée à l'instar de Sulik et al^{5,8} réponde partiellement de ce processus, additionné d'une raréfaction cellulaire due également au même processus. Le phénomène d'autophagie correspond en réalité à un processus apoptotique particulier (apoptose de type II)¹⁹, et rentrerait dans un contexte similaire.

En revanche, l'irradiation entraîne un dommage cellulaire direct par atteinte de l'ADN, perturbant ainsi le métabolisme cellulaire et le processus de division. La réponse des cellules à l'irradiation dépend du cycle

cellulaire ; les cellules sont particulièrement vulnérables en phase G2²⁰.

Il était également connu que l'irradiation durant le développement entraînait une nette majoration du processus de mort cellulaire⁵. Nous avons pu en démontrer son aspect assez diffus, résultant du taux élevé de prolifération au moment de l'irradiation¹¹. Du reste, l'aspect final de la dysmorphose obtenue diffère assez sensiblement de celui obtenu à l'aide de l'acide rétinoïque^{11,21}. Les présentes données en confirment le caractère majoritairement apoptotique. Toutefois, la présence d'un processus marginal de nécrose traduit vraisemblablement des lésions "secondaires", peut-être dues à l'hypoxie, et témoignant d'une perte cellulaire massive avec perturbation large de l'homéostasie tissulaire. L'intérêt du présent travail est de préciser, au sein d'un phénomène naguère appelé "mort cellulaire" la contribution des divers types de processus morbides dans chacun des modèles tératologiques. En outre, les présents résultats sont susceptibles d'éclairer la pathogénie de diverses entités malformatives humaines dont les investigations ci-avant décrites constituent le modèle. Citons par exemple la dysostose mandibulo-faciale (syndrome de Franceschetti-Klein ou de Treacher Collins), l'embryopathie aux rétinoïdes, etc.

BIBLIOGRAPHIE

- Glücksman A : Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 1951 ; 26 : 59-86
- Iliès A : La topographie et la dynamique des zones nécrotiques chez l'embryon humain. *Rev Roum Embryol Cytol* 1967 ; 4 : 51-84
- Iliès A : La topographie et la dynamique des zones nécrotiques chez l'embryon de 11-30 mm. Etude histologique et histochimique. *Rev Roum Embryol Cytol* 1969 ; 6 : 31-44
- Liu-bin M, Milaire J : Spatial and temporal patterns of programmed cell death in the somites of mouse embryos. *Arch Biol Brux* 1982 ; 93 : 99-109
- Sulik KK, Cook CS, Webster WS : Teratogens and craniofacial malformations : relationships to cell death. *Development* 1988 ; 103 (Suppl) : 213-32
- Evrard L, Louryan S, Vanmuylder N, Glineur R, Rooze M, Dourov N : Le rôle de l'apoptose durant le développement crânio-facial : concepts et importance en pathologie. *Rev Med Brux* 1998 ; 19 : 20-7
- Louryan S, Glineur R : Les foyers de dégénérescences physiologiques dans les arcs branchiaux de l'embryon de souris : Etude morphologique, histochimique, et applications tératologiques. *Bull Assoc Anat* 1993 ; 237 : 19-22
- Sulik KK, Johnston MC, Smiley SJ, Speight HS, Jarvis BE : Mandibulofacial dysostosis (Treacher Collins syndrome) : A new proposal for its pathogenesis. *Am J Med Genet* 1987 ; 27 : 359-72
- Evrard L, Vanmuylder N, Dourov N et al : Correlation of HSP 110 expression with all-trans retinoic acid-induced apoptosis. *J Craniofac Genet Dev Biol* 2000 ; 20 : 183-92
- Le Douarin NM, Kalcheim C : The neural crest. 2th edition. Cambridge, Cambridge University Press, 1999
- Glineur R, Louryan S, Philippson C, Evrard L, De Vos L : Effects of irradiation on facial development in mouse embryos. *Eur J Morphol* 1998 ; 36 : 245-52
- Lockshin RA, Zakeri Z, Tilly JL : When cells die : A comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death. New York, Wiley-Liss, 1998
- Evrard L, Vanmuylder N, Dourov N, Glineur R, Louryan S : Cytochemical identification of HSP 110 during early mouse facial development. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1999 ; 19 : 24-32
- Evrard L, Louryan S, Werry-Huet A, Vanmuylder N, Rooze M, Dourov N : Ki-67 et apoptose dans un modèle embryonnaire. *Ann Pathol* 1998 ; 18 : 450-2
- Hurle J : Cell death in developing systems. *Meth Arch Exp Pathol* 1998 ; 13 : 55-86
- Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM et al : Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* 1985 ; 3 : 837-42
- Louryan S, Glineur R, Dourov N : Induced and genetic mouse middle ear ossicular malformations : a model for human malformative ossicular diseases and a tool for clarifying their normal ontogenesis. *Surg Radiol Anat* 1992 ; 14 : 227-32
- Louryan S : Rôle des crêtes neurales dans les malformations maxillo-faciales : faits et hypothèses. *Rev Med Brux* 1989 ; 10 : 341-8
- Zakeri Z, Bursh W, Tenniswod M, Lockshin RA : Cell death. Programmed, apoptosis, necrosis, or other. *Cell Death Differ* 1995 ; 2 : 87-96
- Radford IR, Murphy TK, Radley JM, Ellis SL : Radiation response on mouse lymphoid cell lines. Apoptotic death in shown by all lines examined. *Int J Radiat Biol* 1994 ; 65 : 217-27
- Glineur R, Louryan S, Evrard L, Rooze M, De Vos L : Cranio-facial dysmorphism : experimental study in the mouse, clinical applications. *Surg Radiol Anat* 1999 ; 21 : 41-7

Correspondance et tirés à part :

S. LOURYAN
Faculté de Médecine U.L.B.
Laboratoire d'Anatomie et Embryologie
Route de Lennik 808 CP 619
1070 Bruxelles

Travail reçu le 6 mars 2003 ; accepté dans sa version définitive le 16 octobre 2003.