



**HAL**  
open science

# Formation de la condensation dermique chez l'embryon de poulet : études in vivo, in vitro et in silico

Frederic Michon

► **To cite this version:**

Frederic Michon. Formation de la condensation dermique chez l'embryon de poulet : études in vivo, in vitro et in silico. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00174691

**HAL Id: tel-00174691**

**<https://theses.hal.science/tel-00174691>**

Submitted on 25 Sep 2007

**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.



UNIVERSITE GRENOBLE I – JOSEPH FOURIER

## THESE

Pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université Joseph Fourier**

**Mention Biologie**

Présentée par

**Frédéric MICHON**

le 3 Septembre 2007

# **Formation de la condensation dermique chez l'embryon de poulet : études *in vivo*, *in vitro* et *in silico***

**Thèse préparée sous la direction du Pr. Danielle Dhouailly**

Equipe Ontogenèse et Cellules Souches du Tégument

Centre de Recherche Inserm - UJF U823 - Institut Albert Bonniot

Composition du jury :

- Pr. Jacques Demongeot, Président
- Pr. Irma Thesleff, Rapporteur
- Dr. Benoit Robert, Rapporteur
- Pr. Françoise Bleicher, Examineur
- Pr. Danielle Dhouailly, Examineur

## RESUME

### **Formation de la condensation dermique chez l'embryon de poulet : études *in vivo*, *in vitro* et *in silico***

L'apparition au sein d'une peau homogène, composée d'un épiderme et d'un derme dense sous-jacent, des structures primaires des annexes cutanées (placode épidermique et condensation dermique) est un événement complexe tant au niveau des modifications morphologiques que du nombre de molécules impliquées. Tout au long de mes travaux de thèse, j'ai étudié les facteurs moléculaires gouvernant l'organisation cellulaire du derme avant et pendant la mise en place des condensations dermiques.

De part l'utilisation de techniques originales *in vitro*, j'ai identifié les mécanismes moléculaires régissant : l'arrêt de la prolifération cellulaire, événement précédant la formation de la condensation et gouverné par la protéine p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ; la migration cellulaire, indispensable à la mise en place de la condensation et nécessitant l'engagement des Intégrines sur des molécules de Fibronectine contenant l'exon EIIIA ; ainsi que la chémo-attraction médiée par BMP-7 et arrêtée par BMP-2. Enfin, j'ai montré que les facteurs nécessaires à la stabilisation de cette structure, impliquent à la fois les Intégrines et la signalisation Notch.

Grâce à une collaboration avec un mathématicien, nous proposons un modèle mathématique *in silico* intégrant l'ensemble de ces paramètres. Ce modèle rend compte, en reproduisant l'apparition et la distribution des primordia plumaires observées *in vivo*, non seulement de mes propres résultats biologiques, mais explique aussi les résultats ayant conduit depuis 1998 à classer la signalisation BMP comme inhibitrice de la formation plumaire.

## *Remerciements*

*« La connaissance est une navigation dans un océan d'incertitudes à travers des archipels de certitudes »*

*Edgard Morin*

*La thèse est comme un tour du monde à la voile. Souvent seul avec soi-même, mais les escales et les rencontres sont toujours passionnantes et enrichissantes. Je tiens ici à remercier ceux qui ont fait de cette traversée une régata agréable plutôt qu'une course en solitaire.*

*Tout d'abord, la personne qui m'a permis de tenir la barre bien droite, Danielle. Je tiens à la remercier pour son accueil dès ma maîtrise, il y a six ans de ça. Elle m'a permis d'acquérir une grande autonomie, ainsi que de développer chez moi le goût des défis scientifiques. La relation entre une directrice de thèse et un thésard est particulière et je suis ravi d'avoir pu partager ça avec Danielle. Ayant chacun notre caractère, je suis ravi qu'ils se soient bien complétés. Merci.*

*Ensuite, celle qui a su transformer les mers démontées en golfes paisibles. Elodie, tel Neptune, a su m'aider à passer les caps difficiles qui ont jalonné la fin de ma thèse. Sans son soutien sans faille et sa joie de vivre de nombreux récifs auraient eu raison de ma frêle embarcation. A mon tour de te soutenir pour ta thèse !*

*Mes parents, qui tels deux capitaines aux longs courts, ont su m'inculquer les agréments de la plaisance ainsi que ceux plus gratifiants de la régata de compétition. Je les remercie de leur soutien, leur compréhension et leur écoute. Et oui, cette fois-ci le p'tit dernier a bien fini son cursus !*

*Mes frères et belles-sœurs, toujours présents, leur soutien et moments de folie ont été des escales de détente toujours bienvenues. J'espère que vous viendrez me voir avec votre marmaille.*

*Mes neveux et nièces, petits moussaillons des mers proches ou lointaines, qui auraient préférés que je laisse les poussins vivre leur vie. Votre oncle sera toujours là pour vous !*

*Mes amis, tous équipage de mon radeau « les copains d'abord », les grenoblois, Jean-François, Sylvain, Delphine, Virginie, les drômois, Pierre, Laurent, Xavier, Céline, Muriel, Aurélie... et les autres.*

*Nos liens, tels des élastiques se sont tendus et distendus, mais n'ont pas rompus. Je vous attends tous en Finlande !*

*Les étudiants de l'institut, autant de capitaines engagés dans leur propre régata. Ceux qui naviguent encore Angéline, Angélique, Cédric, Junior, Nico, Rico, Sabrina, Seb ; ceux qui sont arrivés et s'engagent sur d'autres navires David, Camille, Ingrid, Ying, Cyril et Jérôme. Ils ont tous été des exemples pour moi. Je vous souhaite à tous d'arriver à bon port, celui que vous aurez choisi !*

*Cette thèse n'aurait pas été celle-ci sans tous les gens que j'ai côtoyés au quotidien, qui ont participé de près ou de loin à ce que j'arrive à bon port : Dave gardien du phare empêchant mon navire de dériver quand arrive la houle des publications, Muriel dont la bonne humeur et les conseils avisés regonflent le moral, Brigitte dont le goût esthétique a fait des miracles sur mes présentations et photos, Jacqueline qui malgré mes demandes administratives les plus tardives a toujours gardé le sourire, Geneviève et Patricia qui m'ont permis d'avancer dans le début de ma thèse. Alexei qui a toujours été à l'écoute de mes demandes si particulières en microscopie.*

*Enfin, je souhaite remercier les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail de thèse.*

*« Etre bon représente une aventure autrement violente et osée que de faire le tour du monde à la voile »*

*Gilbert Keith Chesterton*

## *Table des matières*

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
I. La peau et les annexes cutanées.....	2
II. Macropattern et micropattern : la distribution des phanères sur la peau.....	4
III. Origine embryonnaire de la peau.....	7
IV. Evénements morphogénétiques et interactions tissulaires à l'origine du primordium de phanère.....	11
1. Formation du primordium de phanère.....	11
2. Interactions tissulaires.....	13
V. Aspects moléculaires de la formation du primordium de phanère.....	15
1. La signalisation calcique.....	15
2. Prolifération cellulaire.....	15
i) Protéine p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> .....	16
a- Implication dans l'arrêt de la transition G1/S.....	16
b- Implication cutanée de p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> .....	18
ii) Sonic Hedgehog (Shh).....	19
a- La voie de signalisation Hedgehog chez la Drosophile.....	19
b- La voie de signalisation Hedgehog chez les vertébrés.....	20
c- Signalisation Shh lors de la mise en place du primordium de phanère.....	22
3. Migration cellulaire et modifications morphologiques.....	22
i) Matrice extracellulaire.....	23
ii) Les Intégrines.....	26
iii) La migration cellulaire.....	27
iv) Protéines Rho et cytosquelette d'actine.....	29
4. Principaux facteurs diffusibles impliqués dans les dialogues tissulaires.....	30
i) Signalisation Wnt.....	30
a- Facteurs diffusibles Wnt.....	32
b- Récepteurs Frizzleds et co-récepteurs LRP.....	33
c- Voie canonique ( $\beta$ -caténine).....	34
d- Voie calcique.....	35
e- Voie de polarité planaire.....	36

f- Régulation de la signalisation Wnt .....	36
g- Implication des Wnt dans la mise en place du primordium de phanère .....	37
ii) Signalisation « Bone Morphogenetic Protein » (BMP) .....	39
a- La voie canonique.....	40
b- La voie des MAP kinases .....	42
c- Gènes cibles de la signalisation BMP .....	43
d- Régulation de la signalisation BMP .....	43
e- Interactions avec d'autres voies de signalisation.....	45
f- Signalisation BMP lors de la mise en place du primordium de phanère .....	47
iii) Signalisation « Fibroblast Growth Factor » (FGF) .....	48
a- La voie de transduction intracellulaire.....	48
b- La voie directe .....	51
c- Signalisation FGF dans la mise en place du primordium de phanère .....	52
5. Facteurs membranaires et interactions intra-tissulaires .....	53
i) Ectodysplasine (Eda) .....	53
a- Signalisation Eda.....	56
b- Interaction avec d'autres voies de signalisation .....	57
c- Signalisation Eda dans la mise en place du primordium de phanère .....	58
ii) Système Notch et inhibition latérale.....	58
a- Voie de signalisation Notch .....	59
b- Phénomène d'inhibition latérale .....	62
c- Régulation de la signalisation Notch.....	63
d- Signalisation Notch et établissement des frontières .....	65
e- Signalisation Notch lors de la mise en place du primordium de phanère.....	67
VI. Modèles mathématiques.....	69
1. Différents types de modèle .....	69
i) Basés sur des codes moléculaires .....	69
ii) Basés sur les gabarits.....	69
iii) Basés sur un équilibre (réaction-diffusion).....	71
2. Modèles de formation des patterns cutanés, « digital hormone » (DHM) .....	71
<b>BUTS DES TRAVAUX DE THESE.....</b>	<b>74</b>
<b>TRAVAUX DE THESE .....</b>	<b>78</b>



I. Introduction : focus sur la condensation dermique .....	78
1. Le derme, élément clé de la formation du primordium .....	78
2. Questions en suspens sur la formation de la condensation dermique.....	79
II. Méthodes d'études employées.....	79
1. Culture organotypique et labilité des primordia formés .....	80
2. Tests de migration .....	81
3. Formation de « condensations dermiques » in vitro : culture en gouttes pendantes.....	81
4. Sondes pour hybridation in situ et détection par RT-PCR.....	83
III. Synthèse des résultats.....	83
1. Migration cellulaire à l'origine de la formation de la condensation .....	84
i) Implication des Intégrines .....	84
a- <i>Calcium et dynamique d'adhérence</i> .....	84
b- <i>Rho et remodelage du cytosquelette lors de la migration</i> .....	85
ii) Rôle de la Fibronectine.....	86
a- <i>Fibronectine et migration cellulaire</i> .....	86
b- <i>Épissage alternatif de la Fibronectine et réorganisation du derme</i> .....	87
iii) Signalisation BMP à l'origine de la formation de la condensation.....	87
a- <i>Chronologie d'expression des facteurs BMPs lors de la morphogénèse cutanée</i> .....	87
b- <i>Expression de gènes cibles de la signalisation BMP : les gènes <i>Id</i></i> .....	88
c- <i>Rôles antagonistes de BMP-2 et BMP-7 sur la migration cellulaire</i> .....	89
d- <i>BMP-2 et épissage alternatif de l'exon EIIIA de la Fibronectine</i> .....	90
2. Stabilisation des structures formées.....	90
i) Rôle des Intégrines .....	91
ii) Rôle de la signalisation Notch.....	91
a- <i>Chronologie d'expression des protéines du système Notch</i> .....	92
b- <i>Implication de Notch sur l'établissement du micropattern</i> .....	92
c- <i>Notch et expression de p21<sup>WAF1/CIP1</sup></i> .....	93
3. Mise en place d'un modèle mathématique .....	94
i) Paramètres pris en compte et modèle proposé.....	94
a- <i>Prolifération cellulaire</i> .....	94
b- <i>Facteurs activateurs et inhibiteurs</i> .....	95
c- <i>Situation initiale</i> .....	95

d- <i>Modèle mathématique</i> .....	95
ii) Mise en place du micropattern hexagonal .....	96
iii) Modèle prédictif .....	97
a- <i>Formation des aptéries et semi-aptéries</i> .....	97
b- <i>Inhibition due à un excès d'activateur</i> .....	97
c- <i>Mode d'action de l'inhibiteur</i> .....	98
iv) Amélioration du modèle mathématique.....	98
<b>IV. Publications</b> .....	<b>100</b>
1. Publication n°1 .....	100
2. Publication n°2 .....	115
3. Publication n°3 .....	165
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>187</b>
I. Mise en place de la condensation dermique.....	187
II. Apports du modèle mathématique .....	189
<b>PERSPECTIVES</b> .....	<b>192</b>
I. Orchestration des différents facteurs impliqués dans la mise en place des primordia de phanère .....	192
II. Poursuite de la morphogénèse et ségrégation des cellules souches.....	193
III. Améliorations du modèle mathématique.....	194
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>195</b>
<b>ANNEXES : REVUES PUBLIEES</b> .....	<b>235</b>
I. Revue n°1 .....	235
II. Revue n°2 .....	245

## INDEX DES FIGURES

- Figure 1** Structures de la peau de nouveau-nés souris et poulet
- Figure 2** Répartition des champs plumaires dorsaux chez l'embryon de poulet
- Figure 3** Origine du derme des différents champs plumaires
- Figure 4** Apparition des primordia plumaires entre HH29 et HH30
- Figure 5** Schéma du dialogue moléculaire impliqué lors de la morphogénèse cutanée
- Figure 6** Intervention de p21<sup>WAF1/CIP1</sup> lors de la régulation du cycle cellulaire
- Figure 7** Voie de signalisation médiée par les protéines Hedgehog chez la Drosophile
- Figure 8** Domaines d'expression de protéines de la matrice extracellulaire
- Figure 9** Dynamique de l'affinité des Intégrines lors de la migration cellulaire
- Figure 10** Voies de signalisation médiées par les Wnts
- Figure 11** Voies de signalisation médiées par les BMPs
- Figure 12** Voies de signalisation médiées par les FGFs
- Figure 13** Voie de signalisation médiée par l'Ectodysplasine
- Figure 14** Voie de signalisation médiée par le récepteur Notch
- Figure 15** Domaines d'expression de facteurs impliqués dans le dialogue moléculaire
- Figure 16** Types de modèles mathématiques
- Figure 17** Modèle de réaction-diffusion à l'origine de différents « patterns »
- Figure 18** Technique de cultures organotypique et cellulaire
- Figure 19** Modèle intégratif de la formation de la condensation dermique en quatre étapes

## *Introduction*

## INTRODUCTION

La peau est un des organes des vertébrés dont la surface est la plus étendue. Elle joue plusieurs rôles essentiels dont celui de protection contre le milieu extérieur (en tant que barrière physique), et celui de régulation thermique, hygrométrique et chimique. Ces rôles sont en grande partie assurés en fait par les annexes cutanées qui regroupent les glandes (bien développées et diversifiées chez les mammifères) et les phanères (poils, ongles et griffes chez les mammifères ; plumes, écailles et griffes chez les oiseaux). Pour la recherche fondamentale, la peau est un modèle de choix. Le fait qu'elle soit l'enveloppe externe des vertébrés la rend aisément accessible à l'observation. C'est de plus un modèle simple, qui a l'avantage d'être plan, contrairement à la plupart des autres organes, et par conséquent facile à manipuler. La compréhension des mécanismes moléculaires conduisant à la morphogenèse de la peau et de ses annexes présente aussi un intérêt pratique. D'un point de vue médical, il est primordial de parvenir à reconstruire artificiellement une peau humaine complète, donc pourvue d'annexes cutanées, qui soit capable de remplacer le mieux possible les lésions subies par des grands brûlés. D'autres applications concrètes sont également possibles dans le domaine de la cosmétologie.

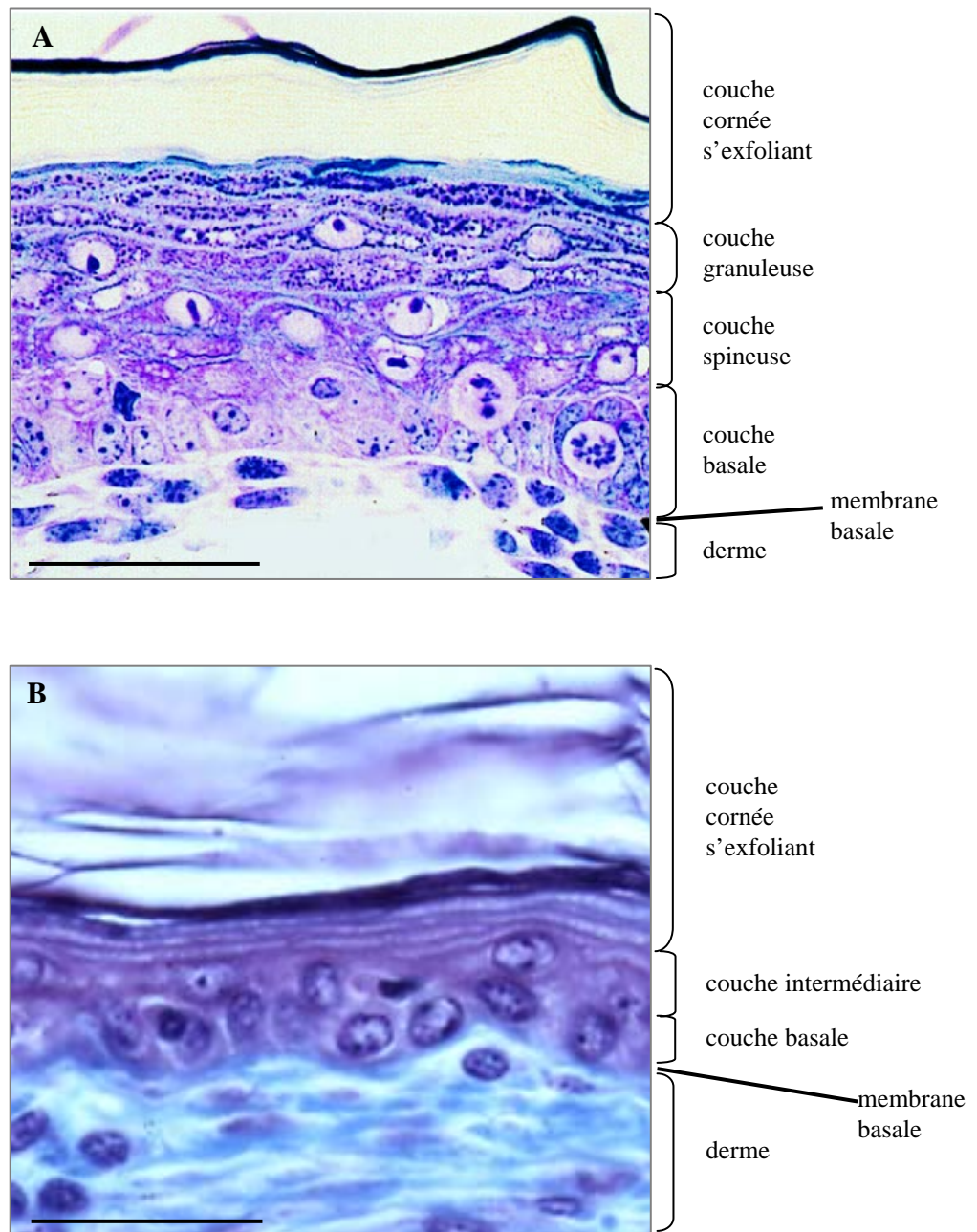
Ayant utilisé l'embryon de poulet comme modèle d'étude au cours de mes expérimentations, dans ce chapitre d'introduction je présente une description générale de la peau des oiseaux, ainsi que des étapes nécessaires à l'élaboration d'un derme phanérogène et des ébauches plumaires. J'introduis les notions de « macropattern » et de « micropattern » cutanés qui concernent la disposition des phanères à la surface de la peau, ainsi que les différents modèles mathématiques déjà proposés dans ce cadre. Enfin, je réalise une revue des différentes voies de signalisation impliquées dans les phénomènes à l'origine de la mise en place des ébauches de phanères, puis présente les buts des recherches réalisées en vue de l'obtention de la thèse de doctorat.

## I. La peau et les annexes cutanées

La peau est composée de deux tissus : un épithélium, l'épiderme, et un tissu conjonctif, le derme, à l'interface desquels se trouve la lame basale composée entre autres de Collagène IV, de Fibronectine et de Laminine, et qui est principalement synthétisée par les cellules épidermiques basales (Bard and Sengel, 1984; Bush et al., 2007; Masunaga, 2006) (**Fig. 1**).

L'épiderme est un épithélium pluristratifié et kératinisé élaboré à partir d'une assise basale formée de cellules ayant un rapport nucléocytoplasmique élevé, dont la prolifération assure le renouvellement et le maintien des différentes couches suprabasales. Selon la classe de vertébrés, le nombre et la structure de ces couches varie. Chez les mammifères, on distingue trois catégories de couches suprabasales. La couche épineuse (stratum spinosum) comporte plusieurs assises de kératinocytes et doit son nom aux structures en "épines", formées par l'imbrication des membranes plasmiques des cellules soudées entre elles par les desmosomes. La couche granuleuse (stratum granulosum) est formée de deux à trois assises de kératinocytes caractérisés par des granules de Profilaggrine. La couche cornée (stratum corneum) est constituée de cellules mortes kératinisées également appelées cornéocytes. L'épiderme des oiseaux, bien plus mince, est dépourvu de couche granuleuse et ne comporte que trois à cinq assises cellulaires vivantes recouvertes d'une couche cornée.

Le derme est un tissu conjonctif constitué de cellules éparses, les fibroblastes, qui secrètent une matrice extracellulaire composée de protéines structurales, fibres de collagène, élastine et divers protéoglycannes, associés à des protéines à fonction adhésive, en particulier la fibronectine et la laminine. Lors de la formation des primordia plumaires ou pileux, les Collagènes I et III sont présents dans la matrice extracellulaire dermique située entre les follicules, cette région correspond en fait à une peau "stabilisée" ne participant plus à des processus de morphogenèse. Par contre, la fibronectine est présente dans les régions



**Figure 1 : Structure de la peau de nouveau-nés souris (A) et poulet (B).**

Coupe semi-fine transversale de peau dorsale.

Coloration au bleu de toluidine (A).

Coloration de Mallory (B)

Barre : 25µm

morphogénétiquement actives, et en particulier au niveau des bourgeons plumaires et pileux en cours de croissance (Mauger et al., 1984).

Les annexes cutanées (glandes, poils, plumes et écailles) dérivent de l'épiderme et sont ancrées dans le derme ; les phanères sont les annexes cutanées kératinisées ayant fait saillie à la surface de la peau. Leur formation et leur renouvellement dépendent du compartiment dermique (Dhouailly, 1977). Le premier stade de morphogénèse, qu'il s'agisse des dents, glandes, poils, écailles ou plumes, est phylogénétiquement commun : des placodes, correspondant à des épaissements localisés de l'épiderme apparaissent. Ces placodes se forment sous l'impulsion d'un premier message dermique ubiquitaire (« make an appendage-forming skin » (Dhouailly, 1977)). Chez le poulet, la placode est constituée par un allongement de l'axe apico-basal des cellules épidermiques, alors que chez la souris elle se forme à la suite d'une prolifération des cellules de l'assise basale. Lorsque le mésenchyme sous jacent se réorganise et forme une condensation, on peut alors parler de primordium (placode plus condensation dermique), première étape de la formation d'une annexe cutanée.

## **II. Macropattern et micropattern : la distribution des phanères sur la peau**

L'arrangement des phanères sur le corps peut être étudié à deux niveaux. Au cours du développement embryonnaire, les primordia de phanères se forment dans certaines zones délimitées, nommées champs cutanés phanéroènes. Chacun de ces champs contient un ou plusieurs types d'annexes cutanées qui lui sont spécifiques, et dont la disposition est invariante d'un individu à un autre dans une même espèce. A l'inverse, certaines régions du tégument sont pratiquement dépourvues d'annexes cutanées. Le "macropattern" représente la façon dont sont organisés les différents champs cutanés les uns par rapport aux autres, alors

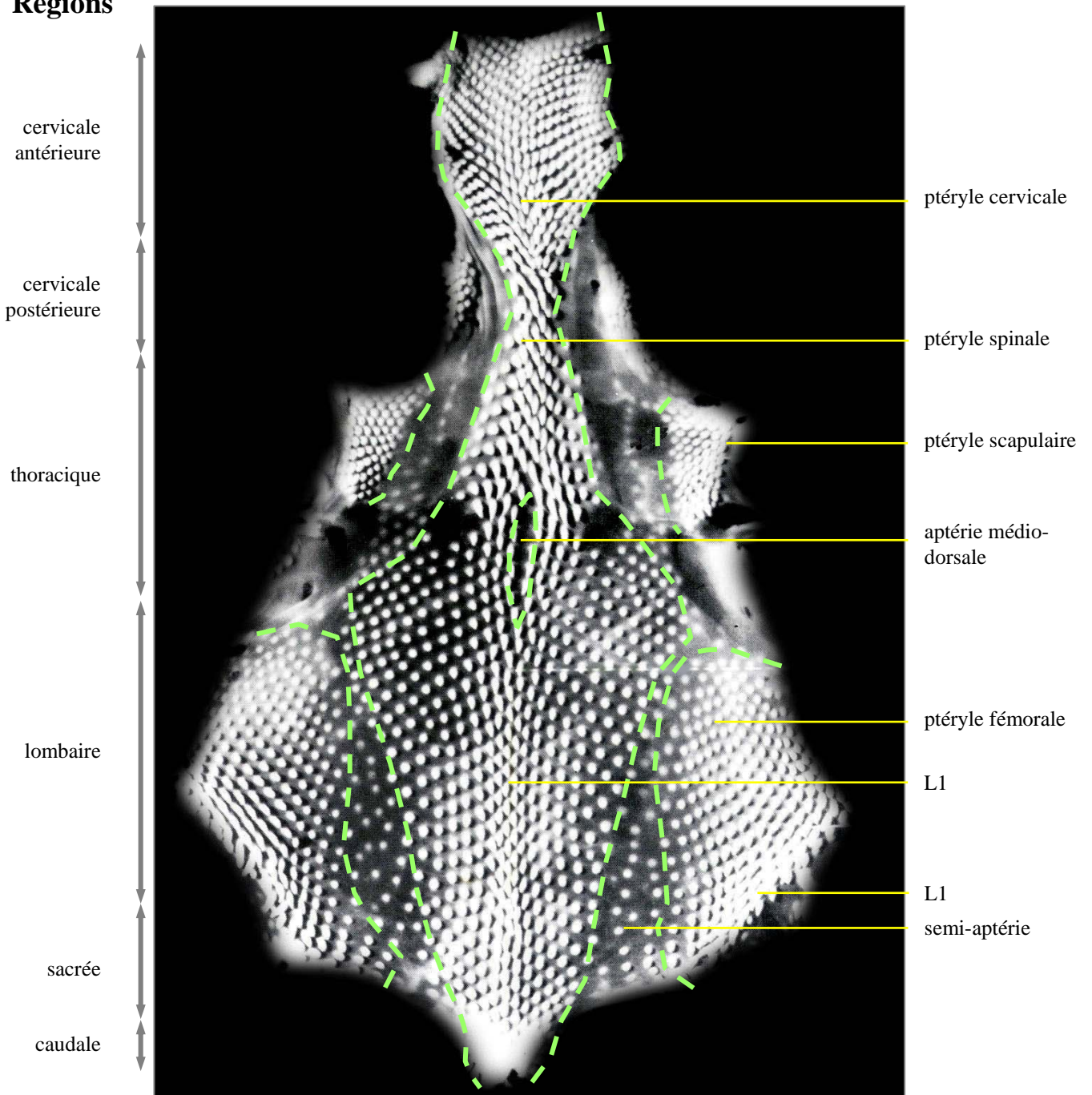


que le « micropattern » qualifie le motif de distribution des phanères au sein d'un champ cutané phanéroène (Chuong, 1998; Sengel, 1976).

Chez le poulet, le macropattern est particulièrement diversifié. Les champs cutanés comprennent les différentes ptéryles ou zones ptilogènes (plumaires), les semi-aptéries et les aptéries (zones comportant peu ou pas de plumes), ainsi que les zones lépidogènes (à écailles). Sur la face dorsale (**Fig. 2**), la ptéryle dorsale, fusionnée morphologiquement avec la ptéryle cervicale, est la plus grande des zones ptilogènes, et s'étend depuis la région cervicale jusqu'au croupion. Deux petits champs ptilogènes situés de part et d'autre de la ptéryle dorsale au niveau des attaches des ailes, constituent les ptéryles scapulaires. Les ailes sont recouvertes de la ptéryle alaire. La partie proximale, aussi bien dorsale que ventrale, des membres postérieurs est recouverte par la ptéryle fémorale. Sur la face ventrale du corps, on distingue les ptéryles pectorales, proches des ailes et localisées au niveau de la cage thoracique, et la ptéryle ventrale, située de part et d'autre de la ligne de fermeture ventrale et passant sous l'ombilic. Les différentes ptéryles sont séparées les unes des autres par des semi-aptéries. Seules deux régions : l'aptérie médio-dorsale, située au centre de la ptéryle dorsale un peu au-dessous du niveau de l'attache de l'aile, et l'aptérie médio-ventrale, située le long de la ligne de fermeture ventrale du corps de l'embryon, sont totalement dépourvues de plumes. Outre les plumes, le poulet, comme la majorité des oiseaux, présente un deuxième type de phanères, les écailles, qui recouvrent la partie distale des pattes.

A l'intérieur des champs cutanés phanéroènes, les primordia de phanères apparaissent de façon séquentielle en formant un motif, ou « micropattern » spécifique de chaque espèce. L'apparition des plumes à l'intérieur des ptéryles se fait par rangées successives à partir d'une rangée initiale (Mayerson and Fallon, 1985). Dans la ptéryle dorsale de l'embryon de poulet, les premières ébauches de plumes forment une rangée médio-dorsale qui se dédouble aux niveaux thoracique et cervical. Les rangées suivantes apparaissent par paires de façon

## Régions



**Figure 2 : Répartition des champs plumaires dorsaux chez l'embryon de poulet.**

Champs cutanés dorsaux du corps de l'embryon de poulet de 11 jours après prélèvement et étalement de la peau.

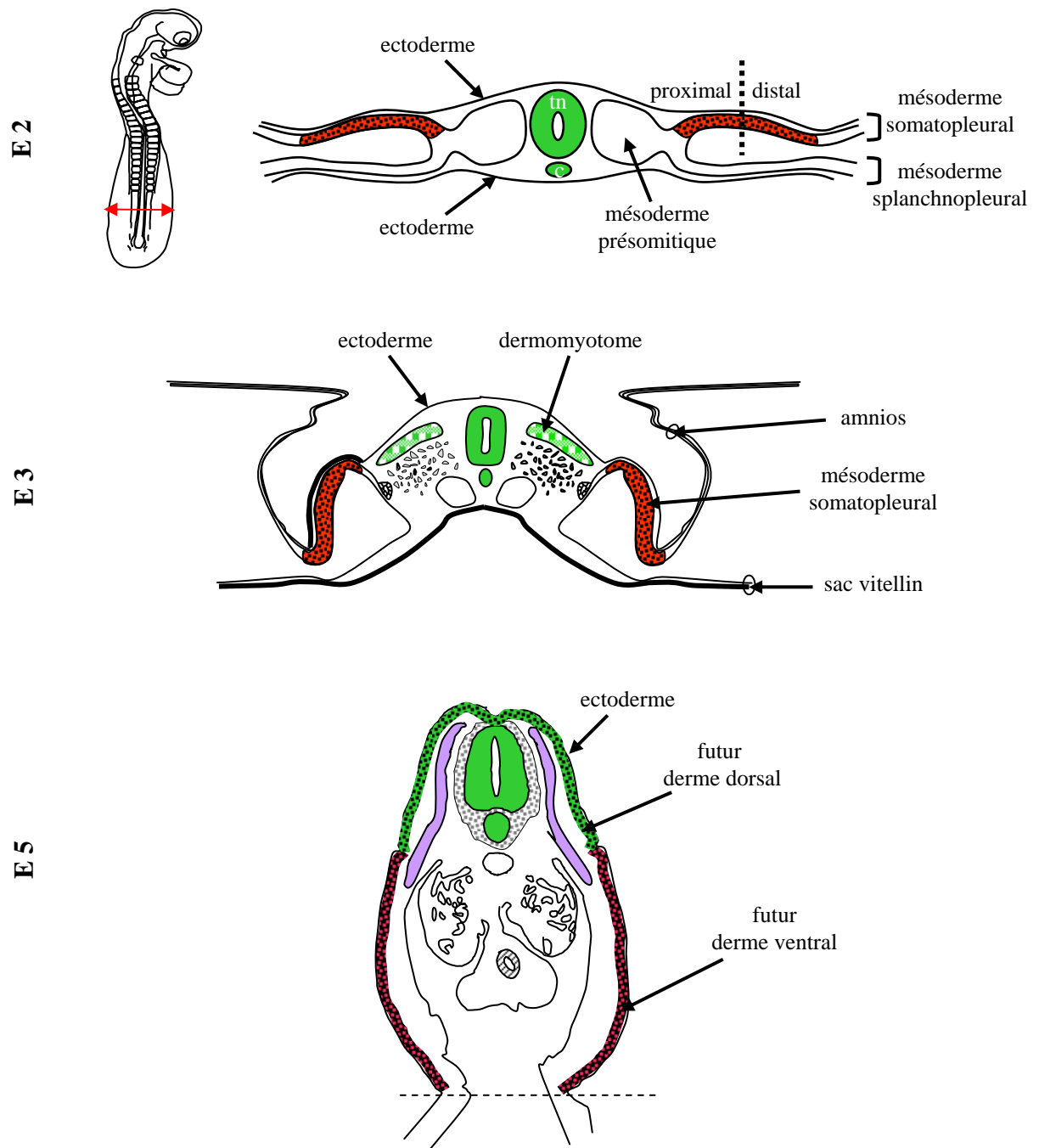
L1: première ligne de primordia dans le champ plumaire considéré.

symétrique et en quinconce de part et d'autre de la rangée initiale. Chaque plume est ainsi entourée de six autres plumes, l'ensemble formant un motif hexagonal (Linsenmayer, 1972; Novel, 1973). Ce motif hexagonal se retrouve dans toutes les ptéryles du corps du poulet.

Lors de la formation du « micropattern », le dialogue entre le derme et l'épiderme est indispensable à une correcte mise en place et croissance des annexes cutanées (Dhouailly, 1977; Sengel, 1976). De nombreuses expériences de recombinaisons dermo-épidermiques hétérotopiques, hétérochroniques, et hétérosécifiques (poulet, souris, canard, lézard) ont montré que le derme est responsable de la taille et du motif de distribution des annexes cutanées, et que l'épiderme s'il est compétent, possède l'information relative au type d'annexe cutanée (Dhouailly and Sengel, 1973; Dhouailly and Sengel, 1975).

### **III. Origine embryonnaire de la peau**

L'épiderme et le derme proviennent de différents feuilletts embryonnaires suivant leur localisation sur l'individu. L'épiderme a pour origine le 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), principalement du dermomyotome médian (Houzelstein et al., 2000; Olivera-Martinez et al., 2000) (**Fig. 3**). Il est généralement admis que le derme ventral ainsi que celui 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 dorsal situé en avant des somites (Couly et al., 1992; Le Douarin et al., 1993). De nombreux travaux de biologie expérimentale ont montré que l'information relative à la formation des ptéryles chez le poulet est contenue dans le compartiment mésodermique.



**Figure 3 : Origine du derme dorsal et ventral.**

Schéma d'un embryon de poulet de 2 jours (**E2**), *in toto* et en coupe transversale, les futurs progéniteurs du derme dorsal sont inclus dans le mésoderme présomitique bordant le tube neural, alors que les progéniteurs du derme ventral sont inclus dans le mésoderme somatopleural. Le schéma de la coupe transversale d'un embryon de poulet de 3 jours (**E3**) montre la formation du dermomyotome, contenant les progéniteurs du derme dorsal. A 5 jours (**E5**), les progéniteurs dermiques dorsaux et ventraux sont situés sous l'ectoderme.  
c, corde ; tn, tube neural.

L'irradiation aux rayons X de trains de somites (Mauger, 1970), ainsi que des transplantations hétérotopiques de bandes de mésoderme somitique ou présomitique prélevées dans différentes régions de l'axe antéro-postérieur (Mauger, 1972), ont mis en évidence que chaque somite est déterminé dès 2 jours à former une région spécifique du derme de la ptéryle spinale. L'excision du tube neural et de la corde chez des embryons de poulet de 2 jours provoque huit jours après l'opération une absence de la ptéryle spinale (Mauger and Sengel, 1970; Olivera-Martinez et al., 2001), ainsi que des dérivés médians du somite tels que les vertèbres et les muscles épaxiaux (Rong et al., 1992; Teillet et al., 1998). La greffe de la moitié dorsale du tube neural dans la région excisée entraîne la différenciation d'un derme phanéroène, la spécification des précurseurs dermiques dorsaux dépend donc de facteurs moléculaires présents dans le tube neural dorsal, en particulier Wnt-1 (Olivera-Martinez et al., 2002; Olivera-Martinez et al., 2001). Par ailleurs, l'implantation d'un fragment de tube neural dans le territoire présomptif de l'aptérie médio-ventrale aboutit à la formation d'une ptéryle supplémentaire (Kieny and Sengel, 1964; Sengel and Kieny, 1967a; Sengel and Kieny, 1967b). Des facteurs présents dans le tube neural, en l'occurrence Noggin et Shh, sont donc capables d'induire la spécification d'un derme phanéroène au sein du mésoderme somatopleural (Fliniaux et al., 2004).

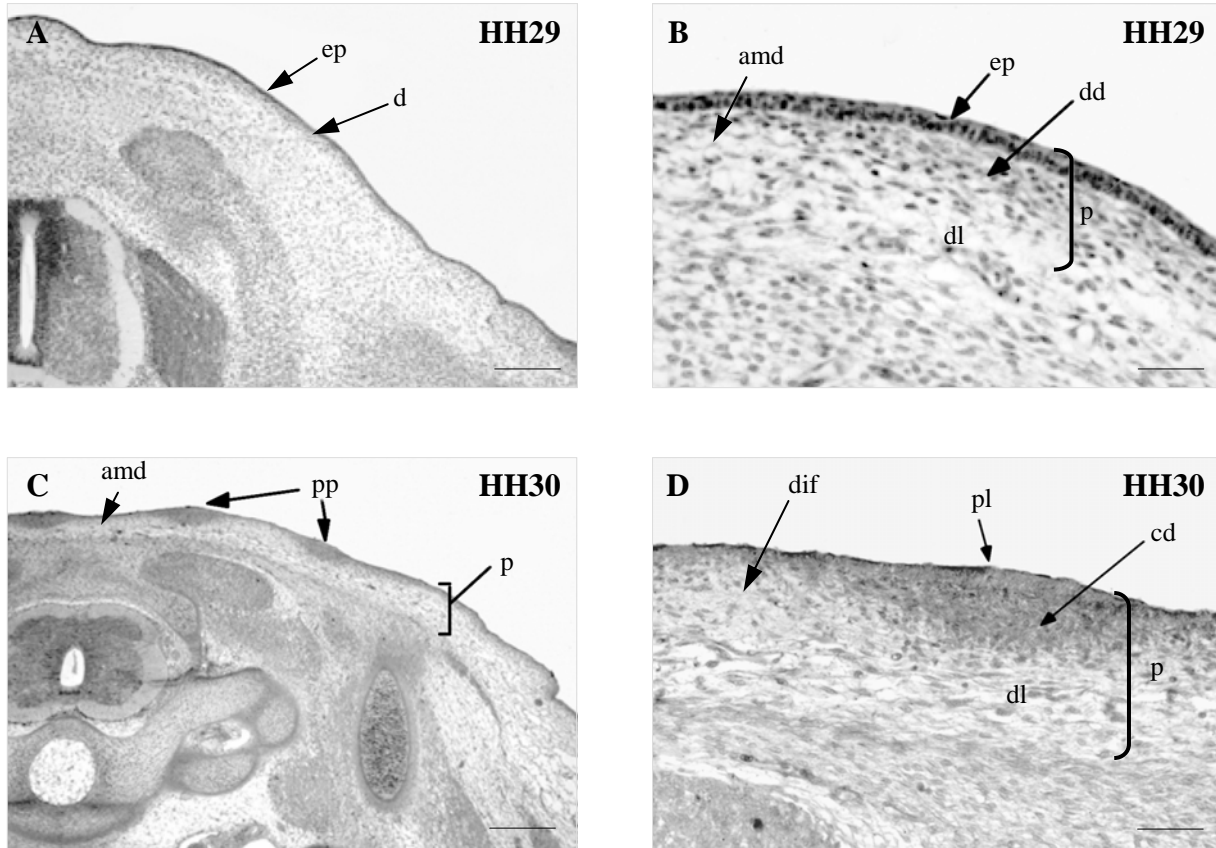
La formation du derme de la ptéryle dorsale du poulet a été étudiée récemment dans notre laboratoire. Entre le deuxième et le troisième jour d'incubation, les somites, contenant les précurseurs du derme dorsal, des muscles striés, des vertèbres et des côtes, se segmentent à partir du mésoderme paraxial. La partie ventrale du somite se désépithélialise et forme le sclérotome qui donnera ultérieurement les précurseurs des vertèbres et des côtes (Pourquie, 2001). La partie dorsale du somite, le dermomyotome, reste dans un premier temps épithéliale. Le dermomyotome donne naissance aux précurseurs des muscles striés respectivement dorsaux et hypaxiaux (muscles des membres et de la région ventrale du tronc)

(Pourquie, 2001) ainsi qu'aux précurseurs dermiques (Mauger, 1972), mais leur localisation et les molécules impliquées dans leur spécification et leur migration n'ont été identifiées que récemment (Houzelstein et al., 2000; Olivera-Martinez et al., 2000; Olivera-Martinez et al., 2002; Olivera-Martinez et al., 2001). Toutes les parties du dermomyotome participent de façon inégale à la formation du derme dorsal. A 3 jours d'incubation, une première population de fibroblastes apparaît entre le tube neural et l'ectoderme. Elle comprend les précurseurs du derme médiodorsal ainsi que ceux du processus épineux des vertèbres (Monsoro-Burq and Le Douarin, 2000). A 4 jours d'incubation, la partie centrale du dermomyotome perd sa structure épithéliale, et forme une deuxième population de cellules mésenchymateuses sous-ectodermique dorso-latérale. La lèvre médiodorsale disparaît lors du cinquième jour d'incubation, ayant cessé sa fonction de centre de prolifération cellulaire. Entre 6 et 7 jours d'incubation, le mésenchyme homogène sous-ectodermique se différencie en derme superficiel dense et en derme profond lâche (Fig. 2A). Wessels a montré en 1965 (Wessels, 1965) que les futurs champs phanéroènes se caractérisent par une densité élevée en cellules dermiques (jusqu'à 2,6 noyaux /1000  $\mu\text{m}^3$ ). En dehors de ces zones de derme dense, les phanères se développent moins vite et de façon dispersée (au niveau des semi-aptéries) ou pas du tout (au niveau des aptéries). Les paragraphes suivants sont consacrés à l'observation de l'élaboration du derme au niveau de la ptéryle spinale. La région de densification du derme superficiel correspond précisément à la ptéryle spinale. Au niveau thoracique alaire, le derme situé sous la future aptérie médio-dorsale reste lâche. Le derme dense est non seulement plus riche en cellules, mais aussi en matrice extracellulaire. De façon concomitante, à partir du cinquième jour d'incubation, l'ectoderme, jusqu'alors constitué d'une seule couche de cellules, génère en surface une deuxième couche de cellules aplaties au noyau allongé que l'on nomme le périoderme. La couche basale forme désormais l'épiderme proprement dit, qui se stratifiera au cours du développement.

## **IV. Événements morphogénétiques et interactions tissulaires à l'origine du primordium de phanère**

### **1. Formation du primordium de phanère**

Précédent la formation des ébauches de phanère, le derme dorsal de l'embryon de poulet se densifie afin d'atteindre le seuil de 2,6 cellules/1000 $\mu\text{m}^3$ . A 6,5 jours d'incubation (E6.5), correspondant au stade Hamburger-Hamilton 29 (HH29 (Hamburger and Hamilton, 1951)), en présence d'une peau homogène composée d'un épiderme et d'un derme dense sous jacent. Les placodes apparaissent le long de la ligne médio-dorsale. Ces dernières résultent de l'allongement de l'axe apico-basal de certaines cellules épidermiques, menant à la formation d'arches d'actine permettant l'ancrage des cellules dans le derme. Ce dernier, sous l'influence du microenvironnement mis en place, se redistribue par migration afin de faire apparaître sous la placode les condensations dermiques, zones à fortes densité cellulaires (3,2 cellules/1000 $\mu\text{m}^3$ ). Dans la zone interfolliculaire la densité cellulaire diminue (1,2 cellules/1000 $\mu\text{m}^3$ ). A HH30 (7 jours d'incubation), les premières ébauches de phanères sont en place (Fig. 2B). Elles sont composées d'une placode et d'une condensation dermique, elles portent alors le nom de primordium de phanère (**Fig. 4**). A 8,5 jours d'incubation, le bourgeon plumaire présente une asymétrie due à une prolifération différentielle entre la face antérieure et la face postérieure du bourgeon : 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 et constitue le follicule plumaire.



**Figure 4 : Apparition des primordia de phanère à partir d'une peau homogène dans la peau embryonnaire dorsale d'embryons de poulet de stades HH29 et stage HH30.**

Une coupe transversale au niveau thoracique, la peau (p) d'un embryon de poulet montre un derme (d) homogène couvert d'un épiderme (ep) (A). A ce stade, le derme est composé d'un derme dense (dd) et d'un derme lâche (dl) en profondeur (B). Au stade HH30, des primordia plumaires (pp) sont apparus au sein de la peau (C). Les primordia sont composés d'une placode (pl) épidermique et d'une condensation dermique (cd). Entourant les primordia, le derme interfolliculaire (dif) est moins dense, tout comme dans l'aptérie médiodorsale (amd) (D).

Coloration Hematoxyline / Scarlett Biebrich (A-D).

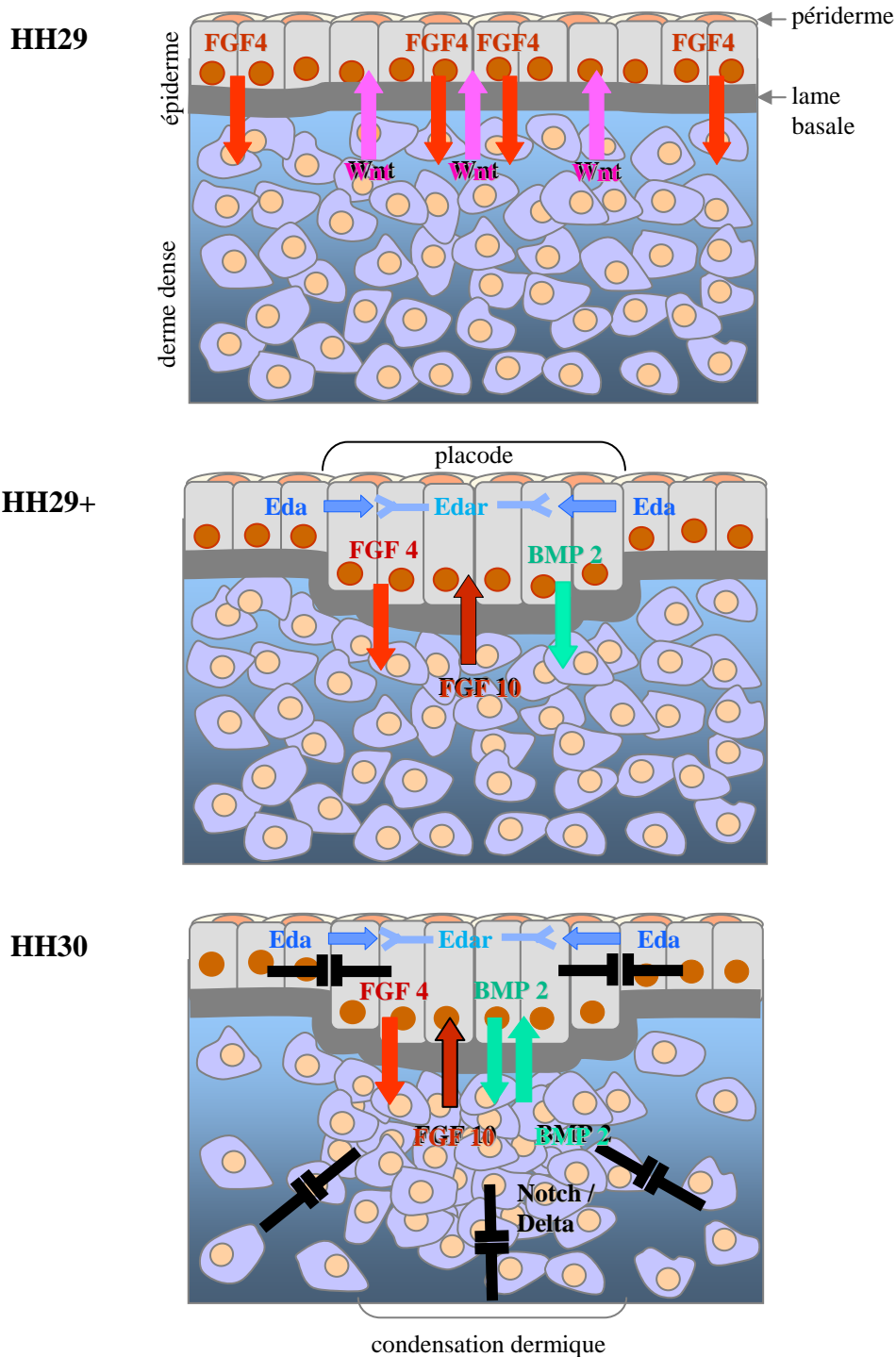
Barres : A, 300µm; B et D, 100µm; E, 400µm.



## 2. Interactions tissulaires

Une fois le derme mis en place, un dialogue nécessaire à la formation des primordia de phanère s'établit avec l'épiderme. Lorsque le derme dépasse le seuil de densité cellulaire de  $2,6 \text{ cellules}/1000\mu\text{m}^3$ , un premier message inducteur ubiquitaire permet à l'épiderme d'initier sa différenciation (Dhouailly, 1977). Chez la souche de poulet mutant *Scaleless*, qui présente une absence quasi totale de plumes et une absence totale d'écailles, le derme dense des futures ptéryles se forme (Viallet et al., 1998) et est capable d'induire la formation de placode dans un épiderme de souche sauvage (Goetinck and Sekellick, 1972). Les cellules de la placode à leur tour induisent l'organisation du derme en condensations dermiques (Cadi et al., 1983), qui vont permettre la transformation des placodes en bourgeons de phanères.

Entre un message inter-tissulaire et son message réciproque, tous deux médiés par des molécules diffusibles, s'intercalent des messages intra-tissulaires épidermiques, ou dermiques, médiés par des protéines transmembranaires ou diffusibles. Ces interactions synchronisent les étapes de morphogénèse épidermique et dermique. Les messages intra-tissulaires vont soit déclencher un autre message, soit permettre la stabilisation des différentes structures dermique et épidermique formées. Ce dialogue se poursuit lors de la croissance et de la morphogénèse des phanères. En particulier des interactions intra-épidermiques permettent la différenciation des cellules en plusieurs sous-populations constituant les sous-structures du phanère (**Fig. 5**).



**Figure 5 : Schéma du dialogue intra- et inter-tissulaire impliqué lors de la morphogénèse cutanée du champ plumaire (ptéryle) dorsal de l'embryon de poulet.**

Ce dialogue est initié par un message Wnt dermique ubiquitaire qui induit l'expression d'Eda dans l'épiderme, permettant la mise en place de la placode. L'expression de FGF-4 est nécessaire à l'organisation du derme, c'est un message permissif. Ce dialogue induit la mise en place des structures du primordium (placode et condensation dermique) qui seront stabilisées par la signalisation Notch (d'après les résultats, entre autres de Drew et al. 2007, Noramly et al. 1998, Patel et al. 1999, Mandler et al. 2004, Chuong et al. 1996, Dhouailly et al. 1998).

## **V. Aspects moléculaires de la formation du primordium de phanère**

Les différents évènements morphogénétiques que je viens de décrire, prolifération cellulaire, migration, ainsi que les interactions tissulaires, conduisant d'une peau embryonnaire primitivement homogène à une peau hétérogène présentant des primordia de phanère régulièrement distribués à sa surface, fait intervenir différents processus à l'échelle moléculaire que je vais m'attacher à décrire maintenant.

### **1. La signalisation calcique**

Cette voie de signalisation est impliquée dans la dynamique de migration cellulaire, dans la restructuration du cytosquelette d'actine, ainsi que dans l'expression de certains gènes et dans la transduction de voies de signalisation. J'en parlerai donc à plusieurs reprises lors de différents sous-chapitres (V.3 et V.4 en particulier).

### **2. Prolifération cellulaire**

De nombreuses expérimentations, *in vivo* et *in vitro*, ont montré une prolifération cellulaire dans la peau avant la formation des primordia, puis une exclusion de cette prolifération du domaine folliculaire lors de la mise en place du primordium ; enfin, une réinduction de la prolifération lors de la croissance du primordium en bourgeon (Desbiens et al., 1991; Jiang and Chuong, 1992; Rouzankina et al., 2004; Wessells, 1965; Wessells and Roessner, 1965). Différents facteurs, soit activant, soit inhibant la prolifération cellulaire dans la peau embryonnaire, devraient donc être exprimés dans la peau embryonnaire.

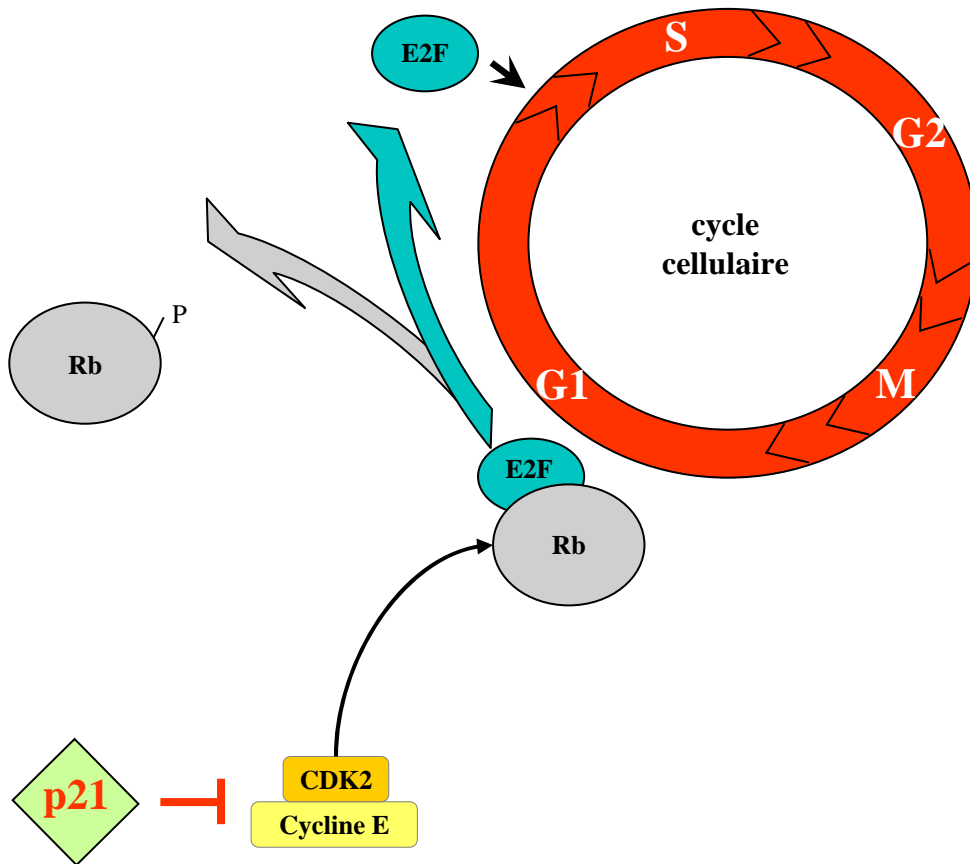
La transition entre les différentes phases du cycle cellulaire résulte de la présence dans le cytoplasme de complexes protéiques formés d'une Cycline et d'une « Cyclin-Dependant

Kinase » (CDK) (Koff et al., 1993). Cette dernière est composée de deux lobes, à leur intersection se trouve le site à activité kinase (Xiong et al., 1993b). A l'état inactif, le domaine catalytique est caché par le domaine PSTAIRE (du nom des acides aminés le composant) et la boucle T (Jeffrey et al., 1995). Lors de l'association à la Cycline, le domaine PSTAIRE change de conformation et accueille l'ATP nécessaire à la phosphorylation des substrats. La boucle T, quant à elle, expose les résidus régulateurs de la CDK (Thréonine 161, Thréonine 14 et Tyrosine 15). Cette association est donc indispensable à l'activation de la CDK, ainsi qu'à la régulation induite par des kinases et phosphatases ainsi que par les « Cyclin-dependent kinase inhibitor » (CKI) (Golias et al., 2004). Par exemple, la phosphatase Cdc25, en déphosphorylant les Thréonine 14 et Tyrosine 15, permet l'activation des complexes CDK-Cycline (Lam and Rosen, 2004). Le facteur diffusible Sonic Hedgehog est connu comme étant activateur de la prolifération cellulaire, par le biais de Cdc25B qui induit la transition G2/M (Benazeraf et al., 2006). Dans la famille des protéines CKI, se trouve p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (faisant partie des inhibiteurs Cip/Kip) dont l'expression dépend de p53 et qui est capable d'inhiber les complexes CDK2-Cycline E (**Fig. 6**), complexe essentiel à la transition G1/S (Sauer and Lehner, 1995).

#### i) Protéine p21<sup>WAF1/CIP1</sup>

##### **a-** *Implication dans l'arrêt de la transition G1/S*

La transition G1/S nécessite l'activation du complexe protéique CDK2-Cycline E, dont un gène cible est la protéine du Retinoblastome (pRb). Cette dernière, sous sa forme hypophosphorylée est capable de séquestrer les facteurs de transcription de la famille des E2F nécessaires à la transcription des gènes de la phase S (Hiebert et al., 1992; Schwarz et al., 1993). La phosphorylation de pRb est dépendante des complexes CDK-Cycline présent dans



**Figure 6 : Intervention de la protéine p21<sup>WAF1/CIP1</sup> lors de la régulation du cycle cellulaire.** Lors de la transition de la phase G1 à la phase S, il y a déséquestration de la protéine E2F par la protéine du Rétinoblastome (**Rb**) à la suite de la phosphorylation de cette dernière par le complexe CDK2-Cycline E. L'expression de la protéine p21<sup>WAF1/CIP1</sup> induit un blocage cette étape de phosphorylation, empêchant ainsi le passage de la cellule en phase S.

la cellule, entre autre de CDK4,6-Cycline D1 (présents en phase G1) et CDK2-Cycline E (Weinberg, 1995). La progressive phosphorylation de pRb en fin de phase G1 permet la libération des facteurs de transcription E2F et la transition en phase S (Hinds et al., 1992; Wang, 1997). La régulation du complexe CDK2-Cycline E est donc majeure pour la fonction de « checkpoint » entre les phases G1 et S (Sherr and Roberts, 1995). L'exposition de cellules à des facteurs génotoxiques induit l'expression de p21<sup>WAF1/CIP1</sup> qui va se lier au complexe CDK2-Cycline E (el-Deiry et al., 1994; Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993a), induisant ainsi une hypophosphorylation de pRb et donc un blocage de l'entrée en phase S et un arrêt du cycle cellulaire. De plus, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> peut se fixer au « Proliferating-Cell Nuclear Antigen » (PCNA) qui est nécessaire à la réparation et à la synthèse d'ADN (Waga et al., 1994).

#### **b- Implication cutanée de p21<sup>WAF1/CIP1</sup>**

Différents arguments laissent à penser que la protéine p21<sup>WAF1/CIP1</sup> serait impliquée dans l'homéostasie épidermique (Missero et al., 1995; Topley et al., 1999). Son expression est régulée par l'activation de la voie de signalisation médiée par Notch-1 (Mammucari et al., 2005; Okuyama et al., 2004). Une étude menée sur des souris Notch-1 KO a montré que l'expression de p21<sup>WAF1/CIP1</sup> disparaît de l'épiderme et que la souris présente une hyperplasie due à la prolifération continue des kératinocytes (Rangarajan et al., 2001). Il semblerait de plus que p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, couplé à E2F-1, puisse se fixer sur le promoteur de *wnt-4* et inhiber la transcription de ce gène (Devgan et al., 2005), connu pour être exprimé dans la peau lors de la cicatrisation (Saitoh et al., 1998). Enfin, Sonic Hedgehog, connu pour favoriser la prolifération cellulaire, pourrait bloquer l'action de p21<sup>WAF1/CIP1</sup> dans les épithélia pluristratifiés (Fan and Khavari, 1999).

## ii) Sonic Hedgehog (Shh)

La molécule Hedgehog (Hh) a d'abord été caractérisée chez la Drosophile. Les mutants pour ce gène présentent des denticules désordonnés sur le corps rappelant le hérisson, d'où le nom Hedgehog (Mohler, 1988). Trois homologues de cette molécule ont été clonés chez les vertébrés. Deux d'entre eux ont été nommés d'après des races de hérisson (Desert hedgehog : Dhh ; Indian hedgehog : Ihh), et le troisième Sonic hedgehog (Shh) vient du nom d'un personnage de jeux vidéo. Sonic Hedgehog, le plus caractérisé des homologues vertébrés, peut agir soit à courte distance, soit à longue distance en tant que morphogène diffusible (Chuang and McMahon, 1999).

### **a-** *La voie de signalisation Hedgehog chez la Drosophile*

La molécule Hh présente dans le domaine extracellulaire se lie à la protéine transmembranaire Patched (Ptc), empêchant cette dernière d'inhiber une autre protéine transmembranaire, Smoothened (Smo). La voie de signalisation mise en jeu converge vers la protéine Cubitus interruptus (Ci), qui peut agir soit comme répresseur de transcription de gènes cible en absence de liaison de Hh à Ptc, soit comme activateur de transcription suite à l'association de Hh à Ptc (**Fig. 7**). Lorsque Hedgehog se lie à Patched, Smoothened n'est plus réprimé et envoie un signal qui active Fused et réprime Costal-2, ce qui dissocie le complexe Cos-2/Fu/Ci des microtubules et empêche le clivage de Ci. Dans le complexe détaché des microtubules, Ci subit probablement une maturation en une forme translocable dans le noyau qui régule positivement des gènes cible comme *dpp* (*decapentaplegic*, l'homologue et peut-être orthologue chez la Drosophile de la famille des *tgf- $\beta$*  et plus particulièrement BMP-2 et BMP-4 chez les vertébrés (Panopoulou et al., 1998)), *wg* et *ptc* lui-même. Cette transactivation pourrait requérir l'association du coactivateur de transcription de la « CREB-

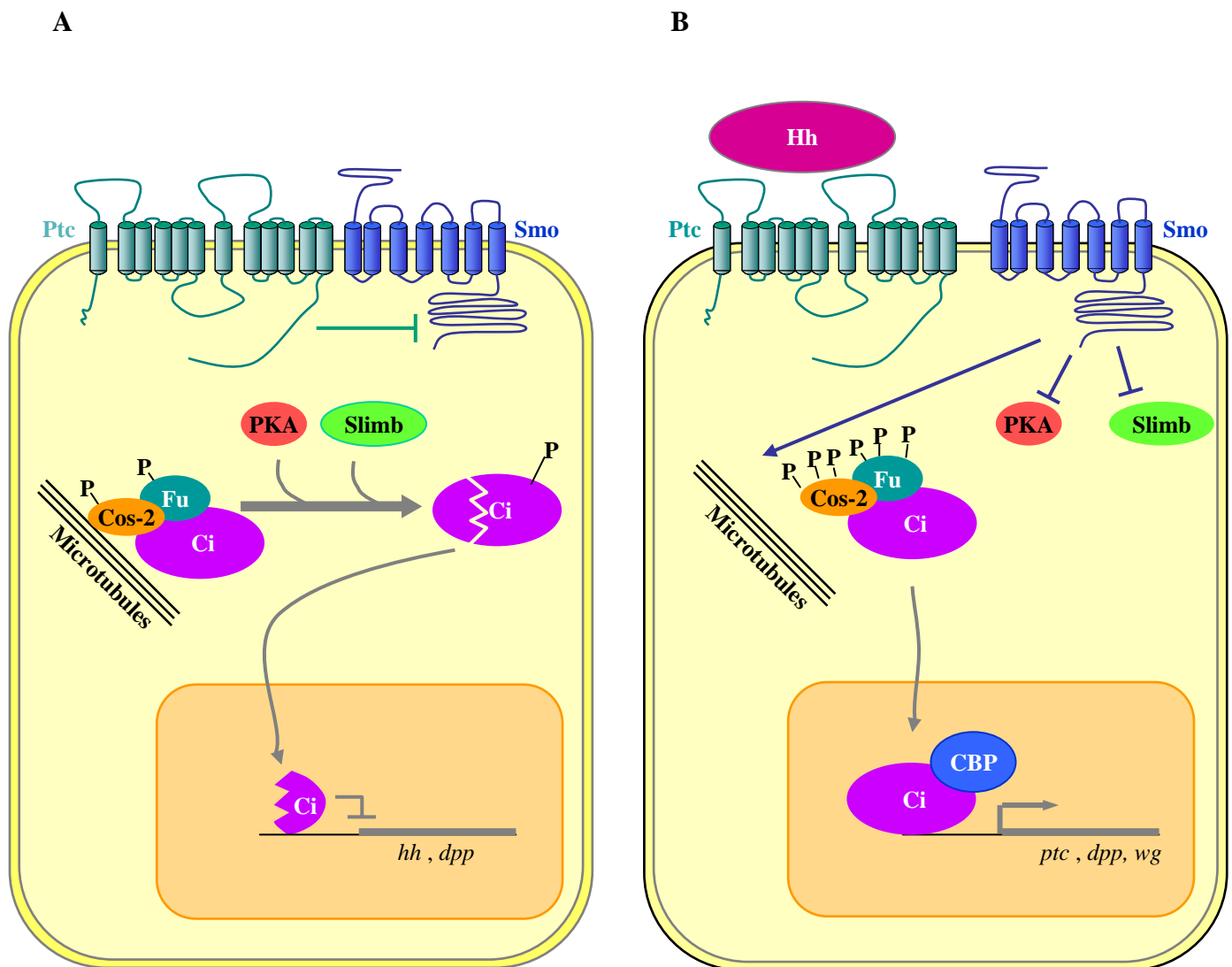
binding protein » (CBP ; CREB : Cyclic AMP Response Element Binding) dans le noyau (Akimaru et al., 1997).

**b- La voie de signalisation Hedgehog chez les vertébrés**

Cubitus interruptus est un membre de la famille des Gli (nom provenant d'oncogènes associés à des tumeurs du glioblastome), dont trois membres ont été identifiés chez les vertébrés : Gli-1, Gli-2 et Gli-3 (Lee et al., 1997; Platt et al., 1997). Une signalisation Shh ectopique, par injection d'ADN exprimant *gli-1* chez le Xénope ou en transfectant des bourgeons d'aile de poulet avec le rétrovirus RCAS exprimant le gène *gli* aviaire, induit l'expression de *gli-1* et réprime *gli-3* (Lee et al., 1997; Marigo et al., 1996). *In vitro*, Gli-1 est capable d'activer et Gli-3 de réprimer la transcription de gènes (Marino et al., 1997; Sasaki et al., 1997). Il est donc possible que, chez les vertébrés, Gli-1 joue le rôle de la forme activatrice de Ci et Gli-3 après sa protéolyse, le rôle de la forme processée de Ci répressive de transcription (Wang et al., 2000). Il pourrait donc y avoir une régulation plus fine de la signalisation médiée par Shh en fonction des protéines Gli présentes dans différents compartiments embryonnaires. Le rôle de Gli-2 n'est pas encore clair, mais il pourrait avoir une certaine redondance avec Gli-3 (Mo et al., 1997).

Shh est impliqué dans une multitude d'événements du développement embryonnaire, notamment dans le contrôle de la polarité antéro-postérieure du bourgeon de membre (Riddle et al., 1993), ainsi que sur la régionalisation du tube neural (Ericson et al., 1997), ainsi que lors de la morphogénèse cutanée.





**Figure 7 : Voie de signalisation médiée par les protéines Hedgehog chez la Drosophile.**

Le récepteur Patched (**Ptc**) inhibe la protéine transmembranaire Smoothened (**Smo**). Dans le cytoplasme, la protéine Cubitus interruptus (**Ci**) forme un complexe protéique attaché aux microtubules comprenant Costal-2 (**Cos-2**) et Fused (**Fu**). Ci peut être clivé par la Protéine Kinase A (**PKA**) et ubiquitiné par la protéine Slimb. Le domaine N-terminal est transloqué dans le noyau et agit comme répresseur de transcription de gènes cibles comprenant *hh* lui-même et *decapentaplegic* (*dpp*) (A).

Lorsque Hedgehog (**Hh**) se lie au récepteur transmembranaire Ptc, la protéine Smo n'est plus inhibée. Smo induit la dissociation du complexe associé aux microtubules, et réprime l'action de la PKA et de Slimb. Ci est transloqué entier dans le noyau où il s'associe à CREB Binding Protein (**CBP**) et agit comme un activateur de transcription de gènes cibles comprenant notamment *ptc*, *dpp* et *wingless* (*wg*) (B).

### **c- Signalisation Shh lors de la mise en place du primordium de plume**

L'expression de Shh dans la peau n'est détectée que lorsque le primordium est constitué (placode et condensation dermique), au niveau du centre de la placode (Nohno et al., 1995). Sa fonction semble être l'induction de la prolifération nécessaire à la croissance du bourgeon plumaire (McKinnell et al., 2004b). Cette hypothèse est renforcée par les expérimentations d'expression ectopique de Shh dans la peau embryonnaire de poulet menant à une prolifération anarchique de l'ectoderme (Morgan et al., 1998), et par l'implication de Shh dans les cancers de la peau (pour revue, (Athar et al., 2006)). D'autres études ont montrées que la greffe de cellules exprimant Shh et Noggin au niveau de l'amnios de l'embryon de poulet permettait la mise en place d'une peau portant des plumes (Fliniaux et al., 2004). Dans ce cas, Noggin inhibe la signalisation BMP et Shh pourrait concourir à l'inhibition de la signalisation BMP, soit permettre la prolifération du mésoderme amniotique jusqu'à l'état de derme dense.

Outre ce rôle concernant la prolifération, Shh pourrait aussi jouer un rôle sur la migration cellulaire lors de la morphogénèse cutanée. En effet, une étude a montré un lien direct entre l'expression de Shh et la présence membranaire de l'Intégrine- $\beta$ 1 dans l'épithélium intestinal. La perte d'expression de l'Intégrine induit la perte d'expression de Shh (Jones et al., 2006).

### **3. Migration cellulaire et modifications morphologiques**

Que ce soit lors de la formation de la placode épidermique (allongement de l'axe apico-basal des cellules) ou lors de la formation de la condensation dermique (migration des fibroblastes sous la placode), les cellules vont subir de nombreux changements morphologiques impliquant leur environnement comprenant la matrice extracellulaire.

### i) Matrice extracellulaire

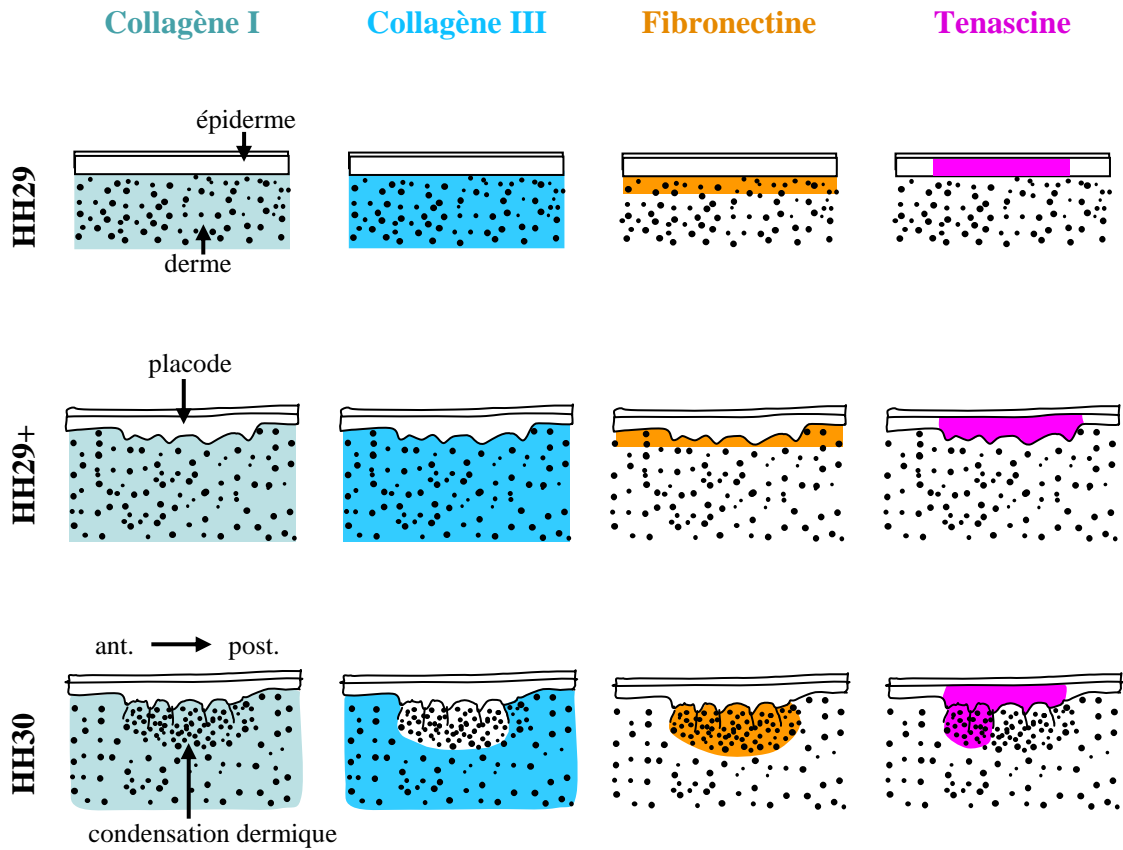
Le derme, comme tous les tissus conjonctifs, est composé de cellules dispersées dans une matrice extracellulaire conséquente. De plus, l'interaction entre l'épiderme et le derme se fait par le biais d'une lame basale, fine couche de matrice extracellulaire dense sur laquelle s'ancre le pôle basal des cellules épidermiques. Les principaux composants des matrices extracellulaires sont les Collagènes, les Glycoaminoglycanes, la Laminine, la Tenascine et la Fibronectine.

Les différents Collagènes (il en existe 28 types) sont exprimés de façon soit tissu-spécifique soit structure-spécifique. Le Collagène XII est présent principalement dans les cartilages, mais aussi dans le stroma cornéen. Alors que le Collagène IV est caractéristique des lames basales, dans le derme sont exprimés les Collagènes I et III, et dans le stroma cornéen, les Collagènes I et V. La Laminine est une famille de glycoprotéines contenant 15 membres pouvant s'associer entre eux pour former des trimères. Ces protéines sont synthétisées par les cellules épithéliales afin de former un réseau de mailles au sein de la lame basale, et s'associent au Collagène IV. La Fibronectine est une grande molécule homodimérique composée d'une succession de modules. Le module III comporte le motif RGD de liaison à la cellule. Elle comporte aussi des motifs de liaison à l'Héparine et au Collagène. La Tenascine est une glycoprotéine possédant un motif RGD (Arg – Gly – Asp) permettant la fixation d'un récepteur membranaire. Cette molécule a des propriétés adhésives ou antiadhésives, en fonction du type cellulaire considéré. Les cellules de l'épiderme expriment la Tenascine d'abord dans la future région de la placode, puis de façon asymétrique dans la portion antérieure de la placode (Jiang and Chuong, 1992).

La Fibronectine, la Laminine et le Collagène IV sont les principaux composants de la lame basale. Lors d'expérimentations de dissociation et réassociation de derme et d'épiderme de peau embryonnaire de poulet, la formation de la lame basale a pu être suivie (Akimoto et

al., 1992). La Laminine et la Fibronectine sont exprimées très rapidement après la réassociation, puis il y a expression de la Tenascine (absente de la lame basale *in vivo*) et enfin du Collagène IV. La composition des matrices extracellulaires de la lame basale et du derme permettent de délimiter les futures zones folliculaires des zones interfolliculaires (Jiang and Chuong, 1992; Mauger et al., 1982; Mauger et al., 1984) (**Fig. 8**).

La matrice extracellulaire de la partie supérieure du futur derme de poulet de cinq jours d'incubation comprend le Collagène I, seule molécule de la matrice extracellulaire ayant une distribution spécifique (Mauger et al., 1982). A six jours d'incubation, alors que le derme se densifie, les Collagène I et III sont exprimés sur toute l'épaisseur du derme dense alors que la Fibronectine est exprimée dans la partie supérieure du derme (Mauger et al., 1982). Lors de la formation des condensations dermiques, le Collagène I garde une distribution homogène alors que la Fibronectine se retrouve renforcée dans la condensation dermique et à l'inverse, le Collagène III en est exclu (Mauger et al., 1982). Le N-CAM (un récepteur de l'adhérence intercellulaire) est exprimé quant à lui par les cellules de la région antérieure de la condensation dermique ainsi que par celles de la région postérieure de la placode (Jiang and Chuong, 1992). Des expérimentations visant à bloquer ces molécules en cultures organotypiques ont été menées afin de déterminer leurs fonctions. L'utilisation d'anticorps bloquant dirigés contre la Fibronectine ou l'Intégrine- $\beta$ 1 mène à l'inhibition de la formation des condensations dermiques, alors qu'en bloquant le N-CAM ou la Tenascine, il y a principalement une diminution de taille des primordia couplée à une perturbation du micropattern (Jiang and Chuong, 1992). Enfin, notons que les Glycoaminoglycanes (GAG) dont l'Héparane Sulfate, sont synthétisés dans le derme de la peau embryonnaire sous l'influence de FGF-2 (Song et al., 2004). Cette molécule est impliquée dans la rétention des morphogènes, tels que les FGFs et les BMPs, dans la matrice extracellulaire pouvant soit potentialiser leurs effet en les concentrant, soit les inhiber en les séquestrant.



**Figure 8 : Domaines d'expression de protéines de la matrice extracellulaire.**

Lors de la morphogénèse cutanée, entre HH29 et HH30, le Collagène I est exprimé dans toute l'épaisseur du derme. Le Collagène III est exclu de la condensation dermique. La Fibronectine est exprimée dans la partie supérieure du derme puis, son expression est renforcée dans la condensation dermique. La Tenascine est exprimée dans l'épiderme préplacodal à HH29, puis dans la placode à HH29+. A HH30 elle est également exprimée dans la partie antérieure de la condensation dermique

## ii) Les Intégrines

Ce sont les récepteurs d'adhérence à la matrice extracellulaire. Il s'agit de protéines hétérodimériques composées d'une sous-unité  $\alpha$  et une  $\beta$ . Il existe 18 isoformes  $\alpha$  et 8 isoformes  $\beta$ . Les différentes associations de ces sous-unités induisent une forte spécificité vis-à-vis de ses ligands ( $\alpha_1\beta_1$  est spécifique des Collagènes alors que l' $\alpha_V\beta_6$  est spécifique de la Tenascine).

Ces récepteurs ont une transduction de signalisation bidirectionnelle : le passage des Intégrines de la forme inactive à la forme active résulte d'un changement de conformation provoqué par une modification des partenaires protéiques associés à la queue intracytoplasmique des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (Takagi et al., 2002), c'est une transduction « inside-out » pouvant venir par exemple de l'activation de la «  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dependant protein Kinase II » (CaMKII) (Bouvard et al., 1998), la signalisation calcique et la balance d'activation CaMKII/Calcineurine permet la dynamique haute/basse affinité des Intégrines. Sous leur forme activée, les Intégrines vont alors se fixer à leurs ligands. En fonction de la présence et de la nature de ceux-ci, cette liaison peut modifier le niveau de phosphorylation des protéines associées aux Intégrines, induire la réorganisation du cytosquelette d'actine qui est en interaction avec les Intégrines, et provoquer de façon plus tardive la modification du transcriptome des cellules considérées, il s'agit alors d'une signalisation « outside-in » (Clark and Brugge, 1995; Takagi et al., 2002). La transition de la forme inactive à la forme active peut être aussi obtenue par l'adjonction dans le milieu de culture de Manganèse. Ce cation se fixera sur le domaine MIDAS de l'Intégrine, empêchant alors le retour à la forme inactive (Olsen and French-Constant, 2005; Werfel et al., 1996).

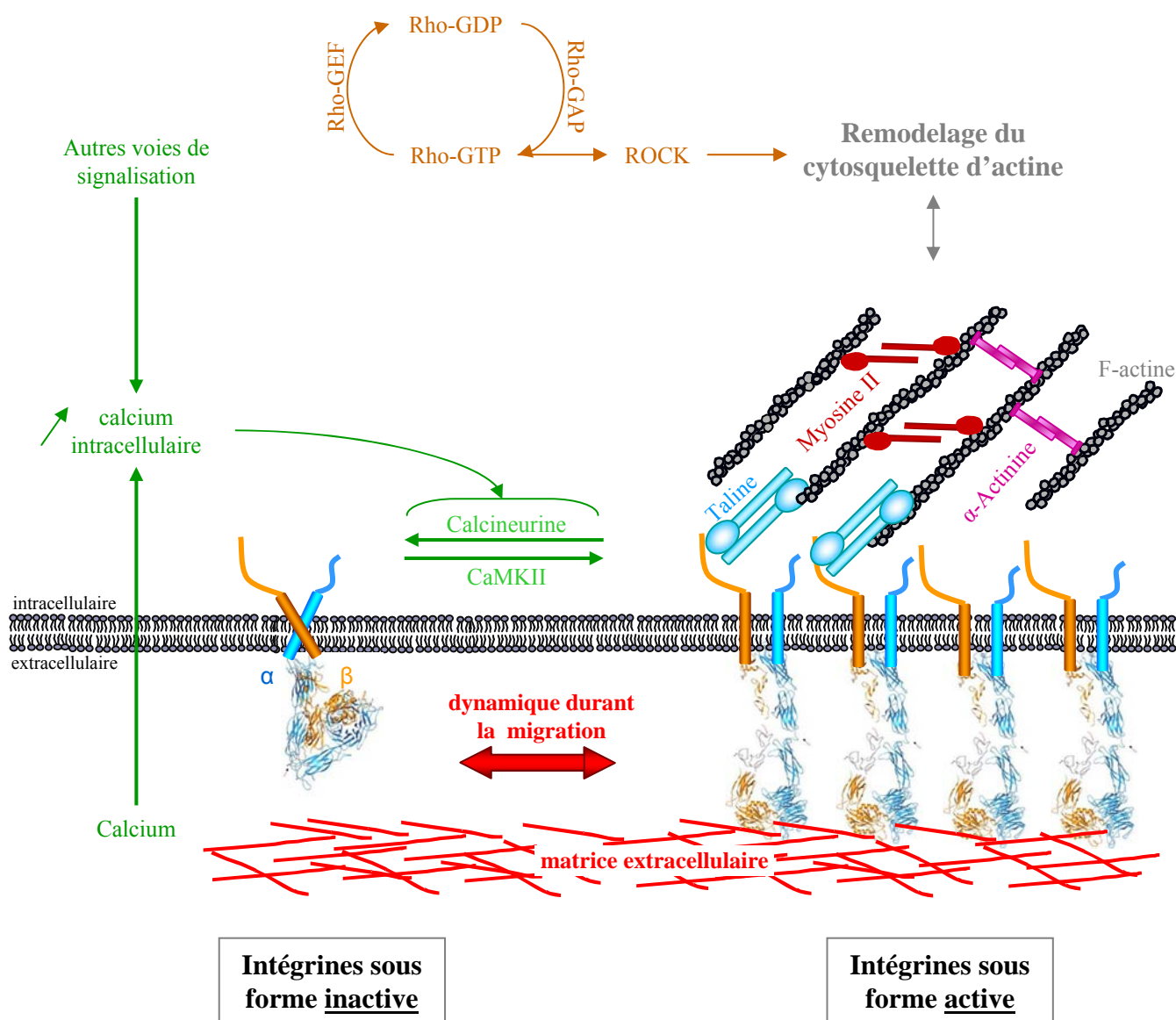
Dans la peau embryonnaire dorsale de poulet, seule l'Intégrine- $\beta_1$  a été étudiée (Jiang and Chuong, 1992; Song et al., 1994). Elle est exprimée tout d'abord dans le derme médio-

dorsale, zone d'apparition des premières condensations dermiques, puis est répartie dans le derme phanéroène. Une inhibition de sa fixation à la matrice extracellulaire, à l'aide d'un anticorps bloquant, empêche la formation des condensations.

### iii) La migration cellulaire

Ce phénomène cellulaire est impliqué dans toutes les étapes de morphogénèse et d'embryogénèse. Il requiert une synchronisation entre la dynamique de polymérisation-dépolymérisation du cytosquelette d'actine et le changement d'affinité des Intégrines (**Fig. 9**).

En avant du front de migration, la polymérisation orientée du cytosquelette d'actine couplée à la formation de contacts focaux par les Intégrines se fixant à leurs ligands permet l'allongement de la cellule et la mise en tension du cytosquelette d'actine cortical. Le détachement des Intégrines de leurs ligands, par leur passage en basse affinité, permet une rétraction du corps cellulaire diminuant la tension du cytosquelette cortical. Ce phénomène nécessite donc une polarisation de la cellule avec un front de migration où il y a une activation des Intégrines en haute affinité et une forte polymérisation du cytosquelette d'actine qui leur est associé. Par contre, au niveau de la partie arrière de la cellule, intervient une inactivation des Intégrines et une dépolymérisation du cytosquelette d'actine. Une des voies de signalisation intracellulaire ayant été impliquée dans ce passage de haute à basse affinité et pouvant réguler la migration cellulaire est la voie calcique. La balance d'activation entre la phosphatase Calcineurine et la CaMKII, deux protéines calcium-dépendantes, est importante, puisque la première, en phosphorylant la partie cytoplasmique de l'Intégrine, provoque le passage de basse à haute affinité pour le ligand ; alors que la seconde, en déphosphorylant ces résidus induit le passage de haute à basse affinité de l'Intégrine (Hartfield et al., 1993; Hyduk et al., 2007; Hyduk and Cybulsky, 2002).



**Figure 9 : Dynamique de l'affinité des Intégrines lors de la migration cellulaire.**

L'entrée de calcium dans la cellule active deux protéines antagonistes, la Calcium-Calmoduline dépendante Kinase II (**CaMKII**) et la phosphatase calcium dépendante Calcineurine. La phosphorylation du domaine intracellulaire de l'Intégrine va permettre le passage de basse affinité (Intégrine repliée ne pouvant se fixer à la matrice extracellulaire) à haute affinité (Intégrine pouvant se fixer à la matrice extracellulaire grâce à un changement de conformation). En haute affinité, la sous-unité  $\beta$  de l'Intégrine va interagir avec la Taline, créant un lien avec le cytosquelette d'actine.

En parallèle, l'activation de la petite protéine G Rho, à l'aide de la protéine GTPases Activating Protein (**Rho-GAP**), a un rôle direct dans l'assemblage dirigé des fibres d'actine (**F-actine**) par le biais d'une kinase dépendante de Rho (**ROCK**). Le retour de la petite protéine G à son état de repos nécessite l'intervention de la protéine Guanine nucleotide Exchange Factor (**Rho-GEF**).

L'assemblage du cytosquelette d'actine fait intervenir diverses protéines telles que l' $\alpha$ -Actinine et la Myosine.



Les Cadhérines ne sont pas directement impliquées dans la migration cellulaire, mais la perte de leur expression est un événement facilitateur de cette migration. Ce sont des protéines transmembranaires à interaction homophile et liant la  $\beta$ -caténine par leur domaine intracellulaire. Elles sont impliquées dans l'adhérence intercellulaire au sein des épithélia, nécessitant la présence de Calcium extracellulaire et une étude a montré une baisse d'expression de la E-Cadhérine par les cellules de la placode chez la souris, permettant ainsi une restructuration du cytosquelette d'actine, une perte d'adhérence afin de permettre l'invagination du bourgeon pileux, ainsi qu'une bonne transduction du signal Wnt canonique ( $\beta$ -caténine) (Jamora et al., 2003).

La migration cellulaire, comme la mise en place de la placode épidermique, nécessitent une bonne régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine.

#### iv) Protéines Rho et cytosquelette d'actine

Les protéines Rho appartiennent à la superfamille des petites GTPases Ras. Les plus connues sont RhoA, Rac1 et Cdc42. Mais 2 autres isoformes de Rho sont connues : RhoB et RhoC. Ces protéines existent sous 2 formes : l'une, liée au GTP, est dite active et peut activer une kinase dépendant de l'activité de Rho, ROCK ; la seconde, inactive, est liée au GDP. Le passage d'une forme à l'autre se fait par l'intervention de protéines : les RhoGEF (« Guanine nucleotide Exchange Factor ») permettant la liaison du GTP ; et les RhoGAP (« GTPases Activating Protein ») favorisant le retour à l'état inactif. L'impact de cette famille de protéines sur la dynamique de polymérisation / dépolymérisation du cytosquelette d'actine a été largement étudiée (Kaibuchi, 1999). Ces protéines sont impliquées dans le remodelage des fibres d'actine lors de la migration cellulaire (Raftopoulou and Hall, 2004), de plus, elles peuvent participer à la transduction de la signalisation « outside-in » (Hall, 1998; Nobes and

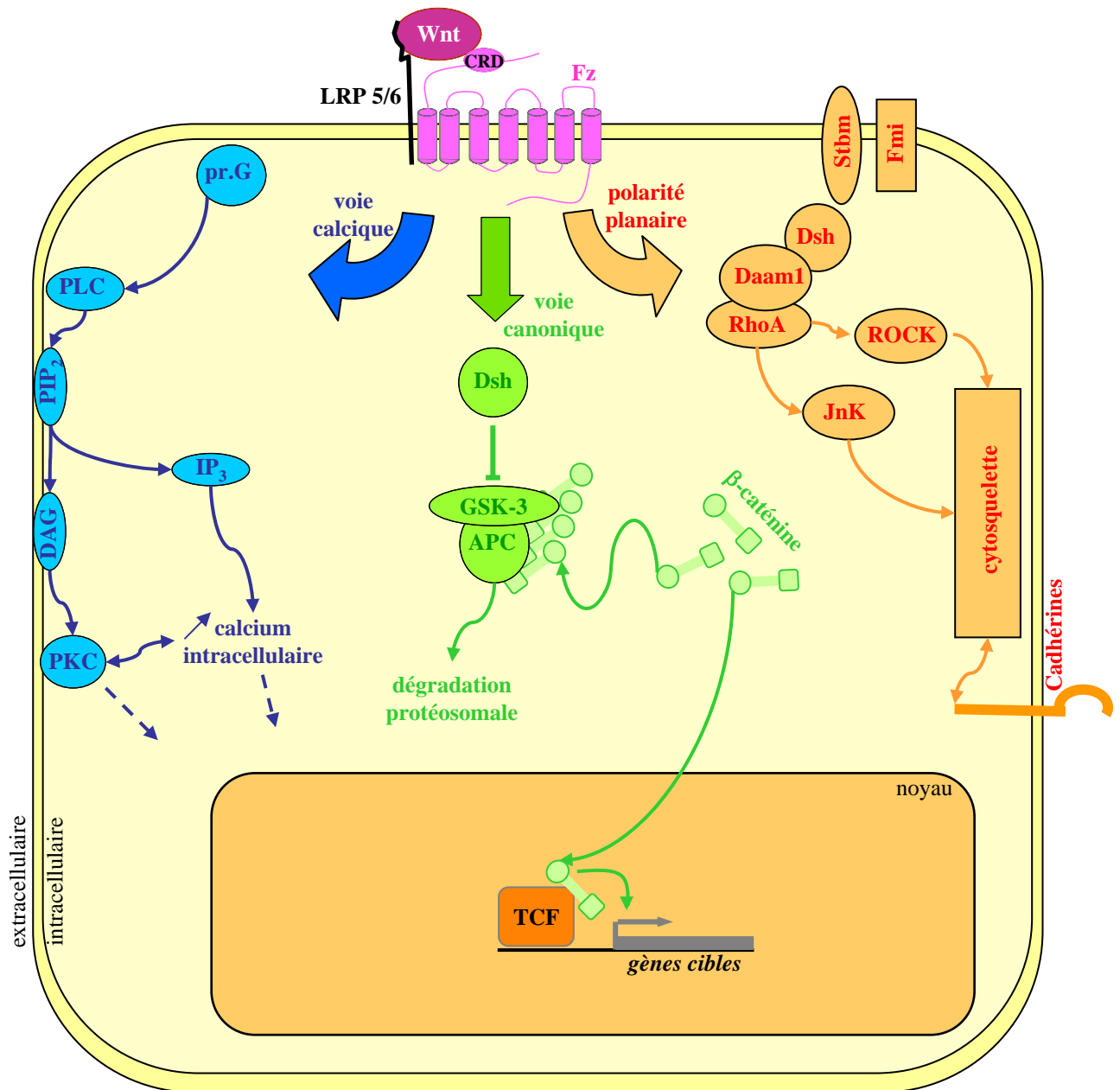
Hall, 1995). L'implication d'une protéine de cette famille, RhoB, ainsi que de la kinase ROCK, a déjà été montrée dans la mise en place de la placode, évènement nécessitant une réorganisation du cytosquelette d'actine (Maekawa et al., 1999; McKinnell et al., 2004a).

#### 4. Principaux facteurs diffusibles impliqués dans les dialogues tissulaires

Les facteurs diffusibles permettent la transmission d'un signal d'une cellule pour elle-même (autocrine) ou une autre (paracrine), à faible distance, mais pouvant passer la barrière de la lame basale. Je ferai ici une revue bibliographique des principales voies de signalisation impliquées lors de la morphogénèse cutanée.

##### i) Signalisation Wnt

Les molécules de la famille Wnt sont des protéines secrétées dont le nom provient d'une combinaison de « *int-1* » ou « *intercalaire* », gène découvert dans des tumeurs chez la souris (Nusse et al., 1984) (actuellement appelé Wnt-1) et de « *wingless* » qui est son homologue chez la Drosophile. Actuellement, plus de 100 gènes de la famille *wnt* ont été isolés chez différentes espèces allant de l'Homme à *Caenorhabditis elegans* (une liste régulièrement mise à jour des gènes *wnt* ainsi que des protéines impliquées dans ses voies de signalisation est disponible sur le site <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html> ). Les récepteurs des signaux Wnt appartiennent à la famille des Frizzled (Fz) (Bhanot et al., 1996). Trois voies de signalisation sont connues (**Fig. 10**) : la voie canonique, médiée par la  $\beta$ -caténine, la voie calcique, médiée par des protéines calcium-dépendantes, et la voie de polarité planaire, médiée par les Jun Kinases. Le nombre de facteurs Wnt, de récepteur Frizzleds et de voies de transduction induit une fine régulation de cette voie de signalisation



**Figure 10 : 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 qui 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 cellulaires.
- **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**).

lors de sa mise en œuvre, permise par l'expression de facteurs inhibiteurs tels que les Dickkopf ou des formes sécrétées des récepteurs.

#### **a- Facteurs diffusibles Wnt**

Les Wnts sont des protéines de 37 à 48 kDa possédant un domaine pratiquement invariant de 23 cystéines, qui agissent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires soit de façon autocrine, soit de façon paracrine. Les nombreux composants de la famille Wnt peuvent se subdiviser en 2 sous-classes selon leur capacité ou non à induire une duplication de l'axe du corps lorsque leurs ARNs sont injectés dans les blastomères ventraux de jeunes embryons de Xénope (McMahon and Moon, 1989). Les membres de la classe Xwnt-8 (dont Wnt-1, Wnt-3a et Wnt-7a font partie) sont capables d'induire la duplication de l'axe, tandis que les membres de la classe Xwnt-5a (dont Wnt-4, Wnt-5a et Wnt-6 font partie) n'en sont pas capables et pourraient même antagoniser ceux de la classe Xwnt-8 (Du et al., 1995; Moon et al., 1997a; Moon et al., 1993a; Moon et al., 1993b; Moon et al., 1993c; Torres et al., 1996; Wolda et al., 1993). Les deux classes emploieraient deux mécanismes de transduction du signal différents, l'un passant par la voie dite canonique, et l'autre par la voie utilisant le calcium intracellulaire, voies que je détaillerai un peu plus loin.

La glycosylation semble être requise pour le repliement correct, la sécrétion, et l'activité biologique des protéines Wnt (Smolich et al., 1993). Chez la Drosophile, le produit du gène *porcupine* (*porc*), qui est une protéine transmembranaire présente en majorité dans le réticulum endoplasmique, est un bon candidat pour la N-glycosylation de Wingless (Wg) (Kadowaki et al., 1996). D'autre part, la protéine chaperonne « immunoglobulin heavy chain binding protein » (BiP), associée au réticulum endoplasmique, a été montrée associée à Wnt-1 (Kitajewski et al., 1992). Chez la Drosophile, des mutations affectant des enzymes de synthèse de protéoglycannes (*sugarless* : *sgl* (une UDP-glucose déshydrogénase), et

*sulfateless* : *sfl* (héparane sulfate N-déacetylase/N-sulfotransférase)) entraînent des phénotypes comparables à celui observé lorsque *wg* est muté (Binari et al., 1997; Hacker et al., 1997; Haerry et al., 1997). Ainsi, comme pour les FGFs, les protéoglycannes semblent avoir un effet facilitateur sur la voie de signalisation Wnt. L'héparine a été montrée associée à Wnt-1, et l'addition d'héparine à un milieu conditionné en protéine Wg augmente l'activité de cette dernière (Bradley and Brown, 1990; Reichsman et al., 1996). Le rôle exact des protéoglycannes n'est pas connu, mais on peut supposer que, comme pour les FGFs, ils pourraient servir de cofacteurs à faible affinité pour les molécules Wnt, ce qui permettrait d'accroître la concentration en molécules Wnt près des récepteurs. Une autre possibilité serait que les protéoglycannes induisent un regroupement des récepteurs à la membrane plasmique.

#### **b- Récepteurs Frizzleds et co-récepteurs LRP**

Les récepteurs Frizzleds (Fz) sont des récepteurs à 7 hélices transmembranaires dont on dénombre 4 membres chez la Drosophile et une dizaine chez les vertébrés (<http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html> , (Kawakami et al., 2000)). Les protéines Wnt se lient au récepteur sur un site riche en cystéines (domaine CRD). L'activation du récepteur Fz provoque le recrutement et l'activation de Dishevelled (Dsh), une protéine cytoplasmique située à proximité de la membrane plasmique (Yang-Snyder et al., 1996). Les différents récepteurs Fz peuvent induire plusieurs voies de transduction (détaillées plus loin).

La famille des co-récepteurs LRP (« low-density lipoprotein (LDL)-receptor-related protein family ») est composée de longues protéines possédant un domaine transmembranaire. L'homologue chez la Drosophile, Arrow, est indispensable à la transduction du signal Wg (Baig-Lewis et al., 2007; Wehrli et al., 2000). Chez la souris, les mutations des co-récepteurs LRP induisent les mêmes phénotypes que les mutants Wnt (Pinson et al., 2000). De plus, chez le Xénope, la surexpression de LRP mène à l'activation de la signalisation Wnt (Tamai et al.,

2000). Des études contradictoires ((Tamai et al., 2000) vs (Mao et al., 2001; Wu and Nusse, 2002)) n'ont pas encore pu démontrer la formation d'un complexe ternaire entre Wnt-Fz-LRP, par contre, les interactions sur la partie intracellulaires sont bien déterminées. La queue intracellulaire est phosphorylée par deux kinases, la sérine/thréonine kinase « Glycogen Synthase Kinase 3 » (GSK3) et la CK1gamma (pour revue, (Nusse, 2005)), permettant la fixation sur le domaine intracellulaire de LRP de l'Axine, protéine impliquée dans la stabilité de la  $\beta$ -caténine (Tamai et al., 2004). De plus, il a été montré que LRP pouvait fixer directement le facteur Dickkopf (Dkk), inhibiteur de la signalisation Wnt (pour revue, (Nusse, 2001)). La fonction de chaque LRP commence à être mieux connue, par exemple, LRP5 est le co-récepteur de Wnt-5a avec Fz-4 (Mikels and Nusse, 2006), et sa mutation humaine perturbe le développement de l'os et de l'œil (Patel and Karsenty, 2002).

### c- Voie canonique ( $\beta$ -caténine)

La  $\beta$ -caténine (homologue d'Armado (Arm) chez la Drosophile) est une protéine qui joue un double rôle dans la cellule. C'est un composant des jonctions adhérentes associé au niveau de la membrane plasmique au domaine intracellulaire de la E-cadhérine (Aberle et al., 1994; McCrea et al., 1991). La  $\beta$ -caténine fonctionne également comme un facteur de transcription nucléaire. Lorsque la voie Wnt n'est pas activée, la  $\beta$ -caténine libre dans le cytoplasme est phosphorylée par la GSK-3, s'associe à un complexe APC phosphorylé/GSK-3 (APC signifie *Adenomatous Polyposis Coli*), et est rapidement dégradée par la voie ubiquitine-protéasome (Aberle et al., 1997). Seules les molécules de  $\beta$ -caténine présentes au niveau des jonctions adhérentes subsistent. La liaison des Wnts à leurs récepteurs membranaires entraîne l'inhibition de la dégradation de la  $\beta$ -caténine, Dsh inhibe la GSK-3 responsable de la phosphorylation puis de la dégradation de la  $\beta$ -caténine. Ceci conduit à la

stabilisation des molécules de  $\beta$ -caténine présentes dans le cytoplasme et à leur accumulation dans le noyau. La  $\beta$ -caténine forme alors un complexe transcriptionnel hétérodimérique avec un membre de la famille des facteurs de transcription « T-Cell Factor » (TCF) comprenant le TCF lui-même, « Lymphoid Enhancer Factor » (LEF) et pangolin (Behrens et al., 1996; Brunner et al., 1997) ce qui stimule la transcription de gènes cibles. Il faut noter que la  $\beta$ -caténine peut être activée par des mécanismes indépendants des Wnts (Papkoff, 1997; Papkoff and Aikawa, 1998).

#### **d- Voie calcique**

Dans cette voie, les Wnts se lient à d'autres récepteurs de la famille Fz (Frizzled-2 chez la Drosophile). Bien que les Wnts activent préférentiellement l'une ou l'autre des deux voies de transduction (Wnt/ $\beta$ -caténine ou Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ ), cette distinction n'est pas absolue et l'activité des Wnts dépend du répertoire de récepteurs et de cofacteurs présents à la surface cellulaire (pour revue, (Kuhl et al., 2000b; Miller et al., 1999)). L'alternative vers l'une ou l'autre des deux voies de transduction semble plutôt être spécifique du récepteur Fz activé. Les récepteurs transduisant la voie Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  sont couplés à une protéine G. L'activation du récepteur par une protéine Wnt libère la sous-unité  $\beta\gamma$  d'une protéine G qui active la Phospholipase C (PLC). Cette dernière clive alors le Phosphatidylinositol Biphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) pour générer de l'Inositol Triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) et du Diacylglycérol (DAG). Tandis que le DAG active la Protéine Kinase C (PKC), l' $\text{IP}_3$  permet le relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du réticulum endoplasmique. Le  $\text{Ca}^{2+}$  forme un complexe avec la calmoduline intracytoplasmique qui peut activer des kinases, comme la CAMKII, ou des phosphatases, comme la Calcineurine, ces protéines induisant elles-mêmes des réponses cellulaires (pour revue, (Kohn and Moon, 2005)).

**e- Voie de polarité planaire**

Des études menées chez la *Drosophile* ont permis d'identifier une nouvelle voie de signalisation Wnt non-canonique, impliquant d'autres protéines de surface, ainsi qu'une transduction de signalisation par les Jun kinases. Cette voie de signalisation est appelée voie de polarité planaire (« planar cell polarity », PCP), car elle contrôle la polarité des épithélia de la *Drosophile* (pour revue, (Axelrod et al., 1998; Shulman et al., 1998)). Par la suite, il a été montré que cette voie de signalisation était aussi impliquée lors de la gastrulation chez les vertébrés (Jones and Chen, 2007; Yamanaka et al., 2002).

Plusieurs protéines membranaires ont été impliquées dans cette voie de signalisation : Dachous (Ds), Flamingo (Fmi) et Fat (Ft) sont des protéines, que l'on retrouve de la *Drosophile* à la souris, ayant de fortes homologies avec les Cadhérines. Comme elles, elles vont faire intervenir des liaisons intercellulaires ; par exemple, la liaison de Ds et Ft permet la transduction d'un signal. La présence différentielle de la protéine membranaire Four-jointed (Fj), régulant l'activité de Ft, dans une cellule distale par rapport à une cellule proximale induit l'établissement d'une polarité planaire (Ma et al., 2003). L'implication de Wnt-5a (Qian et al., 2007), ainsi que des récepteurs Fz-3 et Fz-6 (Nguyen et al., 2006) dans la mise en place de la polarité planaire semble maintenant acquise. Le lien entre le récepteur Fz et les protéines homologues aux Cadhérines est médié par l'activation des Jun Kinases (JnK), et la formation d'un complexe RhoA-Daam1-JnK (Park et al., 2006; Park et al., 1994).

**f- Régulation de la signalisation Wnt**

Plusieurs familles de protéines sécrétées se liant aux protéines Wnt ont été identifiées. L'une de ces familles contient les Secreted Frizzled-Related Proteins (Sfrps), Frizzled-B (FrzB), Frizzled-Related Proteins (FRP), Secreted Apoptosis-Related Proteins (SARP),



Crescent ou Sizzled (pour revue, <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html> et (Hall et al., 2006)). Les molécules de cette famille présentent une homologie de séquence avec le domaine CRD des récepteurs Fz, mais n'ont pas de domaine transmembranaire et intracellulaire. Elles se lient aux protéines Wnt et les empêchent d'interagir avec leurs récepteurs (Moon et al., 1997b).

D'autres régulateurs des Wnts sont connus. Chez le Xénope, Cerberus possède un domaine de liaison aux Wnts et BMPs (Bouwmeester et al., 1996; Piccolo et al., 1999). Les "Wnt Inhibitory Factors" (WIFs) sont des protéines avec un peptide signal en partie N-terminale pour leur sécrétion, un domaine WIF de 150 acides aminés, cinq domaines EGF-like, un domaine hydrophile en position C-terminale. Ils ont été identifiés chez le Zebrafish, le Xénope, et les mammifères. Ils se lient également aux Wnts dans l'espace extracellulaire et inhibent le signal Wnt (Hsieh et al., 1999). Dickkopf-1 (Dkk) a été montré pour la première fois dans le centre organisateur de Spemann chez le Xénope (Glinka et al., 1998). C'est un des 4 membres d'une famille de facteurs sécrétés, inhibiteurs de la signalisation Wnt par sa fixation sur le co-récepteur LRP (pour revue, (Nusse, 2001)). Sa fixation sur un autre récepteur, Kremen, peut induire une diminution de la présence membranaire de LRP (Mao and Niehrs, 2003; Mao et al., 2002).

#### **g-** *Implication des Wnt dans la mise en place du primordium de phanère*

L'implication des facteurs Wnt dans la mise en place des primordia de phanère est complexe à étudier, principalement à cause du nombre de facteurs Wnts connus y participant ainsi que du nombre de récepteurs répertoriés. L'activation de la  $\beta$ -caténine (**Fig. 15**) a été montrée comme étant capable d'induire la formation des primordia de phanères chez la souris (Gat et al., 1998), ainsi que chez le poulet. (Noramly et al., 1999). Une étude du laboratoire de C. M. Chuong a montré le rôle de quatre Wnts lors de la morphogénèse des primordia

plumaires, ainsi que les voies de signalisation utilisées (Chang et al., 2004). Wnt-1 et Wnt-3a sont exprimés à HH29 dans tout l'épiderme, puis à partir de HH30, leur expression se restreint à la placode. Ils jouent tous les deux un rôle, en passant par la voie canonique, sur la taille du primordium en activant la prolifération. Wnt-5a, qui a le même profil d'expression, active plutôt les voies JunK et calcique ainsi que la prolifération. Enfin Wnt-11, qui a une expression dermique homogène à HH29 (Olivera-Martinez et al., 2004), puis est exclu de la condensation dermique, inhibe la prolifération ainsi que la voie canonique, et active préférentiellement la voie des JunK et la migration cellulaire (Chang et al., 2004). La taille des primordia est diminuée lorsque Wnt-11 est surexprimé. Wnt-7a est connu comme étant impliqué dans la croissance des bourgeons plumaires, son expression est polarisée précocement au pôle postérieur et permet d'orienter la croissance antéro-postérieure de la plume (Widelitz et al., 1999). Cette orientation de la croissance est induite par le lien direct entre l'expression de Wnt-7a et de Shh. De plus, Wnt-7a joue un autre rôle, plus précoce, en étant exprimé sur toute la surface de la future placode (Prin et al., 2004). En ce qui concerne l'expression des récepteurs Fz lors de la morphogénèse cutanée, les 10 membres de cette famille interviennent lors de la morphogénèse cutanée (Reddy et al., 2004).

L'implication des trois voies de signalisation Wnt a aussi été démontrée, y compris la voie de polarité planaire. La perturbation de cette dernière modifie le sens de croissance des denticules de la *Drosophila* (Ma et al., 2003), ou des poils chez la souris (Guo et al., 2004).

La présence de protéines régulatrices des différentes voies de signalisation Wnt lors de la morphogénèse cutanée a été mise en évidence. La surexpression de Dkk-1 dans la peau embryonnaire de poulet empêche la formation de primordia de phanère (Chang et al., 2004). Le rôle de Dkk-4 est plus subtil. Il est exprimé dans l'épiderme préplacodal de la souris, sous la dépendance de la signalisation Wnt, permettant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif (Bazzi et al., 2007). Cette présence simultanée de facteurs Wnt et de Dkk-4 au sein du

primordium de phanère peut sembler antagoniste, mais en fait, permet un contrôle très fin du niveau d'activation de la signalisation Wnt. De plus, la délétion de Dkk-2 dans des souris KO induit la formation d'un épiderme pluristratifié et d'annexes cutanés à la place de l'épithélium cornéen (Mukhopadhyay et al., 2006). Le signal Wnt endogène présent dans l'épithélium cornéen est constitutivement inhibé par l'expression de Dkk-2 par le stroma cornéen. Des travaux de notre laboratoire ont montré que le remplacement du stroma cornéen par un derme embryonnaire, n'exprimant donc pas Dkk-2, induit la transdifférenciation de l'épithélium cornéen en épiderme phanérogène, sous l'influence de la signalisation Wnt (Pearson et al., 2004).

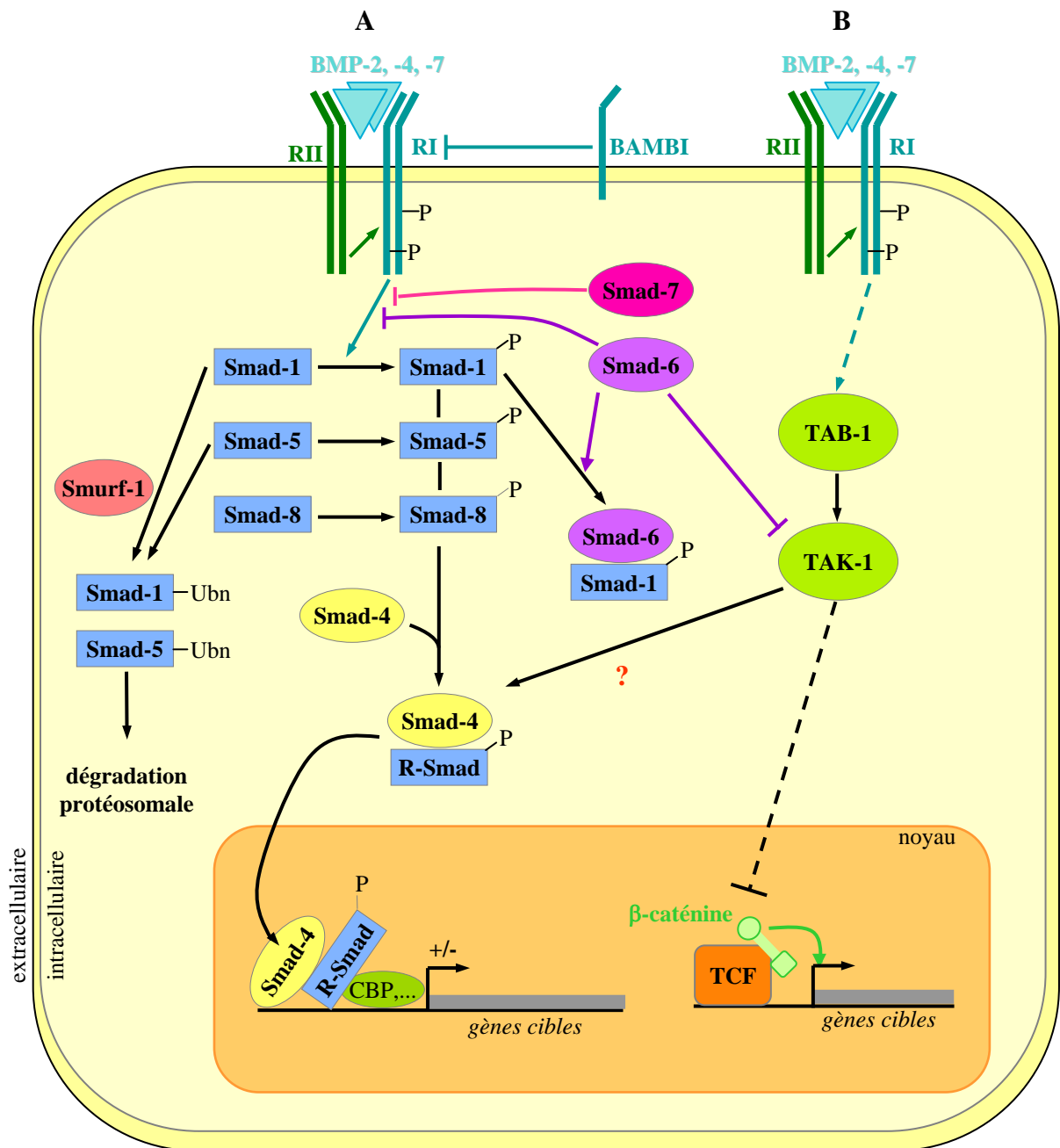
## ii) Signalisation « Bone Morphogenetic Protein » (BMP)

Les « Bone Morphogenetic Proteins » (BMPs) ont, comme leur nom l'indique, d'abord été identifiées comme des molécules pouvant induire la formation ectopique d'os et de cartilage (pour revue, (Wozney, 1998)). Les BMPs, à l'exception de BMP-1, font partie de la famille des « Transforming Growth Factors » (TGF- $\beta$ ). Ce sont des homodimères de 100 à 140 kDa. La superfamille des TGF- $\beta$  se subdivise en trois sous-familles : les TGF- $\beta$ , les Activines, et les BMPs. Chez la Drosophile, les homologues des BMPs sont Decapentaplegic (Dpp), Screw et 60A (aussi appelé Gbb) qui participent à l'oogénèse et au développement des disques imaginaux (Raftery and Sutherland, 1999). Les BMPs des vertébrés, sont impliqués dans de nombreux processus morphogénétiques, comme la régionalisation précoce dorso-ventrale du mésoderme et la spécification de l'épiderme (Harland and Gerhart, 1997; Hemmati-Brivanlou and Thomsen, 1995). Ils jouent également un rôle dans le développement du membre, dans la morphogénèse des dents, des poils et des plumes, et dans la régulation de l'apoptose (pour revue, (Hogan, 1996)). Cette diversité de réponses biologiques semble être

due à la diversité des cofacteurs intracellulaires qui participent à la voie de transduction (**Fig. 11**).

**a-** *La voie canonique*

La transduction du signal médiée par BMP-2, BMP-4 et BMP-7 implique deux types distincts de récepteurs transmembranaires sérine/thréonine kinase : des récepteurs de type I et des récepteurs de type II. L'homodimère de BMP-2, -4, ou -7 se lie à un récepteur de type II, ce dernier recrute alors un récepteur de type I. La formation du complexe ternaire ligand/récepteur de type II/récepteur de type I conduit le récepteur de type II à phosphoryler le domaine riche en glycine et sérine (GS) intracellulaire du récepteur de type I au niveau de résidus sérine et thréonine (Wrana et al., 1994). Le récepteur de type I activé phosphoryle en retour des protéines de la famille des Smads (nom venant de la contraction des premiers membres identifiés dans cette famille chez *C. elegans* (« *sma* ») (Savage et al., 1996) et chez la *Drosophile* (« *mad* ») (Raftery et al., 1995) que l'on peut également appeler « receptor regulated Smads » (R-Smads)) sur des résidus sérine au niveau d'un motif SSXS dans le domaine C-terminal. Smad-1, Smad-5 et Smad-8 transduisent de préférence la voie de signalisation BMP, tandis que Smad-2 et Smad-3 sont plutôt en aval de la signalisation médiée par les TGF- $\beta$  (pour revue, (Canalis et al., 2003)). Les différents récepteurs de type I phosphorylent de façon spécifique certains R-Smads qui conduisent à différentes activations (Kretschmar et al., 1997; Macias-Silva et al., 1996; Zhang and Evans, 1996; Zhang et al., 1996), ce qui permet la diversité de réponses biologiques. Après leur activation, les R-Smads se détachent du récepteur et interagissent avec Smad-4 (aussi appelé co-Smad). Le complexe R-Smad/Smad-4 se transloque dans le noyau où il s'associe à des coactivateurs ou corépresseurs de transcription pour réguler la transcription de gènes cibles (Lagna et al., 1996; Liu et al., 1996; Zhang et al., 1996). Smad-4 est structurellement similaire aux R-Smads, mais



**Figure. 11 : Voies de signalisation médiées par les BMPs.** (Modifiées d'après von Bubnoff, 2001).

- **Voie canonique.** 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 (A).

- **Voie des MAP Kinases.** 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/β-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 (B).

BAMBI a la même structure que les récepteurs des BMPs mais n'est pas capable de transduire le signal.

ne possède pas le motif de phosphorylation SSXS, et donc n'est pas phosphorylé par le récepteur (Macias-Silva et al., 1996). Les R-Smads et Smad-4 possèdent un domaine « Mad Homology 1 » (MH1) qui permet la liaison à l'ADN (excepté pour Smad-2), et un domaine MH2 qui peut médier les interactions protéine/protéine entre Smads, co-activateurs ou co-répresseurs de transcription. Entre autres, le domaine MH2 peut recruter les activateurs de transcription p300 et CBP (Feng et al., 1998; Janknecht et al., 1998; Topper et al., 1998) qui ont une activité histone acétylase et permettent donc une transcription accrue des gènes cible en décondensant la structure de la chromatine. Les Smads seuls ont la capacité de se lier spécifiquement à l'ADN par l'intermédiaire de leur domaine MH1, mais l'affinité est trop faible pour permettre une transcription efficace des gènes cibles *in vivo* (Shi et al., 1998).

Il est à noter que les BMPs peuvent aussi s'associer en hétérodimères, ce qui a pour effet de modifier la réponse cellulaire (Hazama et al., 1995).

#### **b- La voie des MAP kinases**

Outre la voie canonique, il a été montré que le signal BMP peut être transduit par des protéines de type « Mitogen Activated Protein Kinase » (MAP kinase). En effet, l'activation de récepteurs des BMPs peut conduire à l'activation de la « TGF- $\beta$  Activated Kinase 1 » (TAK-1), qui est une MAP kinase kinase kinase, et de la « TAK-1 Binding protein 1 » (TAB-1) (Shibuya et al., 1998; Yamaguchi et al., 1995). La surexpression de TAK-1 chez le Xénope a le même effet que la surexpression de BMP (ventralisation des embryons) et la surexpression d'une forme déficiente de TAK-1 bloque la ventralisation et la différenciation ectodermique médiée par les BMPs (Shibuya et al., 1998). Bien que cette signalisation via la TAK-1 soit encore peu connue, il est possible qu'elle conduise à la phosphorylation de facteurs de transcription qui agissent en synergie avec les Smads de la voie canonique pour réguler la transcription des gènes cibles des BMPs.

**c- Gènes cibles de la signalisation BMP**

Deux grandes familles de gènes cibles de la signalisation BMP sont connus : la famille des Msx et celle des Id. La première famille est composée de 2 gènes à homéoboîte homologues au gène « muscle segment homeobox » (Msh) de la Drosophile (pour revue, (Ramos and Robert, 2005)). Msx-1 (Hox-7) et Msx-2 (Hox-8), en se fixant à l'ADN seuls ou avec des cofacteurs, peuvent activer ou réprimer l'expression de gènes impliqués dans de nombreux événements embryonnaires (Bach et al., 2003; Hayashi et al., 2006; Lallemand et al., 2005).

La seconde famille est composée de quatre membres chez les vertébrés. Ces protéines appelées « Inhibitor of Differentiation » ou « Inhibitor of DNA binding » (Id) possèdent un motif hélice-boucle-hélice permettant sa liaison à d'autres facteurs de transcription sur leur motif basique hélice-boucle-hélice, afin de bloquer leur fixation à l'ADN (Hollnagel et al., 1999; Kee and Bronner-Fraser, 2001; Miyazono and Miyazawa, 2002; O'Toole et al., 2003).

**d- Régulation de la signalisation BMP**

Les BMPs possèdent un grand nombre d'antagonistes extracellulaires. La voie de signalisation médiée par les BMPs a été bien étudiée chez le Xénope dans le modèle d'induction du tissu neural à partir de l'ectoderme dorsal pendant la gastrulation. Les cellules ectodermiques adoptent par défaut un devenir neural (Hemmati-Brivanlou and Melton, 1994). Dans les embryons normaux, la signalisation BMP est mise en place dans l'ectoderme et bloque la différenciation neurale de ce dernier (pour revues, (Chang and Hemmati-Brivanlou, 1998; Wilson et al., 1997)). Les facteurs Noggin, Follistatine, Chordin et Cerberus, sécrétés du côté dorsal par l'organisateur de Spemann inhibent les BMPs et permettent la formation de la plaque neurale (Bouwmeester et al., 1996; Hemmati-Brivanlou and Melton, 1994; Lamb et

al., 1993; Sasai et al., 1994; Smith and Harland, 1992; Smith et al., 1995). Ces facteurs se lient physiquement spécifiquement avec plus ou moins d'affinité aux molécules BMP-2, BMP-4 et BMP-7. D'autres facteurs, Drm/Gremlin et DAN, apparentés à Cerberus et non présents dans l'organisateur de Spemann, se lient à BMP-2 et sont capables d'induire la formation de tissu neural dans des calottes animales (Hsu et al., 1998). Drm/Gremlin, Cerberus et DAN sont des glycoprotéines secrétées qui appartiennent à la famille DAN et qui possèdent un domaine comprenant 9 cystéines conservées.

Ces inhibiteurs n'agissent pas sur la transcription des gènes de la voie de signalisation des BMPs, mais bloquent cette voie en se fixant spécifiquement à BMP-2, BMP-4 et BMP-7. Il existe aussi des inhibiteurs intracellulaires spécifiques à la voie de signalisation BMP : entre autres, « BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor » (BAMBI, un récepteur dominant-négatif qui a la même structure que les autres récepteurs de la famille des TGF- $\beta$  mais qui ne possède pas de domaine kinase intracellulaire) ; « Inhibitory Smads » (I-Smads appelés chez les vertébrés Smad-6 et Smad-7 et chez la Drosophile "Daughters against dpp" (Dad) peuvent se lier de façon stable au domaine intracellulaire des récepteurs de type I activés par BMP/Dpp, et empêchent la phosphorylation des R-Smads (Imamura et al., 1997; Inoue et al., 1998; Souchelnytskyi et al., 1998)) ; Tob est un membre d'une nouvelle famille de protéines antiprolifératives qui est connue pour empêcher la croissance cellulaire lorsqu'elle est surexprimée dans des cellules NIH3T3. *In vitro*, Tob interagit avec Smad-1, Smad-4, Smad-5 et Smad-8 et bloque leur activité spécifique de transcription d'un gène rapporteur contenant plusieurs sites de liaison à Smad-1 (Yoshida et al., 2000).



**e- Interactions avec d'autres voies de signalisation**

- Avec les voies des autres membres *TGF-β* et *Activine*. Cette interaction antagoniste peut être expliquée par une compétition intracellulaire pour un lot limité de molécules Smad-4 (partagée par toutes ces voies) dans certaines situations physiologiques (Candia et al., 1997). De même, les I-Smads qui peuvent être induits aussi bien par les BMPs, *TGF-β* ou *Activines* peuvent inhiber les voies BMP et *TGF-β/Activine*. BAMBI est induit uniquement par la voie BMP, mais peut inhiber les voies BMP, *TGF-β* et *Activine*.
- Avec la voie *Wnt/β-caténine*. Chez la Drosophile, lors de la régionalisation du disque imaginal de la patte, Wg (orthologue de Wnt-1) et Dpp inhibent mutuellement leur expression (Jiang and Struhl, 1996; Johnston and Schubiger, 1996; Theisen et al., 1996). Plusieurs autres exemples chez les vertébrés montrent que les voies *Wnt/β-caténine* et *BMP/Smad* interagissent et peuvent agir en synergie pour activer la transcription de gènes cibles. La nature moléculaire des interactions n'est pas encore connue. De même, il pourrait y avoir une interaction entre les voies *BMP/MAPK* et *Wnt/β-caténine* car TAK-1 peut activer la « NEMO-like kinase » (NLK), qui à son tour peut phosphoryler le complexe Lef/Tcf et empêcher la fixation de ce dernier à l'ADN (Ishitani et al., 1999).
- Avec la voie *Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline*. L'activation de certains récepteurs par leur ligand conduit au relargage du Calcium stocké dans la cellule (Cf. Signalisation *Wnt/Ca<sup>2+</sup>*). Le *Ca<sup>2+</sup>* a son tour va activer, par exemple, la CaMKII. *In vitro*, le complexe *Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline* peut se lier au complexe Smad-1/Smad-4 (Zimmerman et al., 1998). Le rôle de la formation de ce complexe est encore incertain, mais il a été montré que l'inhibition du relargage intracellulaire du *Ca<sup>2+</sup>* du réticulum endoplasmique supprime la ventralisation des embryons de Xénope suite à la surexpression de BMP-4 (Kume et

al., 1997). De plus, la surexpression de la CaMKII conduit à la ventralisation de l'embryon de Xénope (Kuhl et al., 2000a). Ainsi, les voies BMP/Smad et  $Ca^{2+}$ /Calmoduline semble agir en synergie.

- Avec la voie *Wnt/Ca<sup>2+</sup>*. Certains membres de la famille des Wnts, comme Wnt-5a et Wnt-11, activent des récepteurs de la famille Frizzled qui agissent préférentiellement comme des récepteurs couplés à des protéines G, et qui activent donc la voie  $Ca^{2+}$ /Calmoduline (Kuhl et al., 2000a; Sheldahl et al., 1999). Des travaux ont montré que l'inhibition de X-Wnt-11 (Kuhl et al., 2000a), ainsi que la surexpression de la forme dominante-négative de X-Frizzled-8 (Itoh and Sokol, 1999) conduisent à la dorsalisation des embryons de Xénope et induisent l'expression de marqueurs dorsaux. Il est donc probable que la voie *Wnt/Ca<sup>2+</sup>* interagisse avec la voie des BMPs.
- Avec les voies de signalisation médiées par *Sonic Hedgehog* et les *FGFs*. Ainsi, lors de la morphogénèse du bourgeon de membre chez le poulet, les FGFs, localisés dans « l'Apical Ectodermal Ridge » (AER) (Lewandoski et al., 2000; Sun et al., 2000), sont responsables de la prolifération des cellules mésodermiques sous-jacentes (Fallon et al., 1994; Niswander et al., 1993). FGF-4 ne s'exprime jamais dans la partie antérieure de l'AER alors qu'elle est exprimée dans la partie postérieure (Laufer et al., 1994; Niswander and Martin, 1993a). Le maintien de l'AER dans cette région est corrélé avec la localisation de la « Zone of Polarity Activity » (ZPA) (Wilson and Hinchliffe, 1985) située dans la partie postérieure du mésenchyme qui exprime Shh (Ogura et al., 1996). *Bmp-2*, *bmp-4* et *bmp-7* sont exprimés dans le mésenchyme du membre et dans l'AER dès les stades précoces (Francis-West et al., 1995; Francis et al., 1994). La régulation de la croissance du bourgeon de membre résulterait de l'antagonisme entre les BMPs qui ont un rôle inhibiteur sur la prolifération des cellules du mésenchyme et le FGF-4 qui induit la prolifération de ces dernières (Niswander and Martin, 1993a;

Niswander and Martin, 1993b). La voie de signalisation BMP induirait également directement ou indirectement la répression de la transcription de *fgf-4* dans l'AER antérieure (Pizette and Niswander, 1999). Dans la partie postérieure du membre, Shh inhiberait le signal BMP, ce qui permettrait le maintien de *fgf-4* dans l'AER postérieure, et donc la croissance du mésenchyme postérieur (Pizette and Niswander, 1999). La répression de la voie de signalisation BMP par Shh pourrait se faire par l'intermédiaire de l'induction de l'expression de Gremlin (Pizette and Niswander, 1999).

#### **f-** *Signalisation BMP lors de la mise en place du primordium de phanère*

Trois facteurs de la famille des BMPs ont été montrés comme présents chez le poulet lors de la mise en place du primordium de phanère : BMP-2, -4 et -7 (**Fig. 15**). BMP-2 est exprimé au niveau de l'épiderme préplacodal, puis dans la placode et la condensation dermique (Noramly and Morgan, 1998). L'expression de BMP-4 est restreinte à la condensation dermique (Noramly and Morgan, 1998). La chronologie d'expression de BMP-4 et BMP-2 a été faite par comparaison des champs plumaires fémoraux droit et gauche d'un même embryon, il a été ainsi démontré que BMP-4 a une expression plus tardive que BMP-2 (Houghton et al., 2005). 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 signalisation Wnt canonique (Harris et al., 2004), cette expression perdure après la formation du primordium (Patel et al., 1999). Des expérimentations *in vivo* et *in vitro* ont permis de classer les BMPs dans la catégorie des facteurs inhibiteurs de la formation des primordia de phanère. L'infection par RCAS-BMP-4 à E2 d'un embryon de poulet (Noramly and Morgan, 1998), de même que la mise en culture d'explants de peau embryonnaire de poulet à HH29 en présence de billes chargée avec du BMP-2, BMP-4 ou BMP-7 (Jung et al.,

1998; Patel et al., 1999), provoquent l'inhibition de la formation des bourgeons plumaires au niveau des zones à fortes concentrations en BMP. Cependant la mise en place à E2 d'une bille très faiblement chargée en BMP-4 permet la mise en place d'une zone ptilogène ectopique, permettant de conclure sur un rôle positif de BMP sur la maturation du derme (Scaal et al., 2002). De plus, la perte d'expression de BMP-7 empêche la mise en place du primordium de phanère (Harris et al., 2004).

### iii) Signalisation « Fibroblast Growth Factor » (FGF)

Les « Fibroblast Growth Factors » (FGFs) font partie d'une famille de protéines diffusibles, comportant 23 membres répertoriés. Ces protéines contiennent une région conservée de 120 acides aminés. Les FGFs sont impliqués dans de nombreux processus de morphogenèse. Au moment de la morphogenèse du membre, ils sont exprimés dans l'AER et permettent l'extension polarisée proximo-distale du membre (Laufer et al., 1994; Niswander et al., 1993). Ils sont aussi impliqués, entre autre, dans la morphogénèse cardiaque (Lincoln et al., 2006). Ces peptides sont capables d'induire deux types de signalisations intracellulaires : soit ils se fixent sur des récepteurs membranaires et activent une cascade de seconds messagers, soit ils activent directement plusieurs cibles nucléaires (**Fig. 12**).

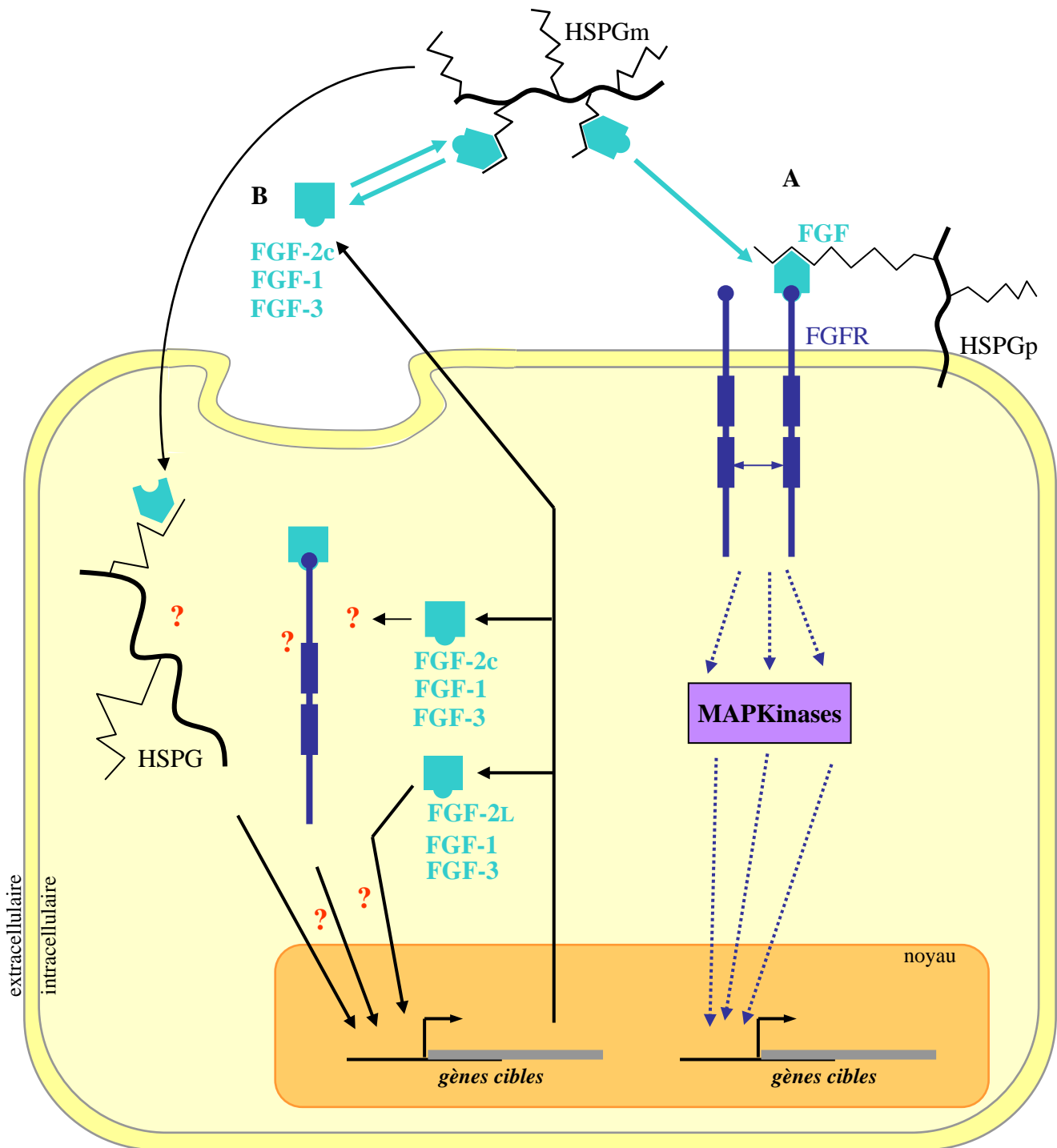
#### **a-** *La voie de transduction intracellulaire*

La voie de transduction fait intervenir les récepteurs « Fibroblast Growth Factor Receptors » (FGFR) dont 4 gènes sont connus et conservés chez la souris, le poulet, le rat et l'homme : *fgfr-1*, *fgfr-2*, *fgfr-3* et *fgfr-4*. Ces gènes peuvent coder des formes transmembranaires longues qui possèdent dans leur partie intracellulaire un domaine tyrosine kinase et dans leur région extracellulaire trois structures pseudo-immunoglobulines (Ig) et de

six à neuf sites potentiels de glycosylation. Ils peuvent engendrer un grand nombre de variants par épissage alternatif. Une soixantaine d'isoformes ont pour l'instant été caractérisées ; la plupart sont transmembranaires, mais quelques-uns des variants sont solubles car uniquement constitués d'un domaine extracellulaire. Les différentes isoformes produites semblent avoir des affinités différentes envers les multiples peptides FGF (Chellaiah et al., 1994; Werner et al., 1992).

L'activité des FGFs et de leurs récepteurs est régulée par la présence de protéoglycannes à Sulfate d'Héparane (HSPG) et d'Héparine associés à la matrice extracellulaire ou à la membrane (Lin et al., 1999). Les HSPG ont une grande capacité de fixation aux FGFs et à leurs récepteurs. Les HSPG associés à la matrice extracellulaire pourraient avoir une fonction de stockage des peptides FGFs qui seraient relargués après un clivage protéolytique. Par contre, les HSPG associés à la membrane plasmique ont plutôt la propriété de permettre ou de stimuler l'activation des FGFRs par leurs ligands, jouant ainsi le rôle de cofacteurs.

La fixation des FGFs sur les FGFRs provoque leur dimérisation (Johnson and Williams, 1993). Cette dernière stimule l'activité Tyrosine kinase des récepteurs et induit l'autophosphorylation intra-moléculaire et/ou inter-moléculaire de plusieurs de leurs résidus Tyrosine. Ce processus déclenche l'association aux récepteurs et/ou la phosphorylation directe (sur des résidus Tyrosine) de plusieurs protéines qui jouent le rôle d'effecteurs (van der Geer et al., 1994). Les FGFRs, via leurs effecteurs, possèdent ainsi la propriété d'activer de nombreuses protéines de la cascade de transmission du signal et des messagers secondaires parmi lesquels se trouvent des protéines de la famille des MAP kinases qui dialoguent principalement par des interactions moléculaires et des réactions de phosphorylation successives. Au final, ces différentes cascades d'activation aboutissent à la transcription dans le noyau d'une batterie de gènes (Turjanski et al., 2007). Les FGFs peuvent aussi se lier avec



**Figure 12 : 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**, protéoglycannes à sulfate d'héparane de la matrice extracellulaire ; **HSPGp**, protéoglycannes à sulfate d'héparane membranaires.

une forte affinité à un récepteur sans activité Tyrosine kinase appelé « Chicken Cystein-rich Fibroblast Growth Factor Receptor » (CFR). Ce récepteur est constitué d'une grande région extracellulaire riche en cystéines qui possède cinq sites potentiels de N-glycosylation, et d'un petit domaine intracellulaire de treize acides aminés (Burrus et al., 1992). C'est un curieux récepteur qui est encore l'unique représentant de sa famille, et certains auteurs ont suggéré qu'il pourrait être impliqué dans l'adhérence cellulaire (Steedmaier et al., 1995) ou dans la modification de l'expression de FGF-3 (Kohl et al., 2000).

#### **b-** *La voie directe*

Les FGFs peuvent aussi pénétrer dans le milieu nucléaire sans dégradation préalable. Quatre isoformes de FGF-2 ont été caractérisées dont une courte et trois longues. La forme courte est essentiellement cytoplasmique et peut être externalisée pour activer le système de transduction membranaire (voir paragraphe ci-dessus) de façon autocrine ou paracrine. Les formes longues sont transférées dans le noyau et pourraient n'être relarguées dans le milieu extracellulaire que lorsqu'il y a destruction et mort cellulaire. Cependant, les deux types de formes, quand elles sont externalisées, peuvent être partiellement transférées dans le noyau (une partie d'entre elles subissant une dégradation protéolytique) (Amalric et al., 1994; Patry et al., 1994). La forme courte peut stimuler la synthèse des formes endogènes (Amalric et al., 1994; Fox and Swain, 1993), ainsi que la transcription des gènes qui codent l'ARN ribosomique (Bouche et al., 1994). Le FGF-1 et FGF-3 peuvent également être transportés dans le noyau (Friedman et al., 1994; Kiefer and Dickson, 1995). Le mécanisme qui contrôle le transport nucléaire est encore très discuté. La translocation des formes endogènes pourrait être régulée par une séquence de type « Nuclear Localization Sequence » (NLS), alors que l'internalisation des formes exogènes pourrait plutôt dépendre des récepteurs et/ou des HSPG. Il a été montré que la forme courte sécrétée de FGF-2 peut être directement transportée dans le noyau par des HSPG (Amalric et al., 1994).

### c- Signalisation FGF dans la mise en place du primordium de phanère

Trois membres de la famille des FGF ont été étudiés lors de la mise en place des primordia de phanère. FGF-10 est un facteur dermique exprimé très précocement, il semble impliqué dans la prolifération du derme lui permettant d'atteindre la densité cellulaire requise pour initier la différenciation de la placode (Mandler and Neubuser, 2004). FGF-2 est exprimé dans la placode épidermique (**Fig. 15**). Son addition suffit à restaurer l'épiderme déficient du mutant *Scaleless* (Song et al., 1996; Viallet et al., 1998). Ce facteur intervient directement sur la formation de la condensation dermique, il induit l'expression du Syndecan-3 et modifie la matrice extracellulaire, mais il induit aussi une action de chémo-attraction sur les fibroblastes dermiques, permettant ainsi la formation de la condensation (Song et al., 2004). FGF-4, quant à lui, est exprimé dans l'épiderme, puis restreint à la placode épidermique avant de voir son expression étendue dans tout le primordium lorsque la condensation dermique est formée (Chuong et al., 1996).

Trois FGFRs sont exprimés dans la peau embryonnaire de poulet. FGFR-1 est exprimé dans le derme sous placodal. FGFR-2 et FGFR-3 sont exprimés dans les deux compartiments du primordium de phanère (Noji et al., 1993).

La perturbation de la signalisation FGF dans la peau embryonnaire conduit à d'importantes modifications de la formation des primordia de phanères. L'ajout de FGF-1, FGF-2 ou FGF-4 dans le milieu de culture organotypique de peau embryonnaire de poulet induit, dans les semi-aptéries, la formation de primordia de phanères ainsi que la fusion des primordia dans les ptéryles (Widelitz et al., 1996). Cette action n'est pas suffisante pour induire la formation de primordia dans une aptérie (Viallet et al., 1998). La production de formes solubles des FGFR-1 et FGFR-2, induisant l'inhibition de la signalisation FGF, tout comme l'utilisation d'anticorps bloquant anti-FGF-10, induit la formation de zones glabres dans la peau (Mandler and Neubuser, 2004).



Les facteurs diffusibles que nous venons d'aborder ne sont pas les seules voies de signalisation impliquées dans les interactions cellulaires à l'origine de la formation du primordium de phanère. Des facteurs membranaires tels que l'Ectodysplasine et les protéines du système Notch, y participent aussi.

## 5. Facteurs membranaires et interactions intra-tissulaires

Les facteurs membranaires permettent la transmission de messages par contacts cellulaires. Ils permettent donc essentiellement des interactions intra-tissulaires. En étant clivé, le ligand Eda permet de s'affranchir de la courte distance nécessaire aux contacts cellulaires.

### i) Ectodysplasine (Eda)

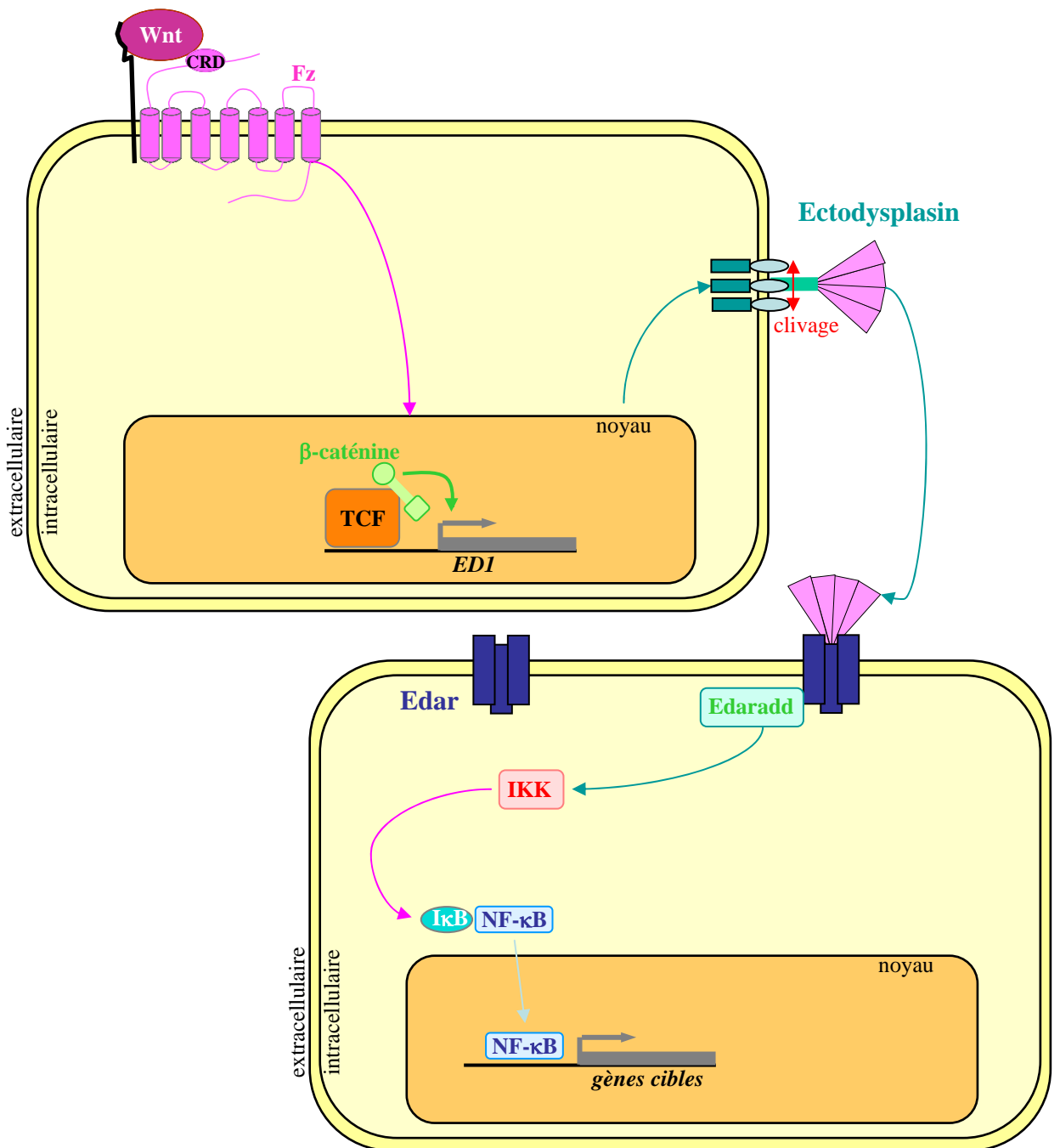
Ces dernières années, une nouvelle voie de signalisation (**Fig. 13**) de « Tumor Necrosis Factor » (TNF) a été impliquée dans le développement embryonnaire et plus spécifiquement, dans les organes d'origine ectodermique (pour revue, (Mikkola and Thesleff, 2003)). Des mutations sur cette voie de signalisation, appelée Ectodysplasine (Eda), induit un syndrome appelé dysplasie anhidrotique ectodermique (HED) que l'on retrouve chez l'humain et la souris (Pinheiro and Freire-Maia, 1994). La description la plus précoce de ce syndrome a été faite par Charles Darwin qui s'était intéressé au caractère héréditaire de ce syndrome, caractérisé par le peu de dents et de poils développés sur le corps, ainsi que par une forte déshydratation cutanée lors de canicules. Les mutations à l'origine de ce syndrome touchent soit le récepteur Edar soit la molécule adaptatrice Edaradd (Headon et al., 2001).

Quatre souris mutantes (*Tabby*, *downless*, *Sleek*, *crinkled*) présentant des phénotypes HED ont été décrites (Gruneberg, 1965; Sofaer, 1969a; Sofaer, 1969b; Sofaer, 1969c).

L'homologie de séquence entre les gènes *eda* et *tabby* ont permis de conclure à leur similitude (Srivastava et al., 1997). Par la suite *edar* a été montré comme homologue de *downless* et *sleek*, puis *edaradd* de *crinkle* (Headon and Overbeek, 1999; Yan et al., 2002). Les phénotypes sont les suivants : les incisives et troisièmes molaires sont absentes, les premières et secondes molaires ont une modification de leurs tailles (Pispa et al., 1999). Au lieu d'avoir les quatre types de poils de pelage (« awl, auchene, guard, zigzig ») les souris mutantes n'ont que le type « awl » présentant une anomalie (Kindred, 1967). Enfin, de nombreux types de glandes sont affectés (sudoripares, salivaires...) (Gruneberg, 1971).

Les transcrits du gène *eda* subissent de nombreux splicing alternatifs à l'origine d'une grande variété de formes de la protéine (Bayes et al., 1998). Les deux formes les plus décrites sont Eda-A1 (391 aa) et Eda-A2 (389 aa) dont les deux acides aminés de différences se retrouvent au niveau du domaine TNF et induit une fixation sur deux récepteurs différents, Edar étant spécifique de Eda-A1 et Xedar est spécifique de Eda-A2 (Yan et al., 2000). Les isoformes Eda-A1 et Eda-A2 sont des protéines transmembranaires trimériques ayant un court domaine N terminal intracellulaire et un grand domaine C terminal extracellulaire portant un domaine homologue au TNF et une répétition de 19 motif semblable au Collagène (G-X-Y) (Mikkola et al., 1999). Le relargage de Eda se fait par un clivage à l'aide de la Furine dans le domaine extracellulaire (Elomaa et al., 2001). Ainsi, ce ligand pourra avoir une action autocrine ou paracrine.

La protéine Edar vient de la traduction du gène *downless* chez la souris (Headon and Overbeek, 1999). Cette protéine de 448 acides aminés, ayant un domaine transmembranaire, possède un domaine extracellulaire composé de domaines riches en Cystéines (1 complet et 2 incomplets) étant très homologue du TNFR Troy (Kojima et al., 2000), ainsi qu'un domaine intracellulaire contenant un domaine de mort cellulaire (Headon and Overbeek, 1999). Le récepteur Xedar ne possède que 32% d'homologie pour Edar, malgré cela, et compte tenu de



**Figure 13 : 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.

la très forte homologie entre Eda-A1 et Eda-A2, aucune réactivité croisée n'a été rapportée (Yan et al., 2000). Xedar possède 3 domaines riches en Cystéines sur son domaine extracellulaire, et aucune homologie spécifique avec d'autres TNFR dans son domaine intracellulaire, que ce soit pour son isoforme courte (297 aa) ou longue (318 aa) (Sinha et al., 2002; Yan et al., 2000).

#### **a- Signalisation Eda**

Les TNFRs mènent à l'induction de nombreuses réponses en fonction du type cellulaire. La voie de signalisation la plus typique est l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. La transfection de cellules de mammifères par le récepteur Edar induit une activation proportionnelle de NF- $\kappa$ B (Yan et al., 2000). L'expression de forme mutée du récepteur induit un arrêt presque complet de l'activation de NF- $\kappa$ B, suggérant un rôle important de NF- $\kappa$ B dans la transduction de la signalisation Eda (Kumar et al., 2001). Des résultats contradictoires suggèrent une activation de la voie de signalisation JNK par Edar (Koppinen et al., 2001; Kumar et al., 2001), sans doute due à la différence de lignées cellulaires utilisées, mais l'activation de la signalisation JNK est de toute façon très faible comparée à celle obtenue avec d'autres TNFRs (Kumar et al., 2001). Il est à noter que c-jun et c-fos, deux facteurs impliqués dans la voie de signalisation JNK sont inhibés dans la peau de souris *Tabby* (Cui et al., 2002). La transduction du signal nécessite la fixation d'une protéine adaptatrice Edaradd sur le domaine de mort (DD) intracytoplasmique de Edar (Yan et al., 2002). La perte du DD se retrouve dans certains syndrome HED et empêche l'activation de NF- $\kappa$ B (Headon et al., 2001).

Dans le cadre de l'apoptose, le DD, situé sur le TNFR, recrute soit Fadd, soit Tradd, à l'origine de l'apoptose induite par les récepteurs de mort. Il est intéressant de noter que Edar n'a la possibilité d'interagir ni avec l'un, ni avec l'autre (Kumar et al., 2001; Yan et al., 2002).

L'implication de ce TNFR dans les phénomènes apoptotiques n'est pas encore clairement définie.

#### **b-** *Interaction avec d'autres voies de signalisation*

D'anciennes expérimentations de recombinaisons tissulaires entre des peaux sauvages et *Tabby* de souris ont permis de montrer l'implication indirecte de cette voie de signalisation dans le dialogue inter-tissulaire (Gruneberg, 1971; Mayer and Green, 1978).

Cette voie de signalisation semble interagir avec d'autres voies. La culture d'explants de peau ou de dent semble suggérer que Wnt-6 induit l'expression de Eda alors que les BMPs, FGFs et Shh ne le peuvent pas (Laurikkala et al., 2001; Laurikkala et al., 2002). De plus, un épiderme n'exprimant pas Lef-1 n'exprimera pas Eda, ce qui permet de faire un lien direct entre la signalisation Wnt canonique et l'expression d'Eda qui possède un site de liaison de Lef-1 dans son promoteur génique (Pinheiro and Freire-Maia, 1994). La détection de l'expression d'Eda dans les souris *downless*, ainsi que l'expression de Edar dans les souris *Tabby* montre qu'il n'y a pas de contrôle de cette voie de signalisation sur les protéines qui la composent (Laurikkala et al., 2001; Laurikkala et al., 2002).

Par contre, alors que BMP-2 et BMP-6 ne semblent avoir aucune influence sur l'expression d'Eda, de récents résultats montrent que la signalisation Eda inhibe la signalisation BMP en induisant l'expression ectodermique de deux inhibiteurs de BMP, Ccn2/Ctgf (« CCN family protein 2. Connective tissue growth factor) ainsi que la Follistatine. De plus, l'activation de NF- $\kappa$ B conduit à l'expression de Shh (Pummila et al., 2007).

### c- Signalisation Eda dans la mise en place du primordium de phanère

Chez la souris, dans le cas de la dent et du poil, les transcrits Edar sont présents dans l'ectoderme de la placode, alors que les transcrits Eda sont restreints à l'ectoderme interplacodal (Laurikkala et al., 2001; Laurikkala et al., 2002). Edaradd est logiquement exprimé dans les mêmes cellules qu'Edar (Headon et al., 2001). L'analyse protéique a montré qu'Eda-A1 est l'isoforme exprimée précocement alors qu'Eda-A2 est plus tardive, impliquée lors de la croissance du bourgeon ; ceci suggère un rôle de Edar lors de l'induction de la placode (Yan et al., 2000). Chez les souris *Tabby*, il y a une forte augmentation de l'apoptose au sein des follicules pileux (Schmidt-Ullrich et al., 2001). Par contre, lors de la formation de la dent, un groupe de cellules exprimant Edar forment un centre organisateur appelé « enamel knot », il disparaît de la dent par apoptose (Laurikkala et al., 2001). Il est donc difficile de conclure sur une implication de la signalisation Eda dans la survie ou la mort cellulaire par apoptose.

Une étude récente menée chez le poulet a montré la même implication de la voie de signalisation Eda et de ses récepteurs Edar (induction) et Xedar (croissance) lors de la formation du primordium plumaire (Drew et al., 2007). Mais, tout du moins chez le poulet, BMP-2 est exprimé plus précocement qu'Eda et Edar (Houghton et al., 2005).

#### ii) Système Notch et inhibition latérale

Le système Notch, constitué d'un groupe de protéines transmembranaires, joue un rôle capital dans de nombreux modèles de spécification cellulaire. Ce système a été identifié lors du processus d'inhibition latérale qui permet l'émergence de précurseurs distincts à partir d'un ensemble de cellules équipotentes. Il intervient également dans l'organogénèse ainsi que la

mise en place de certaines niches de cellules souches dans des organes adultes (pour revue, (Chiba, 2006)).

#### **a-** *Voie de signalisation Notch*

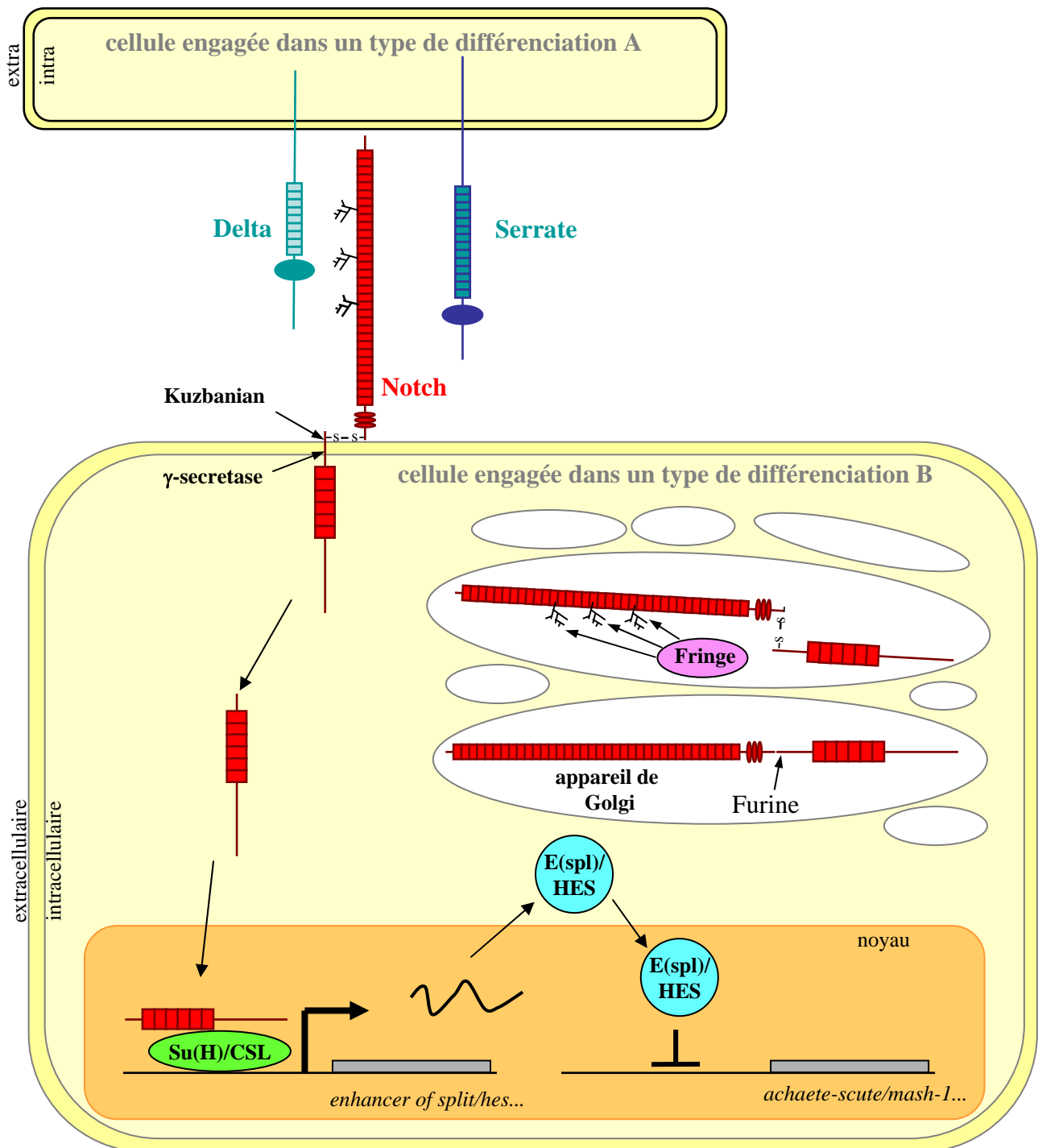
Le récepteur Notch est une protéine de type I qui traverse une seule fois la membrane cellulaire. Le récepteur Notch de la *Drosophile* contient 36 motifs "Epidermal Growth Factor" (EGF) et une région « Lin/Notch/Repeat » (LNR) spécifique de cette classe de récepteurs dans sa partie extracellulaire (Kidd et al., 1986; Wharton et al., 1985). La partie intracellulaire contient un domaine RAM (Tamura et al., 1995) juxtaposé de 6 répétitions ankyrine (ANK), et une région PEST (probablement une séquence signal de dégradation protéolytique) à son extrémité C-terminale (pour revue, (Weinmaster, 1997)). La région extracellulaire de Notch est glycosylée et la partie intracellulaire peut être phosphorylée sur des résidus sérine (Kidd et al., 1989). Les différents récepteurs Notch existant chez les vertébrés varient essentiellement par le nombre de motifs EGF. Par contre, les motifs ANK intracellulaires sont conservés avec une forte homologie d'un récepteur à l'autre. Les motifs EGF sont impliqués dans l'adhésion des ligands Delta et Serrate. Chez la *Drosophile*, les domaines EGF 11 et 12 sont suffisants pour lier à la fois Delta et Serrate (Fehon et al., 1990). Cependant, des mutations à l'extérieur de ces régions affectent l'adhésion (Lieber et al., 1992). De plus, des délétions de répétitions EGF autres que 11 et 12 peuvent provoquer des phénotypes au niveau de l'aile identiques à ceux rencontrés chez les mutants *delta* (Rebay et al., 1993). Les ligands Delta et Serrate/Jagged sont des protéines ayant un domaine transmembranaire. Ils contiennent dans leur partie extracellulaire des motifs EGF. Leur partie intracellulaire est plus courte que celle des récepteurs Notch (pour revue, (Ehebauer et al., 2006)).

La voie de signalisation Notch (**Fig. 14**) est activée suite à l'association des ligands Delta ou Serrate/Jagged à la partie extracellulaire du récepteur Notch. Cette association

provoque deux clivages protéolytiques séquentiels du récepteur Notch : le premier dans le domaine extracellulaire (Brou et al., 2000), le deuxième dans la partie intracellulaire du récepteur au niveau de la membrane cytoplasmique. Ce dernier permet le relargage d'un fragment intracellulaire qui va se transloquer dans le noyau et s'associer à des complexes protéiques pour activer la transcription de gènes cibles. La transfection du « Notch IntraCellular Domain » (NICD) seul, mimant parfaitement l'activation du récepteur, a permis d'étudier le mécanisme de transduction cellulaire impliqué (pour revue, (Weinmaster, 1997)).

Le NICD se transloque dans le noyau où il s'associe à un facteur de transcription appelé Suppressor of Hairless (Su(H)) chez la Drosophile et le Xénope, Lag-1 chez *C. elegans*, et CBF1/RBP-J $\kappa$  chez les mammifères. Afin de tenir compte de ces trois dénominations, ces protéines sont collectivement appelées CSL (Wettstein et al., 1997). Les protéines CSL qui sont initialement des répresseurs de la transcription, deviennent des activateurs de transcription lorsqu'elles sont associées au domaine intracellulaire de Notch (Hsieh et al., 1996). Le complexe ainsi formé permet la transcription d'un groupe de gènes nommés Enhancer of split (E(spl)) chez la Drosophile, ESR chez le Xénope, et HES chez les mammifères (pour revue, (Ehebauer et al., 2006)). Ces gènes codent pour des facteurs de transcription hélice-boucle-hélice basique (bHLH) qui répriment directement certains activateurs de transcription bHLH qui eux-mêmes régulent l'expression des ligands de Notch (Wettstein et al., 1997). Ainsi l'activation de la voie de signalisation Notch dans une cellule conduit à une baisse de transcription de ses ligands. Parallèlement, l'expression de HES-1 via la voie Notch permet l'augmentation de l'expression du récepteur Notch. Cette boucle rétroactive permet de renforcer la sensibilité de la cellule à l'activation de ses récepteurs





**Figure 14 : Voie de signalisation médiée par le récepteur Notch chez la Drosophile et chez les mammifères.**

Le récepteur Notch est activé par les ligands Delta ou Serrate présents sur une cellule adjacente. L'activation de Notch entraîne un clivage dans sa partie extracellulaire par la métalloprotéase Kuzbanian et un clivage dans le domaine transmembranaire par la  $\gamma$ -secretase. Le fragment intracellulaire de Notch est transloqué dans le noyau où il s'associe au régulateur de transcription Suppressor of Hairless (**Su(H)**) chez la Drosophile, aussi appelé **CSL** chez les vertébrés. Cette association agit comme un activateur de transcription des gènes du complexe *enhancer of split* (**E(spl)**) chez la Drosophile appelé *hes* chez les mammifères. E(spl)/HES réprime la transcription de gènes parmi lesquels se trouvent les gènes neurogéniques du complexe *achaete/scute* chez la Drosophile et *mash-1* chez les mammifères. Le récepteur Notch, avant d'être externalisé à la membrane cellulaire, subit un clivage par une enzyme de type furine et une glycosylation par la protéine Fringe, le tout dans l'appareil de Golgi.

Notch par les ligands Delta et Serrate présents sur les cellules adjacentes. Une telle régulation de l'expression des ligands et des récepteurs de la voie Notch existe avec les protéines homologues chez *C. elegans* et le Xénope (Haddon et al., 1998; Heitzler et al., 1996; Wettstein et al., 1997). Chez la Drosophile, E(spl) réprime la transcription des activateurs de transcription bHLH achaete/scute (Ac/Sc) appelés aussi gènes proneuraux, et conduit à une répression des gènes nécessaires à une différenciation neurale dans les cellules dans laquelle la voie Notch est activée. Notons que la voie de signalisation Notch ne requiert pas forcément les protéines CSL et E(spl) ou HES lors de certaines décisions de devenir cellulaire (Lecourtois and Schweisguth, 1995; Shawber et al., 1996).

Diverses études ont montré que la voie de signalisation Notch était nécessaire à la bonne différenciation des kératinocytes et qu'elle était sous la dépendance de la voie de signalisation Wnt (voie canonique,  $\beta$ -caténine), et en interaction avec les protéines p63 et p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, inhibitrices du cycle cellulaire (Ambler and Watt, 2007; Estrach et al., 2006; Lefort et al., 2007; Nguyen et al., 2006; Okuyama et al., 2004).

#### **b-** *Phénomène d'inhibition latérale*

Le processus d'inhibition latérale a été pour la première fois caractérisé chez *Caenorhabditis elegans* lors de la détermination de la cellule d'ancrage de la gonade (Sternberg, 1988). Deux cellules contiguës ont chacune la potentialité de devenir une cellule d'ancrage. Elles interagissent de manière à ce que l'une devienne la cellule d'ancrage, tandis que l'autre devient le précurseur du tissu utérin. La potentialité de ces deux cellules à acquérir l'un ou l'autre devenir a été montrée grâce à deux mutants différents. Chez les mutants récessifs *lin-12*, les deux cellules deviennent des cellules d'ancrage, tandis que chez les mutants dominants, les deux cellules deviennent des précurseurs utérins (Sternberg, 1988). Le gène *lin-12* code un récepteur transmembranaire et est fonctionnel uniquement dans la cellule

destinée à être le précurseur du tissu utérin. Initialement, les deux cellules synthétisent de façon équivalente à la fois le ligand nécessaire à la différenciation utérine (le ligand transmembranaire lag-12) et son récepteur (la protéine lin-12). A un moment donné, une des cellules sécrète de façon aléatoire une quantité un peu plus grande de lag-12, ce qui provoque chez sa voisine l'arrêt de la production de cette molécule ainsi qu'une production accrue de la protéine lin-12. La cellule sécrétant lag-12 se différencie en cellule d'ancrage de la gonade, et la cellule produisant le récepteur transmembranaire lin-12 devient le précurseur du tissu utérin. Ces résultats ont mis en évidence deux aspects importants du processus conduisant à des déterminations distinctes entre deux cellules équivalentes au départ. Premièrement, la différence initiale entre les deux cellules est due au hasard. Deuxièmement, ces différences initiales sont renforcées par des rétroactions. Ce phénomène a été décrit dans des modèles aussi différents que la morphogénèse pulmonaire (Ghabrial and Krasnow, 2006) ou dentaire (Mitsiadis et al., 2005).

### **c-** *Régulation de la signalisation Notch*

Pour être fonctionnel, le récepteur Notch doit subir un clivage protéolytique dans sa partie extracellulaire. L'enzyme responsable de ce clivage est une convertase de type furine. Ce clivage extracellulaire se produit durant le trafic intracellulaire dans le réseau trans-Golgi, avant que le récepteur atteigne la surface cellulaire. Les deux parties du récepteur Notch sont alors rassemblées par des ponts disulfures. D'autre part, l'association du ligand au récepteur Notch nécessaire à l'activation de la voie de signalisation Notch provoque deux clivages protéolytiques séquentiels, l'un dans la partie extracellulaire de Notch, et l'autre dans le domaine transmembranaire au niveau de la membrane cytoplasmique. Le premier clivage semble être effectué par la protéine Kuzbanian (identifiée chez la *Drosophile*), une métalloprotéase transmembranaire de la famille ADAM (« A Disintegrase And

Metalloprotease Domain »). Ce clivage du domaine extracellulaire empêche le récepteur Notch d'être activé plusieurs fois par un ligand. Le second clivage nécessite un complexe protéique nommé  $\gamma$ -sécrétase qui contient les présénilines 1 et 2. Ce complexe protéique a été identifié comme responsable du clivage intracellulaire d'APP, un précurseur du bêta-peptide amyloïde qui est un constituant majeur des plaques amyloïdes retrouvées dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (pour revue, (Ehebauer et al., 2006)). Lors de l'activation de la voie de signalisation Notch, ce clivage permet le relargage du fragment NICD. Cependant, des expérimentations (Berechid et al., 2002) ont montré que l'activation de la voie de signalisation Notch n'est pas totalement stoppée chez des souris déficientes en préséniline 1 et 2 (inactivation double des gènes préséniline 1 et préséniline 2). Ce résultat suggère soit qu'une autre protéase permet le clivage d'un petit nombre de fragments intracellulaires du récepteur Notch, soit qu'il existe un autre type de voie de signalisation Notch ne nécessitant pas le clivage d'un fragment intracellulaire du récepteur.

Une autre façon de réguler la voie de signalisation Notch est de contrôler la sensibilité du récepteur vis-à-vis de ses différents ligands. La protéine Fringe joue ce rôle chez la Drosophile en diminuant la sensibilité de Notch vis-à-vis du ligand Serrate et en augmentant la sensibilité de Notch vis-à-vis du ligand Delta (Fleming et al., 1997; Panin et al., 1997). Il a été montré que Fringe est une glycosyltransférase qui catalyse le branchement de groupements GlacNAC sur des résidus O-fucose de certains motifs EGF du récepteur Notch au niveau de l'appareil de Golgi (Bruckner et al., 2000; Moloney et al., 2000a; Moloney et al., 2000b), avant que Notch n'atteigne la surface cellulaire. La glycosylation du récepteur lui confère une affinité plus grande envers le ligand Delta et une affinité moindre envers Serrate. Chez les mammifères, il existe 3 gènes *fringe* : *radical fringe*, *manic fringe* et *lunatic fringe* (Cohen et al., 1997; Johnston et al., 1997), capables de glycosyler les récepteurs Notch pour moduler son affinité vis-à-vis de ses différents ligands Delta et Serrate/Jagged. Une plus

grande finesse dans la régulation de la voie Notch chez les mammifères est apportée par la plus grande diversité des gènes *notch*, *delta*, *serrate/jagged* et *fringe*. Celle-ci permet une grande combinatoire de récepteurs plus ou moins glycosylés avec plusieurs ligands.

#### **d-** *Signalisation Notch et établissement des frontières*

Comme son nom l'indique, la protéine Fringe (bord en anglais) est impliquée dans l'établissement de frontières entre différentes sous-populations cellulaires au cours du développement de la *Drosophile* et des vertébrés. Une des meilleures illustrations en est la compartimentalisation dorso-ventrale de l'aile de la *Drosophile*. L'aile adulte est formée de 2 couches opposées de cellules, l'une sur la face dorsale et l'autre sur la face ventrale. Dans le disque, les cellules des futures couches dorsale et ventrale se trouvent dans une "poche". Celle-ci se subdivise en quatre compartiments distincts correspondant aux quatre quartiers délimités par une frontière dorso-ventrale et une frontière antéro-postérieure. Les cellules à l'interface entre les compartiments dorsal et ventral sont appelées la "marge" de l'aile. L'intersection entre les frontières dorso-ventrale et antéro-postérieure au centre de la "poche" correspond à la partie la plus distale de l'aile adulte, tandis que le tour de la poche correspond à la partie la plus proximale de la future aile.

Dans le disque imaginal de l'aile, le récepteur Notch est présent uniquement à la surface des cellules de la couche dorsale et de la couche ventrale qui composent la marge de l'aile. L'activation de la voie de signalisation Notch permet l'expression de *Wingless* de façon homogène dans les cellules des couches dorsale et ventrale de la « marge ». Les parties dorsale et ventrale de l'aile adulte ont exactement la même surface, et cette répartition homogène de l'expression de *Wingless* est nécessaire pour un bon repliement et une forme correcte de l'aile. Cette activation de la voie de signalisation Notch uniquement au niveau de la marge est déterminée par le lieu d'expression de la protéine Fringe. L'expression ectopique

de Fringe dans certains clones cellulaires aboutit à la formation de "marges" ectopiques se développant à la frontière entre les clones exprimant Fringe et les cellules ne l'exprimant pas (Irvine and Wieschaus, 1994).

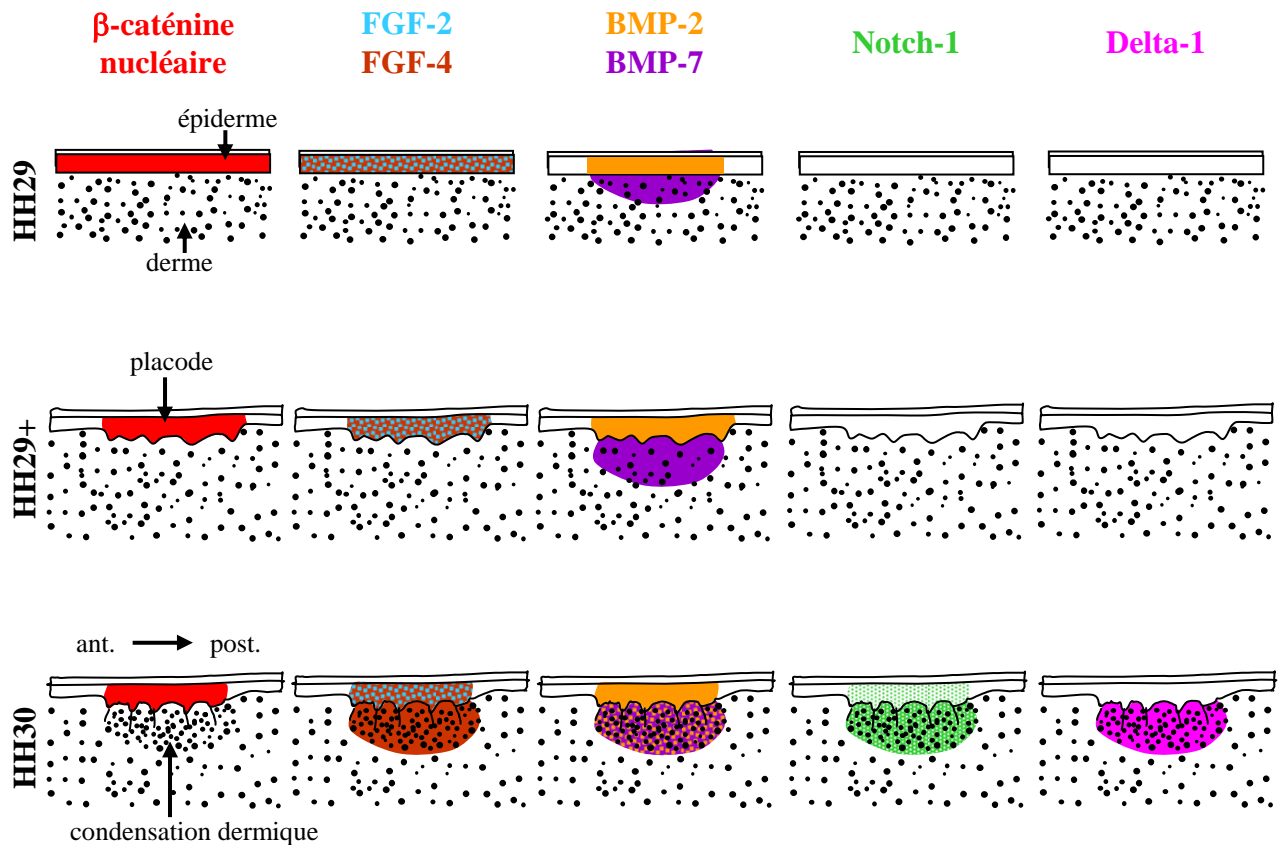
Fringe est exprimé sous le contrôle du gène *apterous* dans toutes les cellules dorsales du disque imaginal normal. Le ligand Serrate est synthétisé également dans les cellules dorsales de l'aile, et le ligand Delta est présent dans les cellules ventrales. Ce système est donc conçu de telle façon que les récepteurs Notch des cellules dorsales de la "marge" soient activés uniquement par les cellules ventrales de la "marge" exprimant Delta, et que les récepteurs Notch des cellules ventrales de la marge soient activés uniquement par les cellules dorsales de la "marge" exprimant Serrate. Nous avons vu plus haut que Fringe, en glycosylant Notch, inhibe son affinité vis-à-vis de Serrate et augmente son affinité vis-à-vis de Delta. Fringe étant présente uniquement dans les cellules dorsales de l'aile ne glycosyle que les récepteurs Notch des cellules dorsales. Ainsi, le ligand Delta uniquement présent dans les cellules dorsales ne peut activer que les récepteurs Notch non glycosylés, c'est-à-dire ceux situés à la membrane des cellules ventrales de la marge. A l'inverse, le ligand Delta présent dans les cellules ventrales active fortement les récepteurs Notch glycosylés des cellules dorsales de la marge. Chez le poulet, de façon comparable l'AER, marquant la limite dorso-ventrale du membre, se forme à l'interface entre les cellules qui expriment Radical Fringe et les cellules qui ne l'expriment pas (Laufer et al., 1994; Rodriguez-Esteban et al., 1997).

Cette capacité lors de l'établissement des frontières se retrouve lors de la ségrégation des cellules souches cutanées (Satija et al., 2007; Vauclair et al., 2005; Yamamoto et al., 2003).

**e- Signalisation Notch lors de la mise en place du primordium de phanère**

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. La ségrégation des cellules de la condensation dermique implique l'expression de Notch-1 et Delta-1 dans la condensation dermique, et du récepteur Notch-2 par les cellules dermiques interfolliculaires.

Chez l'embryon de poulet, lors de la mise en place des primordia plumaires, Delta-1 et Serrate-1, ligands des récepteurs Notch, ont été décrits dans la partie postérieure du derme lors de l'orientation du bourgeon plumaire, et pas dans les phases d'induction ; Notch-1, lui, est exprimé dans l'épiderme et le derme, faiblement au stade du primordium, puis renforcé lors de la croissance du bourgeon plumaire. (Chen et al., 1997) (**Fig. 15**).



**Figure 15 : Domaines d'expression de facteurs impliqués lors du dialogue moléculaire dans la ptéryle dorsale de l'embryon de poulet.**

La  $\beta$ -caténine nucléaire reflète l'activation de la voie de signalisation Wnt. Elle est présente dès HH29 dans tout l'épiderme puis se restreint à la placode épidermique jusqu'à HH30. L'expression de FGF-2 suit le même profil que l'activation de la  $\beta$ -caténine, alors que FGF-4 est aussi exprimé dans la condensation dermique après sa formation. BMP-2 et BMP-7 sont exprimés dès le stade HH29 dans les territoires présomptifs respectivement de la placode et de la condensation dermique. Au stade HH30, l'expression de BMP-2 s'étend dans tout le primordium. Les protéines de la signalisation Notch sont exprimées tardivement, à partir du stade HH30, lorsque les structures sont formées. A ce stade, les expressions de Notch-1 dans tout le primordium et de Delta-1 dans la condensation dermique commencent à être détectées (Chen et al. 1997, Viallet et al. 1998, Noramly, 1998, Noramly 1999, Patel 1999, Mandler 2004).



## VI. Modèles mathématiques

Diverses études ont été menées durant ces 20 dernières années afin de trouver un modèle mathématique pouvant expliquer la formation du pattern hexagonal au sein des champs plumaires à partir des données moléculaires connues (pour revue, (Jiang et al., 2004)).

### 1. Différents types de modèle

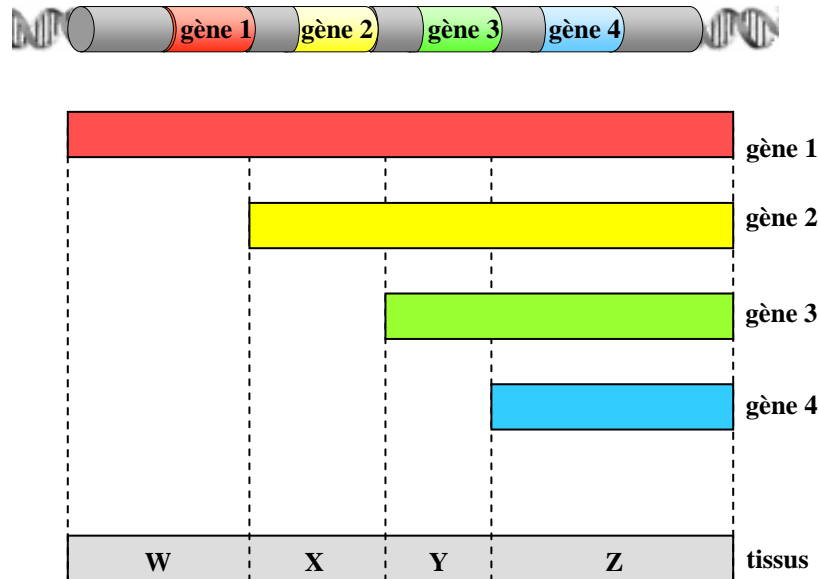
#### i) Basés sur des codes moléculaires

Toutes les cellules d'un organisme ont les mêmes caractéristiques génétiques, mais sous l'influence de morphogènes, leurs attributs physico-chimiques vont être modifiés. Ceci permet à chaque cellule de l'organisme d'avoir une signature biologique unique (Wolpert, 1971). Les cellules, par leurs capacités à « sentir » leur environnement, sont capables de détecter les changements dans les gradients de morphogènes les entourant et de se différencier (**Fig. 16A**), ou de migrer en conséquence (Zhang et al., 2005).

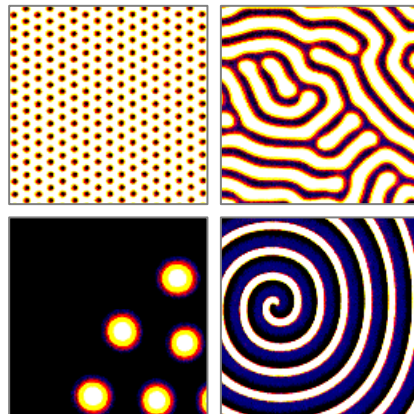
#### ii) Basés sur les gabarits

Certains modèles sont basés sur la formation séquentielle des rangs de primordia latéraux en utilisant les médians comme gabarit (Cruywagen et al., 1992; Murray et al., 1983). A partir du rang médian, les autres s'établissent latéralement à l'aide de facteurs morphogénétiques (Davidson, 1983a; Davidson, 1983b). Ce type de modèle tient compte principalement de la matrice extracellulaire, ainsi que des forces de traction exercées sur les cellules à l'origine du pattern, ici les fibroblastes dermiques.

A



B



**Figure 16 : Types de modèles mathématiques.**

- **Basé sur le codage moléculaire.** Les cellules constituant un organe sont soumises à un microenvironnement moléculaire guidant leur différenciation. Cette dernière induira l'expression d'autres facteurs nécessaires à la bonne différenciation des cellules voisines. Ces modèles sont basés sur le microenvironnement, combinaison d'une somme de facteurs à l'origine de tel ou tel type tissulaire (A).

- **Basé sur un équilibre.** Dans les modèles basés sur la réaction – diffusion, un activateur permet la formation d'une structure, alors que l'inhibiteur bloque cette formation. Les paramètres régissant ce type de modèles permettent de reproduire différents motifs (d'après H.G. Purwins) (B).

### iii) Basés sur un équilibre (réaction-diffusion)

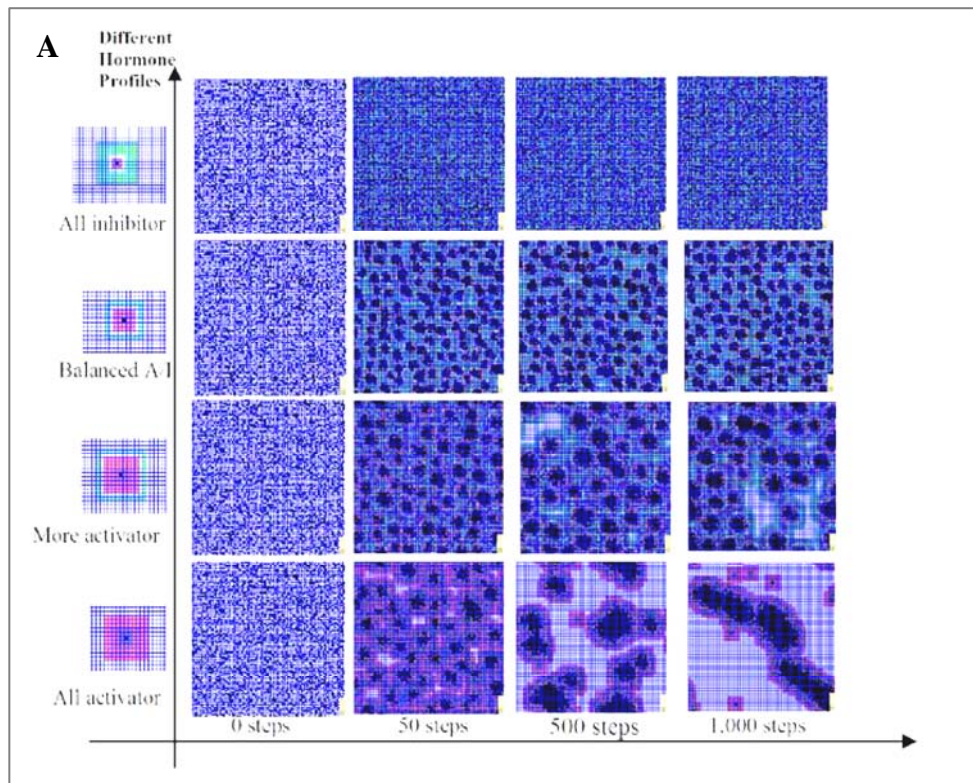
Les mécanismes de réaction-diffusion sont utilisés pour décrire l'apparition de motifs périodiques (Gierer and Meinhardt, 1972; Jung et al., 1998; Turing, 1952). La réaction-diffusion prend en compte les fluctuations stochastiques dans les expressions moléculaires menant à la formation de pics et creux auto-amplifiés et auto-organisés. Malgré leur instabilité, il peut y avoir propagation du motif à l'aide d'interactions chimiques ou de forces mécaniques. Des études ont postulé que lors de l'établissement du pattern par réaction-diffusion, certaines molécules pouvaient être considérées comme des activateurs (induire des structures périodiques), alors que d'autres sont des inhibiteurs (supprimer ces formations) (Meinhardt and Gierer, 1974; Meinhardt and Gierer, 2000). L'expression différentielle entre l'activateur et l'inhibiteur à chaque point du domaine considéré permet de définir si nous sommes sur un pic ou dans un creux (**Fig. 16B**).

Ces travaux sont à la base de la théorie de l'inhibition latérale, suggérée pour la première fois en 1972 (Ede, 1972) lors de la mise en place des plumes et à la base du système Notch.

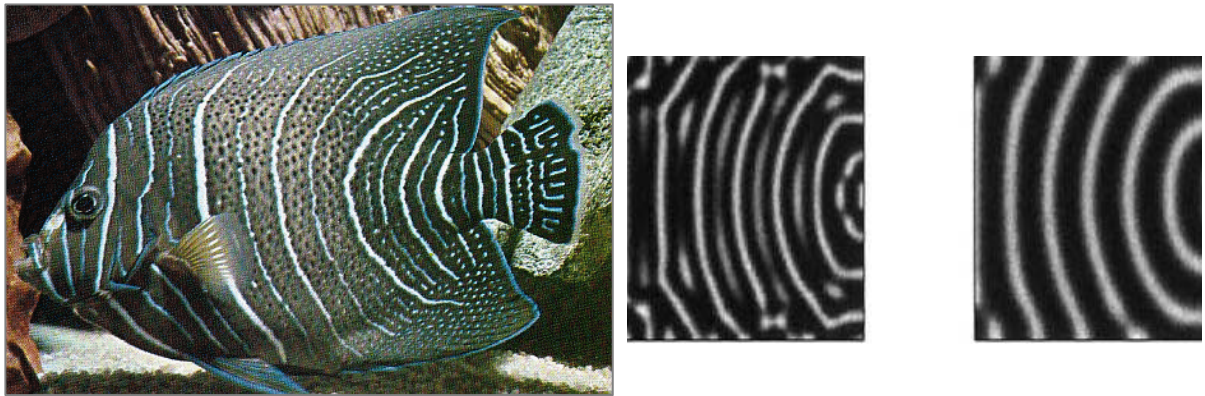
## **2. Modèles de formation des patterns cutanés, « digital hormone » (DHM)**

Le modèle de « Digital Hormone » (DHM), proposé par le laboratoire du Dr. Chuong (Jiang et al., 2004) est basé sur la réaction-diffusion entre un activateur (Follistatine) et un inhibiteur (BMP) dans un domaine homogène (**Fig. 17A**). Il permet la formation d'un micropattern hexagonal stable dans un domaine défini à partir d'un nombre de cellules données. La modification des paramètres du DHM permet la formation de divers patterns allant de l'hexagonal à la formation de lignes, que l'on peut retrouver chez certains organismes comme le tigre ou le poisson *Pomacanthus semicirculatus* (Painter et al., 1999)

**(Fig. 17B).** Une étude récente (Sick et al., 2006) a proposé le couple activateur/inhibiteur Wnt/Dkk comme étant à l'origine de l'espacement entre les follicules pileux. La difficulté de l'utilisation du modèle souris est l'obligation de prendre en compte les 2 vagues successives de génération de follicules pileux. Le domaine de départ est homogène et la formation de chaque vague se fait de façon uniforme sur tout le domaine. Ce modèle reflète les résultats biologiques obtenus à l'aide de souris transgéniques surexprimant Dkk dans la peau, ainsi que la fusion des primordia observés lors de l'activation de la signalisation Wnt.



**B**



**Figure 17 : Modèles de réaction-diffusion à l'origine de différents « patterns ».**

- **Modèle de digitale hormone (DHM).** Proposé par le groupe de C.M. Chuong. Il permet de simuler la formation du « micropattern » hexagonal en fonction d'un mécanisme de réaction-diffusion appliqué sur une quantité de cellules donnée. En modifiant la balance activateur/inhibiteur, le motif de distribution change (d'après T.X. Jiang) (A).

- **Modèle de la formation des ligne sur le Pomacanthus semicirculatus.** La déclinaison du modèle de réaction-diffusion impliquant un activateur et un inhibiteur uniquement permet, en modifiant les paramètres initiaux et d'interaction d'obtenir des motifs de distribution existant dans la nature (d'après K.J. Painter)(B).

*Buts de thèse*

## **BUTS DES TRAVAUX DE THESE**

Mes travaux s'insèrent dans la problématique générale d'élucidation de la nature moléculaire des différents facteurs responsables de la formation des primordia de phanères. Le but principal de mes travaux de thèse était de déterminer quels étaient les facteurs moléculaires impliqués dans la mise en place de la condensation dermique des primordia de phanères et sa stabilisation.

De nombreuses questions restaient en suspens malgré les nombreuses d'études ayant eu pour objet la morphogénèse cutanée. Ainsi, plusieurs travaux avaient montré que la prolifération cellulaire n'était pas à l'origine de la soudaine augmentation de densité cellulaire observée au niveau des condensations dermiques (Desbiens et al., 1991; Rouzankina et al., 2004; Wessells, 1965), et qu'une migration devait en être la cause. Cependant, les mécanismes sous tendant l'arrêt de la prolifération et la migration des fibroblastes, et aboutissant à la réorganisation du derme, restaient à élucider.

Il est surprenant que l'implication de la signalisation calcique, et des gènes calcium-dépendants, n'ait jamais été étudiée lors des phases précoces de la morphogénèse cutanée. Intervient-elle lors de la formation ou de la stabilisation de la condensation dermique ?

L'arrêt de prolifération des fibroblastes au sein de la condensation suggère l'intervention d'un inhibiteur du cycle cellulaire. Parmi les inhibiteurs connus, l'expression de la protéine p21<sup>WAF1/CIP1</sup> qui est en aval de la signalisation Notch (Devgan et al., 2005), signalisation impliquée lors de la formation des primordia (Chen et al., 1997; Favier et al., 2000), fait de cette protéine un bon candidat.

En ce qui concerne la migration cellulaire, la question du ligand sous-tendant la réorganisation du derme dense n'était pas claire. La Fibronectine doit y jouer un rôle majeur puisque son inhibition induit une perte de la formation des primordia (Jiang and Chuong,

1992), cependant elle est exprimée majoritairement au sein de la condensation dermique. Cette molécule a toujours été étudiée dans sa globalité lors de la morphogénèse cutanée, mis à part dans les phénomènes de cicatrisation (Liu et al., 2006). Or, le gène de la Fibronectine comporte trois exons permettant un épissage alternatif et l'expression de différentes formes. Ces exons sont nommés EIIIA, EIIIB et EV (French-Constant and Hynes, 1989; Norton and Hynes, 1987; Peters et al., 2002). Seul le domaine EIIIA de la Fibronectine a été impliqué dans la régulation de l'adhérence (Manabe et al., 1997), de la condensation des cellules (White et al., 1996) ainsi que dans la prolifération (Manabe et al., 1999). Mes résultats préliminaires montrant que la forme EIIIA était exclue du primordium de phanère indiquaient qu'une voie de signalisation présente dans le microenvironnement du primordium devait intervenir lors de l'épissage. Parmi les nombreuses voies de signalisation présentes, seule la voie de signalisation BMP a été classée parmi les inhibitrices, sans que sa fonction réelle ne soit comprise.

Trois différents BMP sont exprimés dans le territoire folliculaire, BMP-2, BMP-4 et BMP-7. L'hypothèse admise sur le plan international est que ces facteurs inhibent la formation du primordium. Cette hypothèse sous-entend qu'une inhibition de la signalisation BMP soit présente au niveau du territoire folliculaire (Jung et al., 1998). A l'heure actuelle, seuls deux inhibiteurs sont connus dans la peau embryonnaire de poulet : la Follistatine et Dm/Gremlin. Le premier est exprimé tout d'abord dans l'ensemble de la placode, puis très rapidement se trouve exprimé par les cellules situées à sa périphérie (Patel et al., 1999). Le second est exprimé uniquement dans le domaine interfolliculaire (Bardot et al., 2004). Même si l'on postule leur diffusion plus rapide que celle des BMPs, ce n'est pas suffisant pour soutenir la théorie d'un rôle inhibiteur des BMPs sur la formation des phanères. D'autre part, Msx-1 et Msx-2, gènes cibles de la signalisation BMP sont exprimés au sein de la placode (Chuong et al., 1996; Noveen et al., 1995). La signalisation BMP devrait donc, au contraire de



cette hypothèse, être active lors de la formation du primordium de phanère, et pourrait, peut-être participer à l'épissage alternatif de l'exon EIIIA de la Fibronectine. Son rôle exact ainsi que sa capacité inhibitrice de la formation des plumes lorsqu'elle est suractivée (par le biais d'infection virale RCAS (Noramly and Morgan, 1998), ou l'utilisation de billes chargées à 0,3µg/ml (Jung et al., 1998; Patel et al., 1999)) restaient donc à expliquer.

Une dernière question restait à aborder, celle de la stabilisation de la condensation dermique une fois qu'elle est formée. Lors de l'excision de la peau et sa mise en culture organotypique, sa labilité provoque la disparition du primordium (Revue I). J'avais montré en effet, lors de mon mémoire de DEA, qu'il y avait un retour à l'état de peau homogène peu après la mise en culture si on partait d'explants de peau embryonnaire dorsale présentant trois rangs de primordia. Ce phénomène de retour en arrière, avant la réinduction de la morphogénèse cutanée constituait un modèle intéressant pour l'étude de la mise en place du primordium. L'utilisation de ce modèle devait permettre, entre autres, l'identification des facteurs responsables de la stabilisation du primordium de phanère. Il était intéressant de savoir si les molécules impliquées dans la migration étaient ensuite impliquées dans le phénomène de stabilisation, ou de déterminer si la signalisation Notch seule contrôle cette étape, ainsi que suggéré par les résultats des expérimentations de morphogénèse cutanée murine (Devgan et al., 2005).

Enfin, les précédents modèles mathématiques, proposant une explication théorique sur la formation des « patterns » sont basés sur un phénomène de réaction diffusion nécessitant la présence d'un activateur et d'un inhibiteur. D'autre part, ils considèrent un domaine homogène à l'instant initial, ce qui n'est pas concordant avec ce qui est observé en particulier chez le poulet, formation d'un premier rang puis extension latérale ou bilatérale (selon le champ plumaire considéré). Ces modèles qui permettent de faire la différence entre les domaines folliculaires et interfolliculaires ne prennent pas non plus en compte la migration

cellulaire à l'origine de la formation de la condensation dermique. Il fallait donc introduire un terme de prolifération, le déclenchement ou l'arrêt du cycle cellulaire, ainsi qu'un terme de migration donc de prendre en compte de nouvelles interactions moléculaires, comme la chémo-attraction ou chémo-répulsion que l'on retrouve dans d'autres modèles (Murray and Oster, 1984; Painter et al., 1999). Un dernier point était de comparer les résultats obtenus avec le modèle mathématique, mes propres résultats d'une part, ainsi que ceux des autres équipes ayant travaillé sur la même problématique.

*Travaux de thèse*

# TRAVAUX DE THESE

## I. Introduction : focus sur la condensation dermique

### 1. Le derme, élément clé de la formation du primordium

Lors de la mise en place du primordium de phanère trois étapes principales sont usuellement distingués : la première étape est l'induction, par le biais d'un message dermique homogène, de la formation des placodes au sein de l'épiderme. La seconde est la formation de la condensation dermique sous l'influence de la placode. Enfin, la troisième étape est la transformation du primordium en phanère à l'aide des dialogues intra- et inter-tissulaires. En fait, à chaque message inter-tissulaire fait suite des messages intra-tissulaires. Ainsi, le premier message ubiquitaire du derme dense, sans doute un Wnt (Chang et al., 2004; Noramly et al., 1999), est suivi par l'expression d'Eda dans l'épiderme qui, interagissant avec Edar, est responsable de la formation de la placode. L'expression par cette dernière de FGF-4, à destination du derme dense, est un message permissif indispensable à l'organisation dermique. Celle-ci est différente selon la région, ptilogène (formatrice de plumes) ou lépidogène (formatrice d'écailles) (Chuong, 1998; Viallet et al., 1998). Quelles sont les interactions intra-dermiques, inter-cellulaires ou cellules-matrice, qui prennent alors le relai ?

Durant ma thèse, j'ai choisi de me concentrer sur les éléments morphologiques et moléculaires intra-tissulaires impliqués dans l'organisation dermique. Alors que l'épiderme sera à l'origine du type de phanère, il semble que le derme contrôle la taille, l'espacement et le « pattern » des primordia. Par exemple, la recombinaison hétérospécifique d'un épiderme murin avec un derme aviaire mène à la formation de bourgeons pileux suivant un « micropattern » hexagonal (Dhouailly and Sengel, 1973). Une chose apparaît clairement, un

derme compétent est suffisant pour induire la formation de phanères dans un épiderme glabre (Dhouailly, 1977), y compris au sein d'une peau adulte (Inamatsu et al., 2006). En fait, l'étape cruciale est atteinte par le derme lorsqu'il devient apte à former des condensations dermiques. Le derme est alors capable d'induire la formation de phanères dans tout épithélium d'origine ectodermique qui lui est associé (Dhouailly et al., 2004; Pearton et al., 2005).

## **2. Questions en suspend sur la formation de la condensation dermique**

Les étapes permettant le passage d'un derme dense homogène à un derme hétérogène, comportant des condensations dermiques, suscitent encore de nombreuses questions. Comment les cellules du derme arrêtent de proliférer et migrent jusqu'au territoire sous-placodal afin de former la condensation ? Quel est le facteur déclenchant cette migration ? Comment est contrôlé le diamètre de la condensation dermique, autrement dit, quel est le facteur arrêtant la migration des cellules au sein du territoire sous placodal ? Quel est le rôle de la matrice extracellulaire et des différentes voies de signalisation présentes à ce stade ? En particulier, la signalisation BMP est-elle réellement inhibitrice de la formation des primordia ? Comment les structures formées se stabilisent-elles et quel est le rôle de la signalisation Notch dans ce phénomène ?

## **II. Méthodes d'études employées**

Afin de répondre à ces nombreuses questions, j'ai mis au point diverses techniques d'études *in vitro*, la plupart n'étant pas employées dans le laboratoire, telles que le suivi séquentiel des cultures organotypiques, différents tests de migration, les cultures en gouttes pendantes. J'ai également utilisé des techniques de base en biologie moléculaire telles que le clonage dans pGEM-T, hybridation *in situ* d'embryon et d'explants isolés, la RT-PCR semi-

quantitative ; ainsi que des techniques classiques de biologie cellulaire et microscopie telles que la culture primaire de fibroblastes dermiques, la microinjection de marqueurs fluorescents *in ovo* et *in vitro*, la vidéomicroscopie, la cytométrie en flux (FACS).

### **1. Culture organotypique et labilité des primordia formés**

Durant une cinquantaine d'années, la culture organotypique d'explants de peau embryonnaire a été utilisée pour décrire et analyser les événements morphogénétiques à l'origine du primordium de phanère (Sengel, 1956). Ce développement a toujours été considéré comme linéaire, la peau était mise en culture au cours de la journée et analysée le lendemain matin ou le surlendemain (**Fig. 18**).

Pour savoir ce qui se passait dans les premières heures suivant la mise en culture d'explants de peau embryonnaire, j'ai utilisé la peau dorsale d'embryon de poulet de stade HH30 présentant 3 rangs de primordia, j'ai suivi par vidéomicroscopie ainsi que par coupes histologiques et par hybridation *in situ* la formation du primordium, ainsi que l'expression des transcrits Wnt-7a (spécifique de la placode), FGF-10 (spécifique de la condensation dermique) et BMP-2 (exprimé dans les deux structures) au cours des 12 premières heures (Publ. I, Fig. 2 et 3).

Les phénomènes de désorganisation et réorganisation dermiques observés m'ont permis de mettre en place un nouveau système d'étude puisqu'il y a une récapitulation des événements embryonnaires à l'origine de la mise en place du primordium de phanère dans une peau embryonnaire qui en présentait déjà. Ces événements sont basés sur la migration des fibroblastes dermiques. J'ai pu ainsi mieux appréhender l'aspect moléculaire de cette migration.

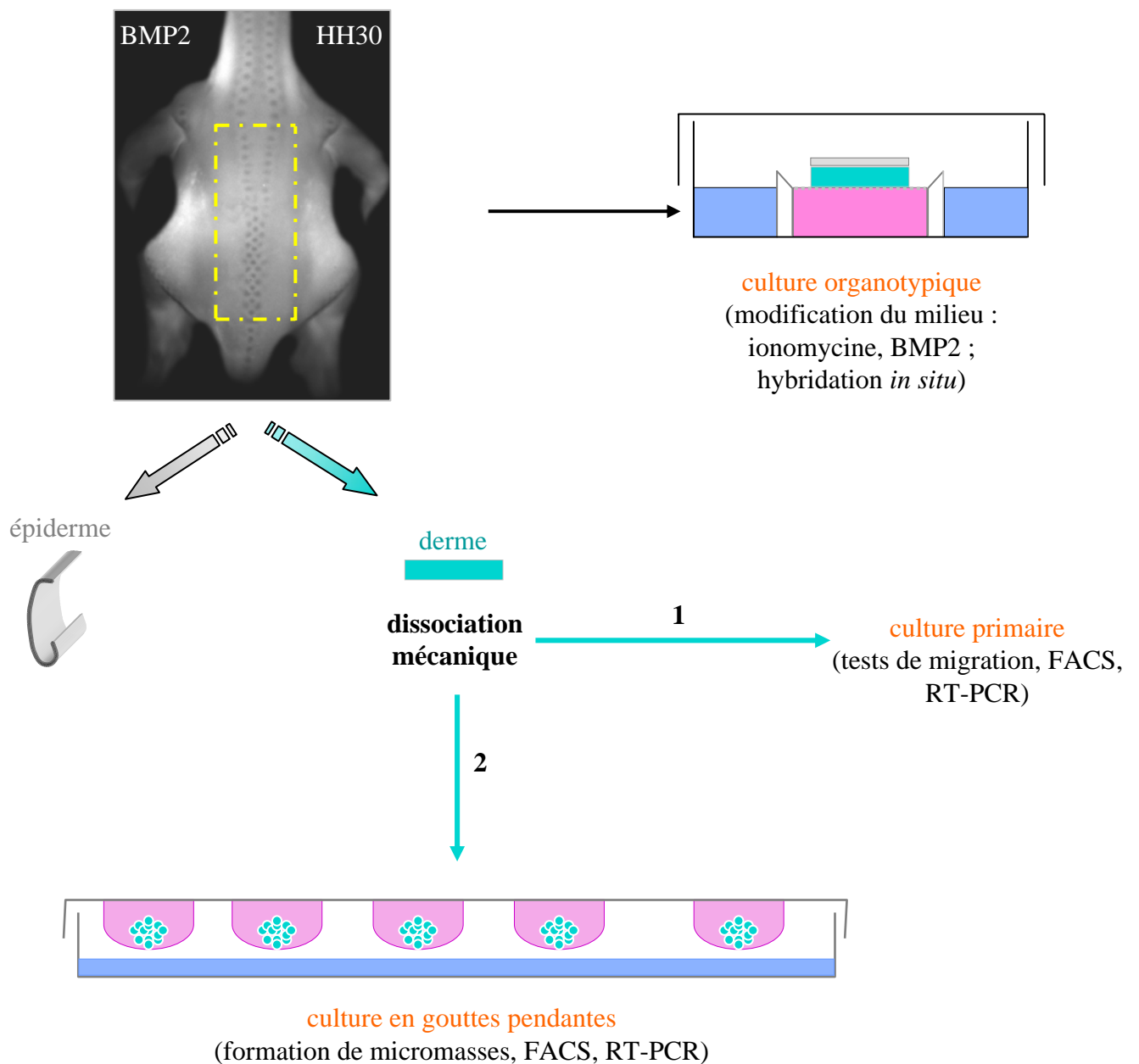
## 2. Tests de migration

Les différents tests de migration ont été faits à l'aide de fibroblastes dermiques fraîchement isolés (**Fig. 18**). Deux types de tests m'ont permis de visualiser un impact sur la migration. Le premier est le test de cicatrisation. Sur une boîte de cellules adhérentes à confluence, dont la prolifération est bloquée à l'aide de Thymidine, des lésions de 750 $\mu$ m de large sont faites à l'aide d'un cône bleu de micropipette. Des images photographiques sont prises à différents temps pour visualiser le recouvrement de la lésion, dû uniquement à la migration cellulaire (Publi. I).

Le second est un test de migration au travers d'une membrane percée de pores de 8 $\mu$ m (VWR International). Les cellules ayant traversé la membrane sont lysées et l'ADN obtenu est quantifié par fluorescence. Ce dernier procédé permet également de tester la chémoattraction induite par un facteur diffusible (Publi. I et II).

## 3. Formation de « condensations dermiques » *in vitro* : culture en gouttes pendantes

Afin de mieux appréhender les différents événements à l'origine de la formation de la condensation dermique, j'ai utilisé le protocole de gouttes pendantes, utilisé auparavant pour la formation de nodules cartilagineux (Stott and Chuong, 2000). Des fibroblastes dermiques fraîchement isolés dans des gouttes s'agrègent en vingt quatre heures et se condensent après quarante huit heures de culture en une micromasse proche de la condensation dermique (Publi. I, II et III).



**Figure 18 : Techniques de cultures organotypique et cellulaire.**

Des embryons de poulet de stade HH30, portant 3 rangs de primordia de phanère, sont disséqués afin de récupérer la peau dorsale. Les explants de peau sont soit mis en culture sur un cellophane posé sur une grille et affleurant le milieu (DMEM + 10% SVF), permettant un développement à l'interface air-liquide ; soit l'épiderme et le derme sont séparés et les fibroblastes dissociés mécaniquement. Les fibroblastes dermiques sont ensuite utilisés en culture adhérente ou en culture en goutte pendantes.



#### **4. Sondes pour hybridation *in situ* et détection par RT-PCR**

Afin d'étudier l'impact de nouveaux facteurs ou de préciser l'ordre d'apparition de facteurs connus lors de la morphogénèse cutanée, j'ai cloné de nouvelles sondes pour hybridation *in situ*, sondes qui n'étaient pas présentes dans l'équipe ou n'ayant pu m'être fournies par d'autres laboratoires. J'ai ainsi, par RT-PCR puis clonage des fragments obtenus, synthétisé les sondes de FGF-10 (Publi. I) et de l'exon EIIIA de la Fibronectine (Publi. II). Le groupe de B. Robert m'a fait parvenir les sondes Msx-1 et Msx-2. Le groupe de M. Bronner-Fraser m'a fourni les sondes des gènes cibles de la signalisation BMP, Id-1, -2, -3 et -4 (Publi. II). Le groupe de T. Jaffredo m'a fait parvenir les sondes Notch-1, Notch-2, Serrate-2 (Publi. III) et le groupe de A.-H. Monsoro-Burq m'a fourni la sonde BMP-7 (Publi. II). J'ai aussi utilisé les sondes Wnt-7a et BMP-2 (Publi. I), Follistatine (Publi. II) et Delta-1 (Publi. III) présentes au laboratoire.

### **III. Synthèse des résultats**

L'ensemble de mes résultats, contenus dans les publications I à III (à partir de la page 100), peuvent se répartir entre la formation et la stabilisation de la condensation dermique. Ils sont confrontés à un modèle mathématique mis au point grâce à la collaboration de Loïc Forest, initialement du laboratoire TIMC du Pr. J. Demongeot.

## 1. Migration cellulaire à l'origine de la formation de la condensation

La formation d'un domaine de haute densité cellulaire sous la placode ne résulte pas d'une prolifération cellulaire. L'organisation dermique par la redistribution des cellules du derme dense permet la formation des condensations dermiques. Ce mécanisme est sous-tendu par la migration cellulaire.

### i) Implication des Intégrines

La migration cellulaire nécessite l'engagement des Intégrines sur leurs ligands de la matrice extracellulaire.

#### **a-** *Calcium et dynamique d'adhérence*

L'entrée de calcium dans les cellules permet l'activation de la phosphatase Calcineurine, ainsi que la kinase CaMKII. La première induisant un passage de la basse à la haute affinité des Intégrines et la seconde l'effet inverse. Lors de tests de cicatrisation, ou de migration au travers d'une membrane, des fibroblastes dermiques fraîchement isolés migrent moins rapidement sous l'influence d'un traitement à l'Ionomycine (ionophore permettant l'entrée passive de calcium dans les cellules) (Publi. I, Fig. 4 et 5), reflétant un blocage en haute affinité des Intégrines (Kuznetsov et al., 1992; Liu and Hermann, 1978). Le même traitement à l'Ionomycine accélère la condensation et la compaction des cellules dans le protocole de culture en gouttes pendantes (permettant de mimer *in vitro* la formation de la condensation) (Publi. I, Fig. 6).

Cette migration nécessite une dynamique rapide du cytosquelette d'actine. J'ai donc étudié l'implication de la petite protéine G Rho dans cette dynamique.

**b- Rho et remodelage du cytosquelette lors de la migration**

L'inhibition de la kinase Rho-dépendante, ROCK, à l'aide du Y-27632 m'a permis d'analyser *in vitro* son implication en culture cellulaire ainsi qu'en culture organotypique.

La première chose à faire était de prouver la présence d'une isoforme de Rho dans les cellules du derme. Une précédente étude, faite par hybridation *in situ* sur de la peau embryonnaire de poulet, avait conclu à la présence de RhoB uniquement dans la placode épidermique ainsi qu'à l'absence de RhoA de l'épiderme ; RhoC n'ayant pas été étudié (McKinnell et al., 2004a). A l'aide d'une RT-PCR semi-quantitative à partir d'épiderme et de derme séparés (Publi. I, Fig. 4), j'ai pu confirmer l'absence de RhoA de l'épiderme et du derme. Par contre, j'ai montré que RhoB est exprimé dans les deux tissus, bien que quatre fois plus exprimé dans l'épiderme que dans le derme, et que RhoC est exprimé dans les deux tissus. La qualité de la séparation des deux compartiments a été validé par la détection de produits PCR FGF-10 (spécifiques du derme). Il était donc pertinent de comprendre le rôle de ROCK sur la migration des cellules dermiques.

Que ce soit par des tests de cicatrisation (Publi. I, Fig. 4) ou des tests de migration au travers d'une membrane (Publi. I, Fig. 5), l'inhibition de ROCK par le Y-27632 (Calbiochem) (Uehata et al., 1997) induit un ralentissement de cette migration. En culture en goutte, les cellules ne parviennent pas à se compacter et forment un réseau lacunaire (Publi. I, Fig. 6). L'utilisation de cet inhibiteur en culture organotypique provoque un ralentissement de la réorganisation usuelle du derme lors des premières heures de culture, ainsi qu'une forte perturbation du « micropattern » au bout de 48h de culture. Les bourgeons plumaires obtenus sont hétérogènes au regard de leur taille et forme (Publi. I, Fig. 7).

Donc, ROCK est bien impliqué dans les phénomènes de migration des fibroblastes lors de l'organisation du derme. Quel rôle tient la matrice extracellulaire lors de la redistribution des cellules du derme dense ?

## ii) Rôle de la Fibronectine

Pour coordonner la migration cellulaire, la composition de la matrice extracellulaire est importante. La répartition de ses composants dans le compartiment cutané a déjà été décrite (Jiang and Chuong, 1992; Mauger et al., 1982), mais l'analyse de leurs rôles exacts restait superficielle. J'ai étudié l'implication de la Fibronectine, ligand des Intégrines, et capable de réguler la migration cellulaire.

### **a-** *Fibronectine et migration cellulaire*

Par immunohistochimie, j'ai dans un premier temps confirmé les résultats d'une précédente étude (Mauger et al., 1982) montrant qu'il y avait un renforcement de l'expression de cette protéine dans les condensations dermiques ainsi que dans la partie supérieure du derme dense en cours de réorganisation (Publi. I, Fig. 8). A l'aide d'un anticorps bloquant la fixation des Intégrines sur la Fibronectine (Jiang and Chuong, 1992), j'ai montré qu'il empêchait la reformation des condensations dermiques après leur disparition en culture organotypique (Publi. I, Fig. 8), ainsi que l'agrégation des cellules lors de la formation des micromasses (Publi. I, Fig. 6).

La Fibronectine est donc un ligand essentiel à la coordination de la migration des cellules pour former les condensations dermiques. Mais cette protéine, qui est sujette à des épissages alternatifs, est-elle exprimée sous plusieurs formes lors de la morphogénèse cutanée ?

**b- Epissage alternatif de la Fibronectine et réorganisation du derme**

Il existe trois exons différentiellement exprimés dans la Fibronectine, EIIIA, EIIIB et EV. Ces différentes formes n'avaient pas encore été discriminées lors de la morphogénèse cutanée. Après avoir construit une sonde ARN dirigée contre les transcrits de la Fibronectine portant l'exon EIIIA, j'ai fait des hybridations *in situ* sur des explants de peau dorsale HH29+ et HH30. J'ai pu ainsi montrer que l'exon EIIIA est exprimé au niveau du derme dense en cours de réorganisation, et est totalement exclu de la condensation dermique, alors que c'est le domaine où la Fibronectine est la plus exprimée (Publi. II, Fig. 3). Pour établir un lien entre agrégation cellulaire et l'expression d'EIIIA, j'ai fait des RT-PCR semi-quantitatives lors de la formation de micromasses. Plus l'agrégation des cellules augmente, plus la proportion de Fibronectine exprimant EIIIA diminue (Publi. II, Fig. 3).

Donc, cet exon semble nécessaire à la migration des cellules mais n'étant plus requis lorsque les cellules ne migrent plus, il est épissé. Il restait donc à savoir quel facteur était à l'origine de cet épissage. Pouvait-il s'agir d'un BMP ?

**iii) Signalisation BMP à l'origine de la formation de la condensation****a- Chronologie d'expression des facteurs BMPs lors de la morphogénèse cutanée**

Par hybridation *in situ*, les expressions de BMP-2, BMP-4 et BMP-7 ont été colocalisées avec le primordium de phanère dans la peau embryonnaire de poulet (Patel et al., 1999). Des expérimentations utilisant des infections RCAS (Noramly and Morgan, 1998), ainsi que l'application de billes chargées (Jung et al., 1998; Patel et al., 1999) ont conclu au rôle inhibiteur de cette voie de signalisation lors de la mise en place des primordia de phanère, mais la mécanistique de cette inhibition n'avait pas été étudiée. Nous pouvions également nous demander si les différents BMPs exprimés jouent des rôles similaires ou différents ?

L'expression précoce de BMP-2 par rapport à BMP-4 et à la signalisation Eda au sein du primordium de phanère a été démontrée (Houghton et al., 2005). J'ai voulu savoir si BMP-2 était le premier signal BMP à être exprimé. Une étude réalisée sur la ptéryle fémorale m'a permis de comparer la chronologie des expressions de BMP-2 et BMP-7 lors de la morphogénèse cutanée au niveau des champs fémoraux droit et gauche d'un même embryon de poulet de stade HH30. J'ai ainsi pu montrer que BMP-7 était exprimé plus précocement que BMP-2 (Publi. II, Fig. 1). Il est donc le facteur BMP le plus précoce lors de la mise en place du primordium de phanère. La signalisation BMP doit-elle être inhibée au sein des primordia de phanère pour permettre leur formation (entre autres (Bardot et al., 2004; Jung et al., 1998; Noramly and Morgan, 1998; Patel et al., 1999)) ? L'argument principal de mon hypothèse contradictoire était que les gènes *Msx-1* et *Msx-2*, cibles de la signalisation BMP (Ramos and Robert, 2005), sont exprimés dans la placode épidermique (Noveen et al., 1995). D'autres gènes cibles de cette signalisation interviennent-ils au cours de la morphogénèse plumaire ?

#### **b-** *Expression de gènes cibles de la signalisation BMP : les gènes Id*

Les gènes *Id* sont connus pour être des gènes cibles de la signalisation BMP (Miyazono and Miyazawa, 2002). Par hybridation *in situ*, j'ai suivi l'expression des quatre *Id* identifiés chez les oiseaux (Kee and Bronner-Fraser, 2001). Alors qu'*Id-2* ne semble pas exprimé dans la peau embryonnaire dorsale de poulet HH30, *Id-1*, *Id-3* et *Id-4* sont exprimés au niveau du territoire du primordium. De plus, on peut noter qu'*Id-4* est exprimé sous forme d'anneau dans les primordia les plus anciens, le centre en étant dépourvu (Publi. II, Fig. S1). L'étude de la chronologie d'expression de BMP-7 et de différents gènes cibles de la signalisation BMP m'a permis de montrer que les expressions de BMP-7 et *Id-3* sont synchronisées (résultat non présenté).

Comme les gènes *Msx-1*, *Msx-2*, *Id-1*, *Id-3* et *Id-4*, tous gènes cibles de la signalisation BMP, sont exprimés lors de la mise en place du primordium de phanère, il est évident que cette voie de signalisation est active lors de la morphogénèse cutanée. Il n'est donc pas requis, contrairement au dogme actuel (Jung et al., 1998) que cette voie soit inhibée pour permettre la formation des phanères. Mais quelle est son rôle, plus précisément les différents BMPs ont-ils des rôles distincts ?

### **c-** *Rôles antagonistes de BMP-2 et BMP-7 sur la migration cellulaire*

Afin de déterminer si la signalisation BMP influait sur la migration cellulaire lors de la formation de la condensation dermique, j'ai utilisé les molécules FGF-2 (connue comme étant un chémo-attracteur pour les fibroblastes dermiques (Song et al., 2004)), BMP-2 et BMP-7 lors d'un test de migration à travers une membrane (Lauffenburger, 1996) à partir d'une population de fibroblastes dermiques fraîchement isolés. Alors que l'ajout de 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) ou de FGF-2 active la migration des cellules à travers la membrane, signe d'un effet chémo-attracteur, il a été assez surprenant de voir que BMP-7 possède un effet de chémo-attraction plus conséquent que FGF-2. Par contre, BMP-2 bloque la chémo-attraction induite par le SVF. L'ajout concomitant de BMP-2 et BMP-7 inhibe l'effet de l'un et de l'autre facteur, les cellules ont une migration proche des conditions témoin (Publi. II, Fig. 2).

Donc, les facteurs BMP-2 et BMP-7 ont un impact inverse sur la migration des cellules, BMP-7 la favorisant alors que BMP-2 l'inhibe. Une question restait : quelle est la mécanistique de cette inhibition ?

**d- BMP-2 et épissage alternatif de l'exon EIIIA de la Fibronectine**

Grâce à une hybridation *in situ* comparant leur expression dans les champs fémoraux droit et gauche (dont le développement est synchronisé dans un même embryon (Houghton et al., 2005)), j'ai mis en évidence que l'excision de EIIIA intervenait après l'expression de BMP-2 (Publi. II, Fig. 3). De façon à établir la causalité entre la signalisation BMP et l'épissage de EIIIA, j'ai cultivé des fibroblastes fraîchement isolés en présence ou non de BMP-2. Par RT-PCR, j'ai pu montrer que la présence de BMP-2 dans le milieu de culture induit l'épissage d'EIIIA (Publi. II, Fig. 3). La présence de BMP-2 dans le domaine du primordium permet donc cet épissage et la migration s'arrête.

La présence précoce de BMP-7 dans le territoire de la condensation dermique, permet le recrutement des fibroblastes. L'expression plus tardive de BMP-2, par la placode et la condensation dermique, induit l'épissage alternatif de l'exon EIIIA de la Fibronectine et l'arrêt de la migration cellulaire. La condensation dermique constituée, une question demeure : comment cette structure est-elle stabilisée ?

**2. Stabilisation des structures formées**

J'avais montré lors de mes premiers travaux (Publi. I) que lors de l'excision et de la mise en culture d'une peau de stade HH30, les primordia formés disparaissaient au cours des premières heures de culture et que leur formation était réinduite. Lorsqu'une peau embryonnaire de stade HH31 est mise en culture, la réorganisation ne s'opère pas et les primordia restent stables. La question soulevée par cette observation est l'identification des facteurs de stabilisation des primordia.



### i) Rôle des Intégrines

Les Intégrines, par le biais de la Fibronectine, participent activement à la migration des fibroblastes jusqu'à la condensation dermique. J'ai voulu savoir si en bloquant les Intégrines en haute affinité, à l'aide du Manganèse, cation divalent se fixant sur le site MIDAS des Intégrines (Werfel et al., 1996), je parviendrais à modifier la stabilité des primordia nouvellement formés lors de la mise en culture organotypique.

J'ai tout d'abord validé l'utilisation du Manganèse lors d'un test de migration au travers d'une membrane. En ajoutant ce cation, les cellules ne migrent plus, ce qui reflète un arrêt de la dynamique des Intégrines en haute affinité (Publi. I, Fig. 5).

Lorsque je rajoute ce cation dans mon milieu de culture organotypique, au bout de 8 heures de culture, alors qu'avec du milieu témoin les primordia auraient disparu, ces derniers sont toujours en place. Le même résultat est obtenu en utilisant de l'Ionomycine dans le milieu de culture, les primordia restent en place ; phénomène confirmé lors de temps de culture plus long. Les explants ayant été traités à l'Ionomycine développent des bourgeons en cours de croissance alors que ceux cultivés dans les conditions témoins ne parviennent qu'au stade de primordia, et sont donc retardés (Publi. I, Fig. 9). Cette stabilisation est fortement réduite en inhibant la Calcineurine à l'aide de Cyclosporine A (Publi. I, Fig. 9).

Ces résultats montrent que l'engagement des Intégrines pour leurs ligands est important non seulement lors de la mise en place, mais aussi lors de la stabilisation des primordia de phanère. Est-ce la seule voie de signalisation impliquée dans la stabilisation ?

### ii) Rôle de la signalisation Notch

La signalisation Notch intervient lors la ségrégation de populations cellulaires, et donc sans doute dans la séparation des domaines folliculaire et interfolliculaire. De nombreuses

protéines impliquées dans cette voie de signalisation sont exprimées lors de la morphogénèse cutanée (Favier et al., 2000; Thelu et al., 1998; Vauclair et al., 2005; Viallet et al., 1998). La première question soulevée est leur chronologie d'expression dans la peau embryonnaire de poulet.

#### **a- Chronologie d'expression des protéines du système Notch**

De façon à savoir si la signalisation Notch est impliquée lors de la mise en place, lors de la stabilisation ou lors de ces deux étapes de la morphogénèse cutanée, j'ai comparé les champs fémoraux droit et gauche afin d'étudier les expressions de BMP-2 par rapport à Notch-1, Notch-2, Serrate-2 et Delta-1. J'ai ainsi pu montrer que les éléments de la signalisation Notch n'étaient exprimés qu'après l'expression de BMP-2, donc après la mise en place des primordia de phanère (Publi. III, Fig. 1 et 2).

Cette voie de signalisation semble impliquée lors des phases suivant la mise en place. Mais, quel rôle joue-t-elle ?

#### **b- Implication de Notch sur l'établissement du micropattern**

Afin de vérifier si la signalisation Notch influe sur la mise en place de la condensation, j'ai utilisé un inhibiteur de la  $\gamma$ -secretase (protéine clivant la partie intracellulaire de Notch, NICD, élément à l'origine de la transduction du signal) lors de la formation de micromasses (Publi. III, Figure 4). Les micromasses ne se forment pas correctement. La phase d'agrégation et de compaction est retardée.

J'ai alors utilisé le même inhibiteur lors de cultures organotypiques. Après 18 heures de culture, des fusions entre des primordia voisins sont observées. Une forte altération du motif de distribution des primordia sur la peau embryonnaire dorsal se produit lorsque la

signalisation Notch est inhibée (Publi. I, Fig. 10). Ce rôle de ségrégation des populations cellulaires des domaines folliculaire et interfolliculaire ne pouvant plus avoir lieu, les domaines folliculaires ont tendance à fusionner entre eux.

Est-ce le seul rôle de la signalisation Notch ?

### c- Notch et expression de $p21^{WAF1/CIP1}$

Des travaux antérieurs (Mammucari et al., 2005; Rangarajan et al., 2001) ont montré un lien entre la signalisation Notch et l'expression de  $p21^{WAF1/CIP1}$  lors de la différenciation terminale des kératinocytes. L'absence de prolifération cellulaire au sein de la condensation dermique laissait supposer sa présence.

Afin de trouver un lien entre l'arrêt de la prolifération des fibroblastes d'une condensation dermique et l'expression de  $p21^{WAF1/CIP1}$ , j'ai cherché à détecter le taux d'expression de cette protéine dans les micromasses, tout en analysant par FACS le taux de prolifération des cellules lors de la formation des micromasses. La prolifération cellulaire décroît au cours de la formation des micromasses et dans le même temps, le taux d'expression de la protéine  $p21^{WAF1/CIP1}$  augmente fortement (Publi. III, Fig. 5 et 6).

Il est intéressant de noter que l'inhibition de la signalisation Notch, lors de la formation des micromasses, induit une stabilisation de l'expression de  $p21^{WAF1/CIP1}$  (Publi. III, Fig. 6) s'accompagnant d'une stabilisation de la population cellulaire en phase G1 (Publi. III, Fig. 5). Il y a donc un lien direct entre la stabilisation de la condensation dermique, l'engagement de la signalisation Notch et l'arrêt de la prolifération induite par la protéine  $p21^{WAF1/CIP1}$ .

L'étude de la formation, ainsi que de la stabilisation, de la condensation dermique m'a permis de mettre au point un modèle intégratif (**Fig. 19**) basé sur l'ensemble des étapes

permettant le passage d'une peau homogène à une peau présentant des primordia de phanère. Ce modèle intégratif a servi de base à l'élaboration d'un modèle mathématique basé, entre autres, sur la migration cellulaire sous le contrôle des facteurs BMP-2 et BMP-7.

### 3. Mise en place d'un modèle mathématique

Les précédents modèles mathématiques, simulant la formation et la répartition des primordia de phanère au sein d'une peau homogène, partait d'une situation globale homogène pour arriver à une formation simultanée des primordia sur l'ensemble du domaine considéré. Ces situations initiale et finale ne reflètent pas les différentes étapes observées *in vivo*. C'est la raison qui m'a poussé à établir une collaboration avec un mathématicien, le Dr. Loïc Forest, afin de proposer un nouveau modèle plus en adéquation avec les observations faites chez l'embryon.

#### i) Paramètres pris en compte et modèle proposé

Nous avons donc pris en compte les différents paramètres essentiels à la morphogénèse cutanée : prolifération, facteurs activateurs et inhibiteurs, situation initiale.

#### **a-** *Prolifération cellulaire*

Le passage d'une peau homogène à une peau composée des territoires folliculaires et interfolliculaires nécessite que le derme dépasse un seuil de densité cellulaire ( $2,6 \text{ cellules}/1000\mu\text{m}^3$ ). Nous avons donc pris ce seuil comme étant l'élément déclenchant la mise en place des primordia (« spots » dans le modèle). Une fois cette densité cellulaire atteinte, la prolifération s'arrête.

Ainsi deux populations de cellules sont considérées, les cellules proliférantes et les cellules ne proliférant plus.

#### **b-** *Facteurs activateurs et inhibiteurs*

Comme les modèles dérivant de la réaction-diffusion (Jiang et al., 2004), nous avons pris en compte un activateur et un inhibiteur. La différence est que ce couple de molécules agit sur la migration cellulaire et non sur l'identité cellulaire (phanère ou non) à un endroit donné dans le domaine considéré. Ainsi, BMP-7 est choisi comme activateur de la migration, par son action de chémo-attracteur, et BMP-2 est choisi comme inhibiteur par son action antagoniste sur la migration des fibroblastes.

#### **c-** *Situation initiale*

Le domaine considéré représente la peau embryonnaire dorsale de poulet de stade HH29. Les primordia apparaissant préférentiellement à partir de la ligne médio-dorsale, cette région sera la première portant les primordia de phanère.

#### **d-** *Modèle mathématique*

Les quatre équations principales décrivant le modèle sont les suivantes :

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

$$\frac{\partial n_2}{\partial t} = D_n \Delta n_2 - \nabla \cdot (\chi n_2 \nabla u) + f(n_1, t) \quad (2)$$

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

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

(1) permet de décrire la prolifération jusqu'à un seuil  $n^*$  des cellules sur le domaine et ainsi la transition de la population proliférante à la population migrante.

(2) explique la répartition des cellules soumise à l'effet chémo-attractant de l'activateur  $u$ .

(3) et (4) déterminent les concentrations d'activateur  $u$  et d'inhibiteur  $v$  en chaque point du domaine, considérant leurs « consommations » (internalisation du complexe ligand-récepteur), ainsi que leurs diffusions. Les termes de production établissent que l'expression de BMP-7 est renforcée par le microenvironnement des primordia, que l'effet positif de chémo-attraction de BMP-7 est inhibé par BMP-2, et que BMP-2 est exprimé par les mêmes cellules que BMP-7 (celles du spot).

## ii) Mise en place du micropattern hexagonal

La résolution mathématique de ce modèle permet de mimer l'apparition du « micropattern » hexagonal de la même façon que son apparition dans la ptéryle lombaire (Publi. II, Fig. 4, Movies S1 et S2). Les premiers spots s'individualisent le long de la ligne médiodorsale, puis les rangs suivants apparaissent en quinconce les uns par rapport aux autres, toujours deux à la fois et situés de part et d'autre des précédents.

Ce modèle est donc très proche de la chronologie d'apparition des primordia dans la peau embryonnaire dorsale, mais parvient-il à expliquer la formation des aptéries et des semi-aptéries, mes résultats biologiques expérimentaux ainsi que ceux, apparemment

contradictaires, obtenus par les autres groupes (Jung et al., 1998; Noramly and Morgan, 1998; Patel et al., 1999) ?

### iii) Modèle prédictif

#### **a-** *Formation des aptéries et semi-aptéries*

L'un des paramètres cruciaux lors de la formation des primordia de phanère est la densité cellulaire du derme dense. Moins cette concentration est élevée, moins les primordia se forment. C'est le cas des semi-aptéries et des aptéries (Olivera-Martinez et al., 2001).

Nous avons voulu confronter notre modèle mathématique à des concentrations décroissantes de cellules. Lorsque nous partons d'une concentration relative  $q=1$ , les primordia sont régulièrement répartis (Publi. II, Fig. S3). Par contre, lorsque cette concentration atteint le seuil de  $q=0,12$  peu de primordia se forment, répartis de façon aléatoire (semi-aptérie), puis lorsque la concentration est de  $q=0,11$  plus aucun primordium ne se met en place (aptérie). Notre modèle fait donc le lien direct entre la densité cellulaire et la capacité de formation des primordia sur le domaine considéré.

#### **b-** *Inhibition due à un excès d'activateur*

De nombreuses études d'autres laboratoires ont montré que la suractivation de la voie de signalisation BMP menait à l'inhibition de la formation des primordia de phanère (Jung et al., 1998; Noramly and Morgan, 1998), y compris le dépôt sur un explant de peau dorsale d'une bille chargée de BMP-7 (Patel et al., 1999). Alors que ce facteur est notre activateur, comment peut-il générer un effet inhibiteur ?

Lorsqu'on simule numériquement un spot contenant beaucoup d'activateur  $u$ , il y a un fort recrutement des cellules à proximité, empêchant ainsi la formation de spots (Publi. II, Fig. 5, Movies S3 et S4). J'observe le même phénomène en utilisant une bille chargée avec 333ng/ml de BMP-7. Il y a une forte densification des cellules sous la bille, indiquant une forte chémo-attraction. La région avoisinante a alors une faible densité cellulaire et ne peut ainsi former de condensation dermique (Publi. II, Fig. 5). Dans ce cas là, une trop forte activation induit une inhibition.

Que se passe-t-il dans le cas d'un excès de l'inhibiteur  $v$ , BMP-2 ?

### c- *Mode d'action de l'inhibiteur*

Une infection virale RCAS induisant la surexpression de BMP-2 dans la peau embryonnaire de poulet provoque l'apparition de larges régions glabres (Noramly and Morgan, 1998). Comment cet effet d'inhibition fonctionne-t-il ?

La simulation numérique d'un excès homogène d'inhibiteur induit un blocage de la formation des spots par une inhibition globale de la migration cellulaire (Publi. II, Fig. 5, Movies S5 et S6). De la même façon, si je place un explant de peau embryonnaire dorsale en culture dans un milieu contenant 0,5 $\mu$ g/ml de BMP-2 j'obtiens une inhibition de la formation des primordia (Publi. II, Fig. 5). En bloquant la migration cellulaire, le derme dense ne peut s'organiser et les primordia ne se mettent pas en place.

### iv) Amélioration du modèle mathématique

Une modification du modèle est en cours de finition afin d'inclure les résultats sur la signalisation Notch et p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. La prolifération cellulaire au sein des primordia de phanère ne s'arrêterait que lorsqu'une forte densité cellulaire serait atteinte, mimant



l'engagement de la signalisation Notch par contact intercellulaire, les autres cellules garderaient une faible prolifération, permettant ainsi l'extension de la ptéryle spinale lors de la croissance de l'embryon.

*Publication I*

## IV. Publications

### 1. Publication n°1

#### **Dermal condensation formation in the chick embryo: requirement for Integrin engagement and subsequent stabilization by a possible Notch / Integrin interaction.**

Frederic Michon, Marie Charveron and Danielle Dhouailly

Developmental Dynamics (2007) 236: 755-768

#### **Abstract**

During embryonic development, feathers appear first as primordia consisting of an epidermal placode associated with a dermal condensation. When 7-day chick embryo dorsal skin fragments showing three rows of feather primordia are cultured, they undergo a complete reorganization, which involves the down-regulation of morphogenetic genes and dispersal of dermal fibroblasts, leading to the disappearance of primordia. This loss of organisation is followed by *de novo* differentiation events. We have used this model to study potential factors involved in the formation of dermal condensations. Activation of Integrins by extracellular Manganese or intracellular Calcium prevents the initial disappearance of the dermal condensations. New primordia formation occurs even after inhibition of the Notch pathway albeit with some fusion between primordia. In conclusion, dermal fibroblast migration requires  $\beta$ 1-Integrin whereas the stability of dermal condensations could depend on Notch / Integrin interaction.

# Dermal Condensation Formation in the Chick Embryo: Requirement for Integrin Engagement and Subsequent Stabilization by a Possible Notch/Integrin Interaction

Frederic Michon,<sup>1</sup> Marie Charveron,<sup>2</sup> and Danielle Dhouailly<sup>1\*</sup>

During embryonic development, feathers appear first as primordia consisting of an epidermal placode associated with a dermal condensation. When 7-day chick embryo dorsal skin fragments showing three rows of feather primordia are cultured, they undergo a complete reorganization, which involves the down-regulation of morphogenetic genes and dispersal of dermal fibroblasts, leading to the disappearance of primordia. This loss of organisation is followed by de novo differentiation events. We have used this model to study potential factors involved in the formation of dermal condensations. Activation of Integrins by extracellular Manganese or intracellular Calcium prevents the initial disappearance of the dermal condensations. New primordia formation occurs even after inhibition of the Notch pathway albeit with some fusion between primordia. In conclusion, dermal fibroblast migration requires  $\beta 1$ -Integrin whereas the stability of dermal condensations could depend on Notch/Integrin interaction. *Developmental Dynamics* 236:755–768, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

**Keywords:** dermis; calcium; cutaneous appendage; fibronectin; manganese; migration; Rho; skin

Accepted 7 January 2007

## INTRODUCTION

Prior to the formation of cutaneous appendages, the embryonic skin is composed of two homogeneous layers, the epidermis and the dermis. In the chick dorsal region, the dermis originates from different regions of the dermomyotome at between 3 and 5 days of incubation (stages HH 20 to 26) (Hamburger and Hamilton, 1992), in response to dorsal Wnt signals from the neural tube and the ectoderm (see

among others: Olivera-Martinez et al., 2002; Ben-Yair et al., 2003). A densification of the dermal fibroblasts occurs by day 6 (stage HH 29) throughout the area of the future dorsal feather field (spinal pterygia) and by day 7 (stage HH 30) in the other body pterygia (Sengel, 1976). A lesser degree of densification occurs later in the inter-ptygia regions, but never in the midventral apertium that results from ventral closure of the body and

can be equated to a scar (Dhouailly et al., 2004). Dense dermis formation and maturation are concomitant with expression of the twist-like bHLH transcription factor cDermo-1 in the subectodermal mesenchyme, until the dermal condensation formation (Scaal et al., 2001). The overexpression of cDermo-1 leads to the formation of an ectopic feather tract (Hornik et al., 2005). When the dermis is mature, an initial, ubiquitous and permissive der-

The Supplementary Material referred to in this article can be viewed at [www.interscience.wiley.com/jpages/1058-8388/suppmat](http://www.interscience.wiley.com/jpages/1058-8388/suppmat).

<sup>1</sup>Centre de Recherche INSERM–Institut Albert Bonniot U823, Ontogenesis and Stem Cell of the Tegument Team, Grenoble, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Biologie Cellulaire Cutanée, Institut de Recherche Pierre Fabre, Hôtel Dieu Saint Jacques, Toulouse, France

Grant sponsor: Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); Grant sponsor: Laboratoire de Biologie Cellulaire Cutanée, Institut de Recherche Pierre Fabre.

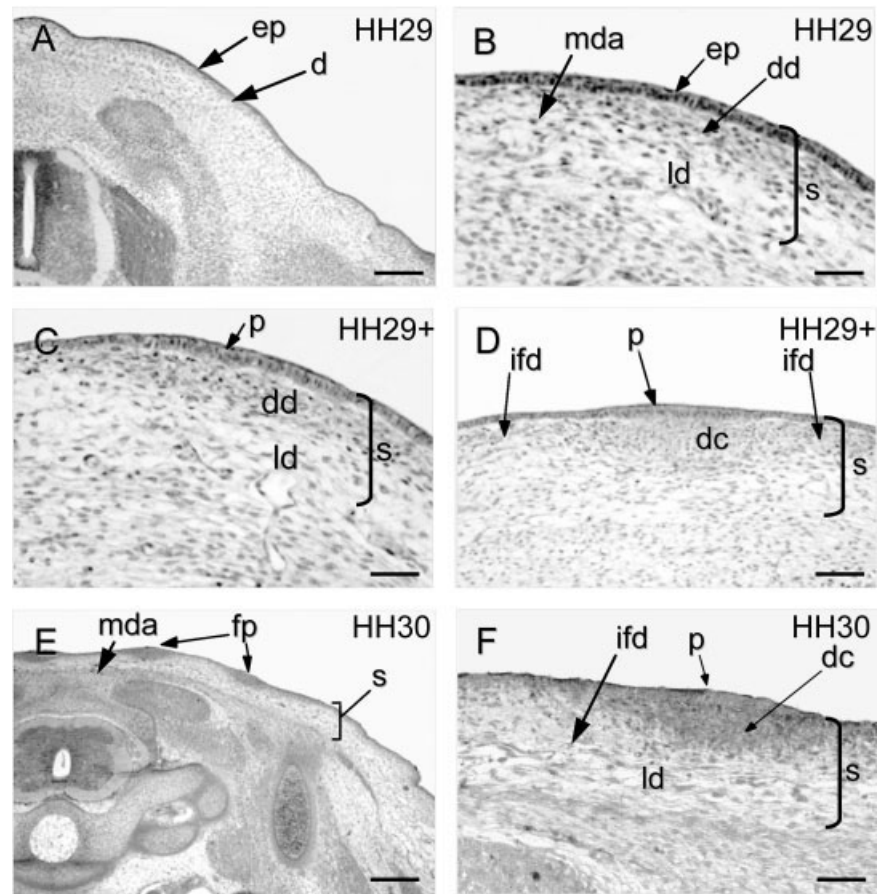
\*Correspondence to: Danielle Dhouailly, Centre de Recherche INSERM–Institut Albert Bonniot U823, Ontogenesis and Stem Cell of the Tegument Team, Domaine de la Merci, Site sante, BP 170, 38042 Grenoble, France.

E-mail: [Danielle.Dhouailly@ujf-grenoble.fr](mailto:Danielle.Dhouailly@ujf-grenoble.fr)

DOI 10.1002/dvdy.21080

Published online 6 February 2007 in Wiley InterScience ([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)).

mal signal ("make an appendage"; Dhouailly, 1977), leads to the formation of thickenings of the epidermis, called placodes. The placodes result, in chick embryo, from an elongation of the apico-basal axis of the epidermal cells and a modification of E-cadherin expression (Jamora et al., 2003). The ubiquitous signal from the homogeneous dense dermis has been shown to belong to the Wnt family. The most striking demonstration of this is with the forced expression of  $\beta$ -catenin in mouse or chick epidermis, which leads to the formation of new hair or feather follicles, respectively (Gat et al., 1998; Widelitz et al., 2000). Likewise, the association of an embryonic mouse dense dermis with an adult rabbit corneal epithelium provokes increased  $\beta$ -catenin protein levels in the basal cells, followed by formation of hair placodes (Pearton et al., 2005). Next, molecular dialogue between the placode and the homogeneous dense dermis leads to the formation of dermal condensations. Each placode with its underlying dermal condensation makes up a primordium, the first stage of cutaneous appendage morphogenesis. In the *Scaleless* chick mutant, which does not form placodes and has no scales and only a few scarce feathers, the dense dermis forms as usual in each pterygia (Viallet et al., 1998; Widelitz et al., 2000; Harris et al., 2004), but the epidermis is defective in signalling (Sengel and Abbott, 1963; Dhouailly and Sawyer, 1984; Viallet et al., 1998). The missing signal from the epidermis can be replaced by FGF-2 (Song et al., 1996; Viallet et al., 1998). In addition, numerous other signalling molecules are expressed in feather primordia, among them: different Wnts (Chang et al., 2004); cAMP, PKC (Noveen et al., 1995); TGF $\beta$ 2 (Ting-Berreth and Chuong, 1996a); Shh (Ting-Berreth and Chuong, 1996b); FGF-10 (Mandler and Neubuser, 2004); Ectodysplasin (Houghton et al., 2005); and BMPs (Jung et al., 1998). They have been proposed to be classed as activators (FGF-4, Shh, cAMP, TGF $\beta$ 2) or inhibitors (BMPs, PKC activators) of feather formation (Jung et al., 1998). The interplay between these diffusible factors (Jiang et al., 2004) appears to create a Turing system (Turing, 1990) that allows the



**Fig. 1.** From dense dermis to dermal condensations in chick dorsal skin from stage HH29 to stage HH30. **A:** A transversal section at wing level of a HH29 chick embryo shows the formation of the dermis (d) underlying the epidermis (ep). **B:** At this stage, the dermis comprises an upper dense dermis (dd) and a lower loose dermis (ld). **C:** Between stage HH29 and HH30, the placode (p) forms in the epidermis followed by **(D)** the initiation of a redistribution of cells from the dense dermis to the dermal condensations (dc). **E:** A transversal section of a HH30 chick embryo at wing level shows the feather primordia (fp). **F:** A feather primordium is composed by a placode overlaying a dermal condensation (dc). The latter is surrounded by interfollicular dermis (ifd), which has a lower cell density, as in the mediadorsal semi apteria (mda). A–E: Hematoxylin/Scarlet Biebrich staining. s, skin. Scale bars = (A) 300  $\mu$ m; (B,C) 100  $\mu$ m; (D,F) 130  $\mu$ m; (E) 400  $\mu$ m.

emergence of a regular pattern of skin heterogeneity formed by inter-follicular skin and follicles. In dorsal chick embryonic skin, feather primordia are arranged in a hexagonal pattern (Sengel, 1976), resulting from the formation of successive, alternate rows from the medial line to lateral parts of the embryo.

Until now it has been thought that this pattern, once formed, is stable, even after dissection and organotypic culture of skin. Indeed, the formation of feather buds in cultured dorsal skin has been considered to be a continuous phenomenon, except in the case where the first midline row was missing (Novel, 1973). In contrast, our preliminary studies (reported in Olivera-Martinez et al., 2004) showed that when

chick embryonic dorsal skin of stage HH 30 (three first rows of primordia) is cultured, the feather primordia are lost within a few hours and are reformed later. In this report, we take advantage of this fact to study the role of different factors in dermal condensation formation and/or stabilization, whose activity can be easily modified by pharmaceutical manipulation of the culture.

For a long time (Wessells, 1965), it has been known that no cell proliferation is involved in chick dermal condensation formation in vivo. The redistribution of dorsal dermal fibroblasts is apparent when the dermal cell density of a chick embryo is compared between stages HH29 and HH30 (Fig. 1). At stage HH29 (Fig.

1A,B), the dermis is composed by an upper dense dermis and a lower loose dermis. The placode then forms in the epidermis while there is no cell density modification in the dermis (Fig. 1C). At stage HH30 (Fig. 1D–F), the former dense dermis (2.60 nuclei/1,000  $\mu\text{m}^3$ ) appears to be redistributed between dermal condensations (3.5 nuclei/1,000  $\mu\text{m}^3$ ) and inter-follicular dermis (1.2 nuclei/1,000  $\mu\text{m}^3$ ) (Olivera-Martinez et al., 2001). This hypothesis of dermal cell redistribution is supported by *in ovo* BrdU injections (Rouzankina et al., 2004), *in vitro* studies (Desbiens et al., 1991) and experiments involving  $^3\text{H}$ Thymidine incorporation in culture (Jiang and Chuong, 1992). Moreover, the late expression of Shh in the placode and of Patched, its receptor, in the dermal condensation, a pathway involved in cell proliferation, only correlates with the outgrowth of the feather bud (Jung et al., 1998; Morgan et al., 1998; McKinnell et al., 2004b).

Immunological studies or *in situ* hybridization show that Fibronectin (Mauger et al., 1982),  $\beta 1$  Integrin (Jiang and Chuong, 1992), and Notch-1 (Chen et al., 1997) are expressed in chick skin dermal condensations and thus might be implicated in their formation and/or stabilization. Integrins play a role in a number of cell functions, not only cell adherence, via outside-in signalling. Integrins can, for example, modulate the intracellular Calcium concentration or the activation of protein kinases (Clark and Brugge, 1995), which, in turn, control the expression of genes implicated in proliferation and differentiation. Likewise, cell-matrix interactions can be modulated by a regulation of Integrin affinity through an inside-out signal (Bennett and Vilaire, 1979). The switch from a low- to a high-affinity state occurs via a conformational change in the extra-cellular domain induced by the cytoplasmic domain (Takagi et al., 2002). It has previously been shown that phosphorylation of the cytoplasmic domain of Integrins by CaMKII induces a switch from the high- to a low-affinity state, while de-phosphorylation of this domain by Calcineurin has an antagonistic effect. Thus, CaMKII can be considered as a repressor whereas Calcineurin can be considered as an

activator of the high-affinity state of the Integrins (Hartfield et al., 1993; Leitinger et al., 2000). Consequently, the balance between CaMKII and Calcineurin (two Calcium-dependent proteins) activity might play a role in cell migration. In addition, the activation of Integrin via passive influx of Calcium in cells by Ionomycin (Liu and Hermann, 1978; Kuznetsov et al., 1992) is known to enhance their interaction with Fibronectin (Hartfield et al., 1993; Hyduk et al., 2006). Pharmacologically, the addition of Manganese can switch Integrins from a low- to a high-affinity state (Werfel et al., 1996; Olsen and Ffrench-Constant, 2005).

Notch signalling has been suggested to play a role either in the binary choice between the two fates of skin, i.e., appendage vs. inter-appendage epidermis, or in the stabilization of primordia (Weinmaster et al., 1991; Viallet et al., 1998; Favier et al., 2000). After fixation of its ligand, the Notch receptor is cleaved by  $\gamma$ -secretase (Pan et al., 2004) and releases the Notch intracellular domain (NICD), which functions as a co-transcription factor leading to the expression of specific target genes. In angiogenesis Notch can interact with Integrin (Leong et al., 2002), leading to a switch to the high affinity state. Moreover, the interaction of NICD with  $\beta 1$  Integrin can modify the localization of the NICD as a function of the extracellular matrix composition (Leitinger and Hogg, 2002). A recent study (Campos et al., 2006) has presented more details on the interaction of Notch/ $\beta 1$  Integrin using a neural stem cell model. This interaction apparently occurs only in lipid rafts, which could be involved in a positive regulation of Integrins.

Another class of proteins that has been shown to control a large variety of biological responses that involve cell movement, such as chemotaxis and cytokinesis, is the Rho family GTPases (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Rho has an impact in specific rearrangements of actin cytoskeleton, an essential process for cell migration (Raftopoulou and Hall, 2004). This family of proteins can transduce signal from surface receptors to cytoskeleton, the modification of which is dependent upon the member activated

(Nobes and Hall, 1995; Hall, 1998). Moreover, the Rho-GTPase, RhoB, is expressed in the embryonic chick skin placode and is implicated in the morphological changes that are required for its formation (McKinnell et al., 2004a). Conversely, the inhibition of the Rho family GTPases dependent kinase, ROCK (Maekawa et al., 1999), leads to an absence of placodes.

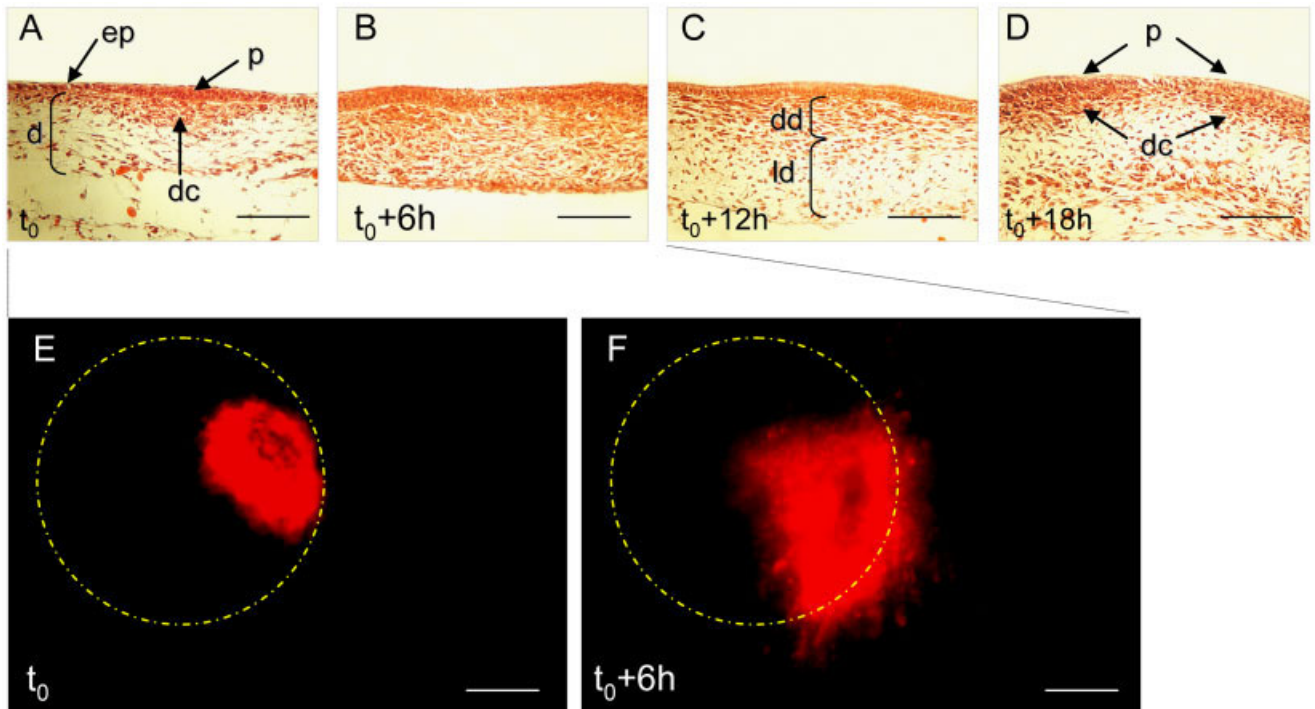
The aim of this work was to analyse the functions of Rho family GTPases, Integrins, and Notch signalling in dermal condensation formation and/or stabilization using our *in vitro* organotypic culture system. Although our results were obtained *in vitro*, we suggest that these factors might also function in the switch that occurs during chick embryonic development that leads to the formation of dermal condensations from a homogeneous dense dermis.

## RESULTS

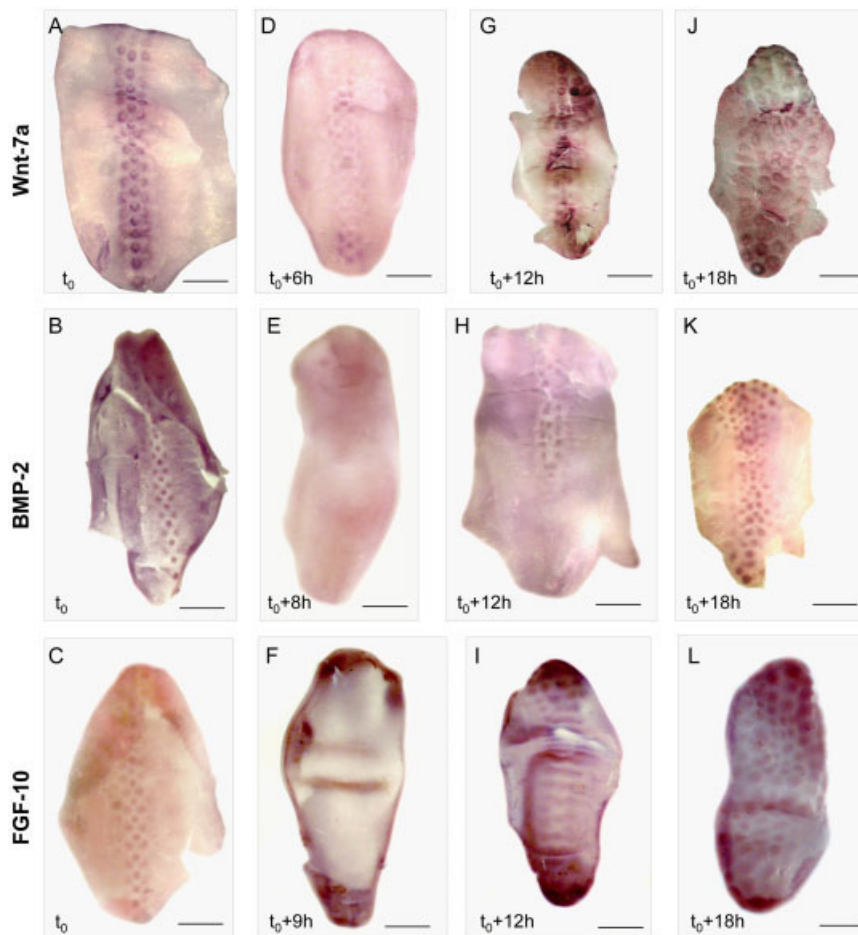
### Impact of Organotypic Skin Culture on Pre-Existing Feather Primordia

Chick skin pieces, corresponding to the entire dorsal spinal pterygiae, were dissected from stage HH-30 embryos and cultured at the air/liquid interface. Chick dorsal skin had three complete rows of feather primordia when initially placed in culture. In order to follow what happens during the initial time period, we cultured the explants and fixed them every 3 hr, to a total of 24 hr, to perform histology and *in situ* hybridization. At time zero (Fig. 2A), well-defined primordia consisting of a placode and a dermal condensation are present. The inter-follicular region consists of a loose dermis underlying a flat epidermis. After 6 hr, the primordia are less defined (Fig. 2B). The dermal fibroblasts cannot have proliferated, and the apparent increase in density results from a global contraction of skin components, including the extracellular matrix, during the first hours of culture. After 12 hr, the skin is homogeneous as the primordia have disappeared (Fig. 2C). After 18 hr in culture, dermal condensations reappear (Fig. 2D). This lability of embryonic skin organization leads to a temporary loss of the periodic pattern. The disappearance and





**Fig. 2.** Dermal reorganization resulting from organotypic culture of chick dorsal skin from HH30 embryos. **A:** Well-defined feather primordia are present at  $t_0$ , they comprise a placode (p), and a dermal condensation (dc). **B:** After 6 hr, dermal disorganization starts, and the skin appears denser due to its contraction. **C:** After 12 hr, the disorganization has resulted in a homogeneous dense dermis (dd), overlying a lower loose dermis (ld). **D:** At  $t_0 + 18$  hr, new primordia are formed. **E:** At  $t_0$ , dermal condensation cells were labelled with Dil microinjection. The condensation territory is delimited by a yellow dotted line. **F:** Migration of labelled cells outside the former condensation, although the explant is contracted. **A–D:** Hematoxylin/Scarlet Biebrich staining. **E,F:** Fluorescent microscopy after Dil microinjection. d, dermis; ep, epidermis. Scale bars = (A–D) 150  $\mu\text{m}$ ; (E,F) 50  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 3.** Arrest and reinitiation of transcription in feather primordia concomitant with their reorganization in organotypic culture. **A–C:** At  $t_0$ , chick embryo dorsal skin exhibits three feather rows, which express Wnt-7a, BMP-2, and FGF-10. **D–F:** Dense dermis reorganization leads to a down regulation of Wnt-7a, BMP-2, and FGF-10 transcription after 6, 8, or 9 hr of organotypic culture, respectively. **G–I:** Transcription has been autonomously re-induced after 12 hr of culture. **J–L:** The pattern is reconstituted after 18 hr, although with a few irregularities. In situ hybridization with Wnt-7a (labelling of the placode), BMP-2 (labelling both of the placode and the dermal condensation), and FGF-10 (labelling of the dermal condensation) RNA probes. Scale bars = 800  $\mu\text{m}$ .

reappearance of feather primordia can be followed via time-lapse video (see Supplementary Video, which can be viewed at [www.interscience.wiley.com/jpages/1058-8388/suppmat](http://www.interscience.wiley.com/jpages/1058-8388/suppmat)), which shows a dispersal of the fibroblasts of the dermal condensation. To confirm the scattering of fibroblasts to the inter-follicular region, Dil was microinjected into dermal condensations (Fig. 2E). The skin pieces were then placed on culture grids in order to follow the behaviour of labelled cells via time-lapse videography: some of the cells that dispersed from feather primordia (Fig. 2F) during the dermal disorganization phase are found in the inter-bud region after reformation of the condensation.

To analyze the impact of the culture method on the expression of factors that are known to participate to feather primordia formation, we performed *in situ* hybridization to detect the presence of BMP-2 (which is found in both dermal condensation and placode), FGF-10 (in dermal condensation), and Wnt-7a (in placode) messages. At time zero, the three rows of feather primordia express these three markers (Fig. 3A–C). Their expression is lost concurrently with the disorganization of the primordia, Wnt-7a expression is lowered, but not completely lost, after only 6 hr of culture, whilst expressions of BMP-2 and FGF-10 disappear after 8 and 9 hr, respectively (Fig. 3D–F). The disorganization of the primordia, which leads to the loss of the periodic skin pattern, is thus correlated with a down regulation of Wnt-7a expression (number of cases ( $n = 6/7$ ) and the loss of BMP-2 ( $n = 68/73$ ) and FGF-10 ( $n = 6/8$ ) expressions in the placodes, dermal condensations, or both.

After the disorganization phase, which is complete by 10 hr of culture, Wnt-7a, BMP-2, and FGF-10 begin to be re-expressed in a pattern resembling that of time 0. The skin starts to reform defined feather primordia (Fig. 3G–I) ( $n = 5/5$ , 37/43, 7/8, respectively). The patterning of the skin explant is not yet completed by 18 hr of culture and can show some irregularities (Fig. 3J–L) ( $n = 6/6$ , 28/31, 4/5), but is complete after 24 hr (data not shown). Via time-lapse video (see Supplementary Video), it is clear that the new pattern is established *de novo*, as it does not coincide with the original.

As migration is strongly suspected to play a major role in condensation formation and in the dermis reorganization, we then studied the migratory properties of dermal fibroblasts in different culture conditions, as dissociated cells in adherent or hanging drop cultures and in organotypic cultures. As cell migration can be altered via the action of Rho family GTPases on the actin cytoskeleton, or Integrins interacting with Fibronectin, we investigated the effect of different factors known to interact with these systems.

### Dermal Fibroblast Migration Abilities in Adherent Cell Culture

We used a wound-healing assay with freshly dissociated dermal cells to analyze the behaviour of dermal fibroblasts in adherent cell culture. At time zero, 750- $\mu\text{m}$  wounds were made in a confluent primary dermal cell culture (Fig. 4A) in which cell proliferation was inhibited by Thymidine treatment. In the control condition, cells had migrated and covered the wounds, only a narrow space (around 75  $\mu\text{m}$ ) remaining cell-free by 20 hr after wounding (Fig. 4B) ( $n = 5/5$ ).

It was previously shown (McKinnell et al., 2004a) via *in situ* hybridization that RhoA is not expressed in HH-30 embryonic chick skin, and RhoB only in the placode. Using a RT-PCR (Fig. 4C) on separated epidermis and dermis, we confirm that RhoA expression is absent in both the epidermis and the dermis. However, we detect the RhoB expression in both skin components. By comparing the ratio of RhoB/actin in each tissue, we show that this expression is 4 times higher in the epidermis than in the dermis. RhoC is also expressed in both compartments. The quality of our tissue dissociation, and hence purity of the cell samples, is attested by the fact FGF10 expression is found only in the dissected dermis.

Having shown dermal expression of both RhoB and RhoC, we then added Y-27632, a specific inhibitor of the Rho-associated protein kinase (ROCK) (Uehata et al., 1997) in order to perturb cell migration. In the wound-healing assay, ROCK inhibition significantly delays cell migration, a 300- $\mu\text{m}$  gap remains cell free (Fig. 4D) ( $n = 5/5$ ). This delay is

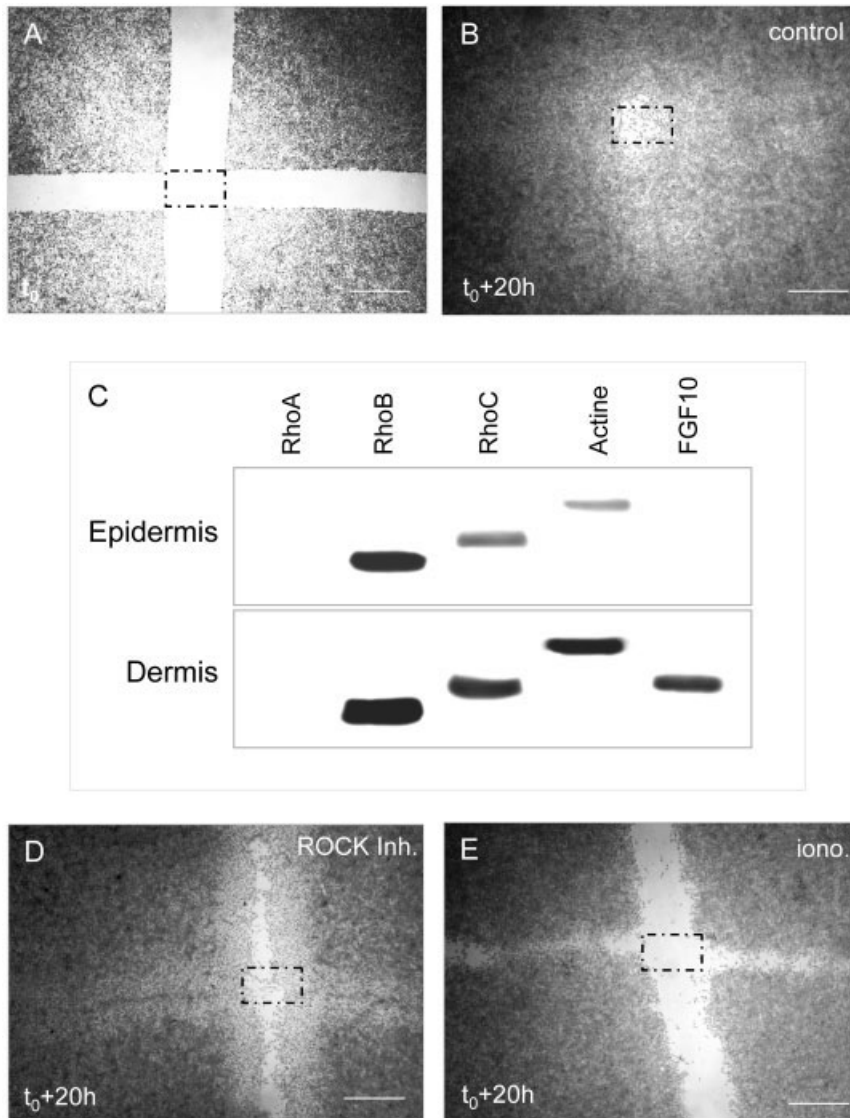
even more drastic with activation of Integrins by activation of Calcium signalling via addition of Ionomycin after wounding, which slows down cell migration even further, the gap being around 700  $\mu\text{m}$  (Fig. 4E) ( $n = 5/5$ ). Another way to activate Integrins is to add Manganese in the culture medium. This non-specific activation also leads to an arrest of dermal cell migration in the wound-healing assay (data not shown) ( $n = 4/5$ ).

In order to distinguish an eventual cell spreading from a true migration in the wound healing assay, we have quantified the effect of these molecules on cell migration through a membrane in various conditions (Fig. 5). This assay was done with or without 10% of FBS, as an attracting factor, to emphasize cell migration. Each measure was compared to the highest migration that occurs under control condition with 10% FBS. Without this attracting factor, cell migration is decreased by 71%. In the presence of FBS, the inhibition of Rho-associated protein kinase decreases the number of migrating cells by 39%. This decrease is even more notable with the addition of  $\text{Mn}^{2+}$  (–56%), with the strongest effect occurring with the activation of Calcium signalling via Ionomycin (–71%).

### Dermal Fibroblast Aggregation in Hanging Drop Culture

In order to mimic the formation of dermal condensations *in vitro* by dispersed fibroblasts, we used the micro-mass formation method (Stott and Chuong, 2000) with 25,000 cells in a 10- $\mu\text{l}$  hanging drop, to follow cell aggregation. Two steps can be distinguished. First, aggregations of cells to form a condensation, where cells outline are clearly distinct. Then, a second step, called the compaction phase, where the aggregate condenses so that the individual cell outlines are no longer distinguishable. After 24 hr, untreated dermal fibroblasts have undergone cell aggregation (Fig. 6A) ( $n = 251/275$ ), whereas ROCK inhibition leads to the formation of a loose cell network (Fig. 6B) ( $n = 239/275$ ), which supports a role for Rho family GTPases in cell aggregation. Modification of Integrin regulation by Ionomy-

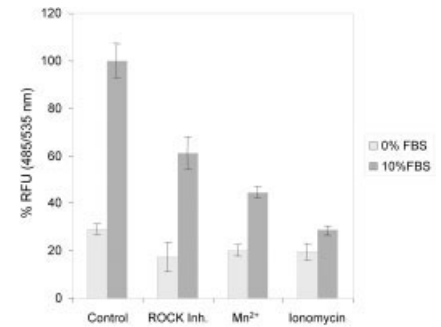




**Fig. 4.** Alteration of dermal fibroblast migration following ROCK inhibition or ionomycin treatment in adherent cell culture. **A:** At  $t_0$ , primary dermal fibroblasts, treated with Thymidine to block the cell proliferation, were plated, grown to confluence, and wounds were made with a plastic tip. **B:** Twenty hours later, in the absence of proliferation, dermal fibroblasts have almost recovered the wound in the control medium. **C:** RT-PCR on freshly dissociated dermis and epidermis shows a lack of RhoA expression in both tissues whereas RhoB and RhoC are expressed in both dermis and epidermis. Using ImageJ software, we estimated the ratio of RhoB/actin in both tissues; the epidermis expresses 4 times more RhoB than the dermis. FGF10 expression is the control of a non contamination during the dissociation. **D:** The inhibition of ROCK leads to a delay in cell migration. **E:** An activation of Integrins by the increase of intracellular Calcium decreases the migration of dermal fibroblasts. In the wound-healing test, Ionomycin ( $1 \mu\text{M}$ ) and ROCK inhibitor ( $10 \mu\text{M}$ ) were added immediately after wounding. Scale bars =  $750 \mu\text{m}$ .

cin activation of Calcium signalling leads to a more rapid aggregation than in the control with compaction occurring after only 24 hr (Fig. 6C) ( $n = 237/275$ ) instead of 48 hr. Surprisingly, non-specific activation of Integrins in the high-affinity state by Manganese leads to a defect in aggregation of dermal cells (data not shown) ( $n = 112/150$ ). To investigate

the role of Fibronectin, one of the possible Integrin ligands in skin, we added a Fibronectin-blocking antibody B3/D6 to the culture medium (Harrison et al., 1993). As expected, this prevented a normal fibroblast aggregation. A low cell density aggregation is formed, many cells remaining outside of this aggregation (Fig. 6D) ( $n = 87/100$ ).

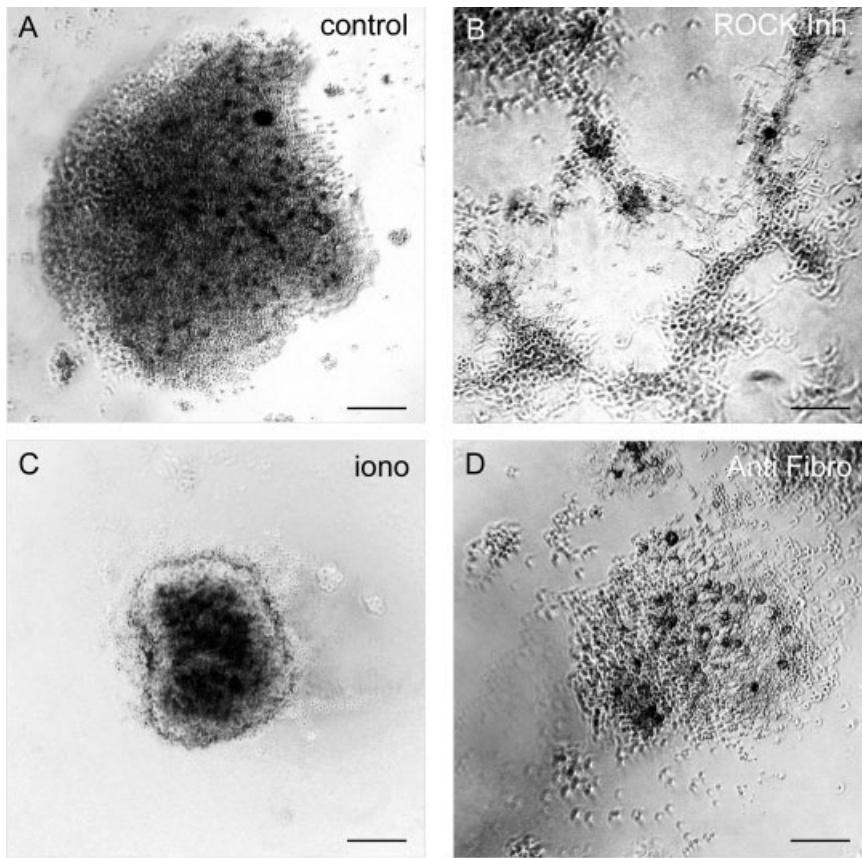


**Fig. 5.** Modification of dermal fibroblast cyto-kinesis by various factors. A freshly dissociated dermal cell suspension was added to a cell culture insert and a chemoattractive (10% FBS) or a control (without FBS) medium placed on the other side of the  $8\text{-}\mu\text{m}$  pore membrane. The migration is evaluated by a fluorescent method. The highest migration is obtained with 10% FBS and other measures were compared to this. Without FBS, there is a cell migration decrease (29%). Perturbation of the dermal cell migration capability is clearly obtained with the use of the attracting factor combined with ROCK Inhibitor (61%), Manganese (44%), or Ionomycin (29%). In this assay, Ionomycin ( $1 \mu\text{M}$ ),  $\text{Mn}^{2+}$  ( $1.5 \mu\text{M}$ ), and ROCK inhibitor ( $10 \mu\text{M}$ ) were incubated with cells 15 min before the test.

Thus, formation of dermal fibroblast aggregation *in vitro* appears to rely on dermal fibroblast aggregation via Integrins on Fibronectin, as well as on ROCK activation. Is this also the case for the formation of dermal condensations *in vivo*? In order to study this, we used short-term organotypic skin culture.

### ROCK Inhibition Delays the Dermal Cell Spreading and Leads to a Disorganized Pattern in Organotypic Culture

As the Rho-associated protein kinase may be implicated in the fibroblast migration in the dermal condensation, we used its inhibitor (Y-27632) in organotypic culture to analyze its effect while the dermis is undergoing reorganization. At time zero, the skin fragment displays three rows of feather primordia (Fig. 7A). After 8 hr of culture with inhibition of ROCK, there is no loss of BMP-2 expression (Fig. 7B) ( $n = 8/10$ ), which occurs in the control condition (Fig. 3E). After 12 hr of culture, there is a loss of BMP-2 expression in the lateral rows while the medial row still expresses BMP-2 (Fig.



**Fig. 6.** Simulation of dermal condensation formation using micromasses. **A:** Dermal fibroblasts (25,000), previously treated with Thymidine to block cell proliferation, were cultured in hanging drops. In control medium, they aggregate and condensate after 24 hr. **B:** Inhibition of ROCK leads to a lacunar network, with formation of a few aggregates. **C:** Activation of Calcium signalling leads to a premature compaction of micromasses. **D:** There is a low cell density aggregate formation when Fibronectin-blocking antibody is added to the culture medium. Ionomycin (1  $\mu$ M), ROCK inhibitor (10  $\mu$ M), and Fibronectin-blocking antibody (1  $\mu$ g/ml) were added at  $t_0$ . Scale bars = 100  $\mu$ m.

7C) ( $n = 6/9$ ). After 24 hr of culture, primordia are present all over the skin piece, but their pattern is irregular (Fig. 7D) ( $n = 8/9$ ). After 48 hr, primordia have heterogeneous sizes, shapes, and location throughout the skin fragment (Fig. 7E) ( $n = 9/9$ ). This pattern perturbation is striking when it is compared to the control (Fig. 7F) ( $n = 5/5$ ).

### Integrin and Fibronectin Involvement in Dermal Condensation Formation in Organotypic Culture

Fibronectin expression is high in dermal condensations and in the upper layer of dense dermis, prior to dermal condensation formation (Fig. 8A,B).  $\beta 1$  Integrin expression was previously shown to be increased in dermal con-

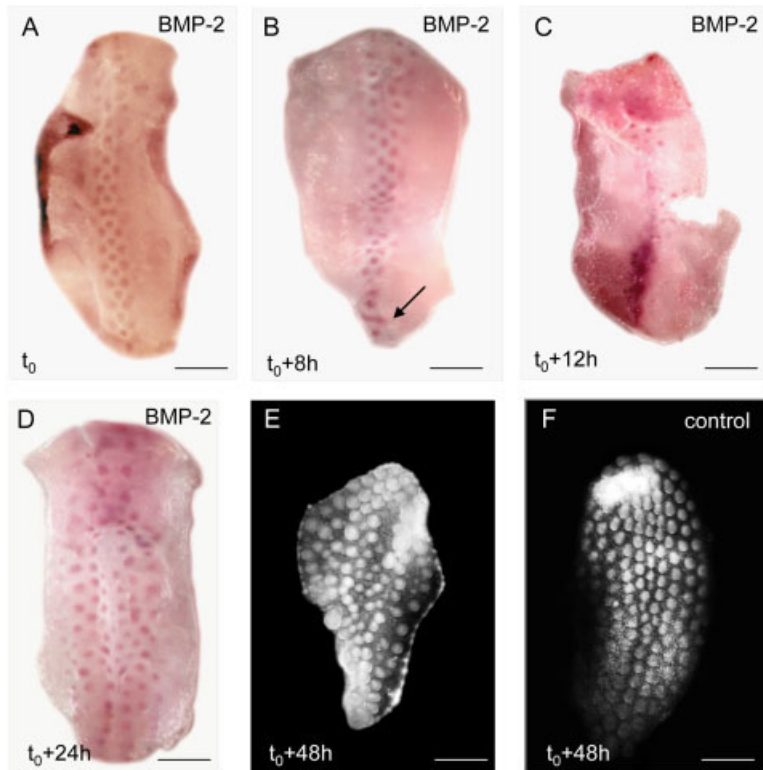
densations (Jiang and Chuong, 1992), potentially implicating this Fibronectin receptor in this formation. To confirm its role, we cultured skin with the Fibronectin-blocking antibody (B3/D6). We added the B3/D6 antibody after the disorganization step (8 hr of culture) to analyze only the action of Fibronectin in dermal condensation formation. After 12 hr of culture, whereas dermal cells start to aggregate in control condition (Fig. 3H), after the addition of the B3/D6 antibody no dermal condensations can be seen (Fig. 8C) ( $n = 5/7$ ). After 18 hr, dermal condensations are present, although they are not well defined in the caudal part of the skin piece (Fig. 8D) ( $n = 3/4$ ). Moreover, dermal condensation formation is delayed compared to the control (Fig. 3K). This is confirmed by the fact that after 48 hr with the

B3/D6 antibody, some condensations are present, but their outlines and pattern are not well-defined (Fig. 8E) ( $n = 7/9$ ), while in the control (TROMA III antibody), feather primordia had formed and even begin to grow up to the bud stage (Fig. 8F) ( $n = 9/9$ ).

To determine the role of Integrins in dermal condensation lability, we activated Integrins to the high-affinity state by the addition of Manganese to the culture medium. At time zero, the skin piece has three rows of feather primordia (Fig. 9A). After 8 hr in control culture conditions, the expression of primordium specific factors is lost (Fig. 3E). In contrast, when Integrins are maintained in the high-affinity state with the use of  $Mn^{2+}$  the dermal condensations are stabilized and do not disappear (Fig. 9B) ( $n = 7/9$ ). Another method used to test the proposed function of Integrins in the stabilization of dermal condensations was to activate Calcium signalling in dermal cells with Ionomycin. We performed 8-hr organotypic cultures with Ionomycin. Moreover, to focus on the role of Calcineurin, a Calcium-dependent phosphatase, we added Cyclosporin A, a Calcineurin inhibitor (Fruman et al., 1992), to certain of the cultures. As with other experiments, at time zero the skin explant had three rows of feather primordia. The activation of Calcium signalling with Ionomycin leads to stabilizations of BMP-2 expression and feather primordia (Fig. 9C) ( $n = 37/43$ ), whereas in the control condition both BMP-2 expression and feather primordia are lost (Fig. 3E). The activation of Calcium signalling via Ionomycin with the concurrent inhibition of Calcineurin (Calcium-dependent phosphatase) (Fig. 9D) ( $n = 19/27$ ) leads to a lowering of BMP-2 expression and none of the stabilization of the feather primordia observed with the Ionomycin treatment only.

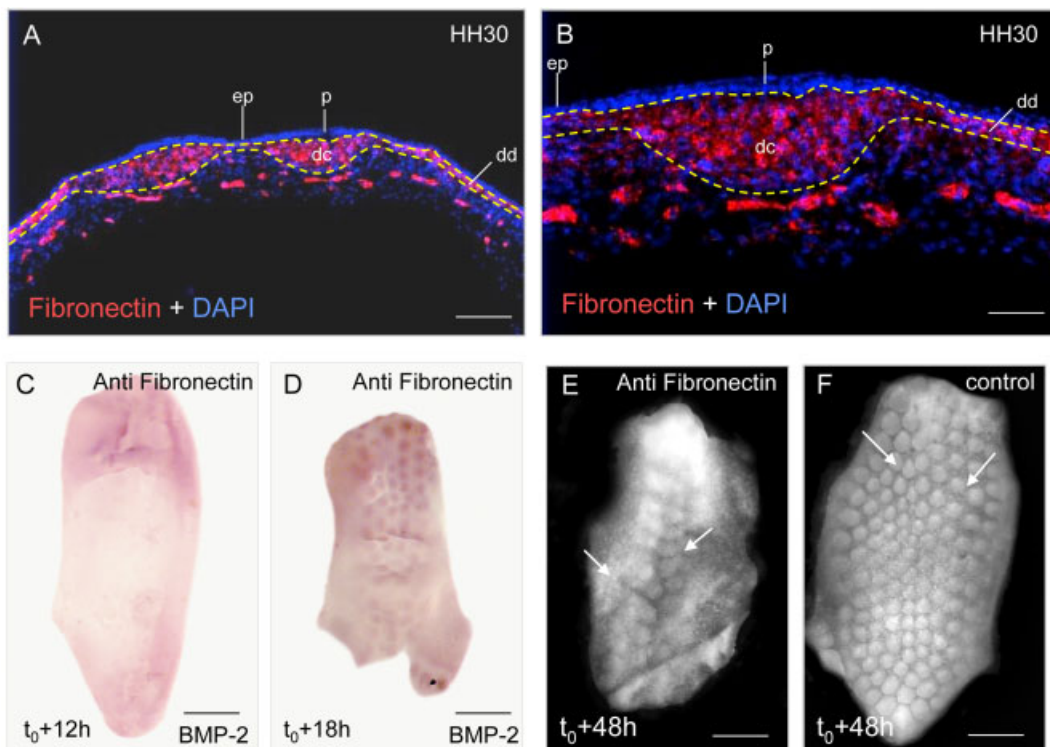
To confirm the effect of Ionomycin on feather primordium development, we cut skin pieces along the medial row, the left half being cultured in control condition and the right half with Ionomycin. After 48 hr of culture, the control skin piece had round, almost flat feather primordia (Fig. 9E) ( $n = 6/7$ ), whereas in the presence of Ionomycin, the feather primordia had



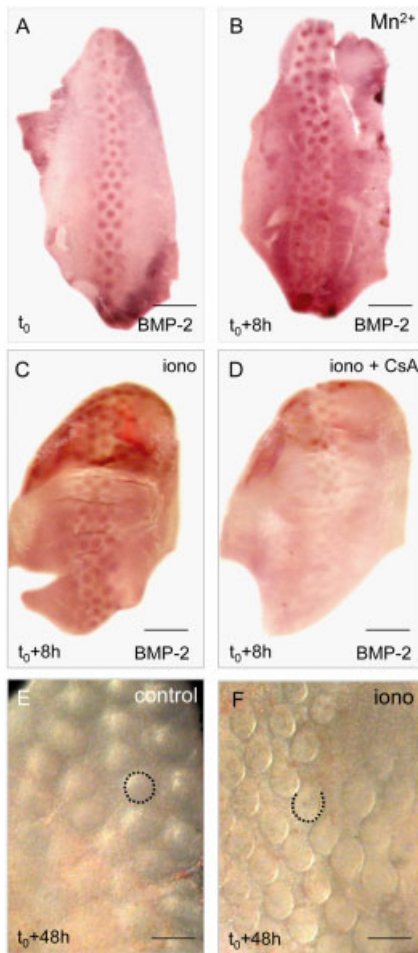


progressed to elevated feather buds oriented in the caudal direction (Fig. 9F) ( $n = 5/7$ ). Thus, in Ionomycin-treated skin fragments, the stabilization of dermal condensation allows the continued outgrowth of feather primordia, while in the control the feather primordia formation resets to the beginning, resulting in a delay of their outgrowth.

**Fig. 7.** ROCK inhibition delays the loss of condensation-specific transcript expression and leads to a disorganized primordia pattern in organotypic culture. **A:** At  $t_0$ , chick embryo dorsal skin exhibited 3 feather primordia rows. **B:** The loss of BMP-2 expression does not occur after 8 hr in control in the ROCK inhibition condition compared with Figure 3E. **C:** This loss occurs after 12 hr. **D:** Re-induction occurs after 24 hr. **E:** Note that after 48 hr, the perturbation of dermal cell migration leads to heterogeneity of primordium size, shape, and localization, resulting in an abnormal pattern in comparison to the control (**F**). In organotypic culture, the ROCK inhibitor (Y-27632) ( $15 \mu\text{M}$ ) was added at  $t_0$ . Scale bars =  $800 \mu\text{m}$ .



**Fig. 8.** Fibronectin expression and formation of dermal condensation in organotypic culture. **A,B:** At time zero, immunodetection of Fibronectin shows a strong expression in dermal condensation (dc) in comparison to interfollicular region. There is also high expression in the upper layer of the dense dermis (dd). The addition of Fibronectin-blocking antibody after 8 hr of culture leads (**C**) to an absence of the dermal condensation formation at  $t_{12}$  and (**D**) to an alteration of this formation after 18 hr of culture. **E:** After 48 hr of culture with the Fibronectin-blocking antibody, the feather primordia are not well defined. **F:** After 48 hr in the control condition (in the presence of an isotype-matched control antibody: TROMA-III), the dorsal skin is covered with elongated feather buds regularly patterned all through the skin. Antibody B3/D6. Counterstaining with DAPI. Ep, epidermis; p, placode. The B3/D6 antibody ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) was added at  $t_0$ . C,D: In situ hybridization with BMP-2 RNA probe. Scale bars = (A)  $80 \mu\text{m}$ ; (B)  $30 \mu\text{m}$ ; (C-F)  $800 \mu\text{m}$ .

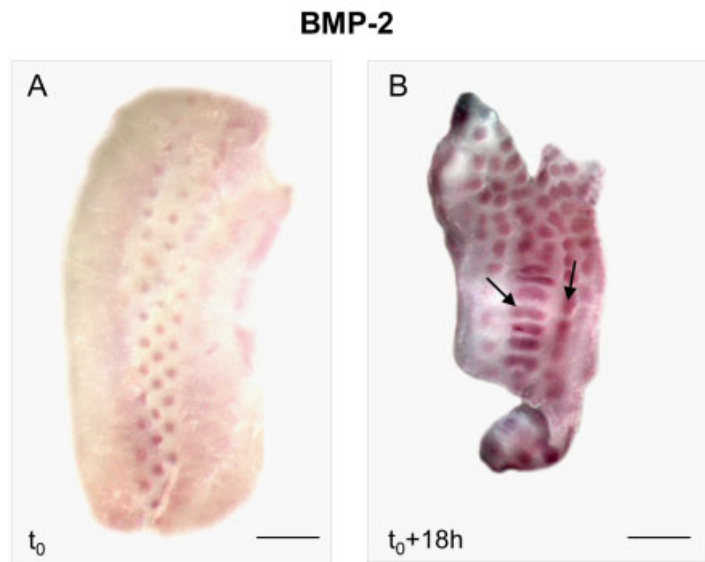


**Fig. 9.** Role of Integrins in dermal condensation formation shown by modulation of interaction with Fibronectin and role of Integrin affinity in organotypic culture. **A:** At  $t_0$ , skin fragments exhibit three feather rows. **B:** Addition of Manganese to the culture medium prevents the loss of BMP-2 expression from  $t_0$  to  $t_0+8$  hr. **C:** Addition of Ionomycin to the culture medium also leads to a stabilisation of BMP-2 expression. **D:** This stabilisation is drastically reduced when Cyclosporin A is added in addition to Ionomycin. **E,F:** When dorsal skin is cut in two pieces through the mid-line, the control (E) has flat feather primordia after 48 hr of culture, while the Ionomycin-treated fragment (F) exhibits elongated feather buds. Fibronectin-blocking antibody ( $5 \mu\text{g/ml}$ ),  $\text{Mn}^{2+}$  ( $5 \mu\text{M}$ ), Ionomycin ( $1 \mu\text{M}$ ), and Cyclosporin A ( $25 \mu\text{g/ml}$ ) were added at  $t_0$ . Scale bars = (A–D)  $800 \mu\text{m}$ ; (E,F)  $200 \mu\text{m}$ .

### Preventing Notch Signalling Leads to an Alteration of Patterning in Organotypic Culture

To assess the role of Notch signalling in the patterning of feather primordia, we inhibited  $\gamma$ -secretase, which is required for Notch activation, by addition of L-685,458 (van Es et al., 2005)

### $\gamma$ -secretase Inhibitor



**Fig. 10.** Perturbation of the pattern after inhibition of Notch/Delta signalling in organotypic culture. **A:** At  $t_0$ , three feather primordia rows are arranged in alternate rows (quincunx). **B:** Feather primordia fusions (arrows) occur at  $t_0+18$  hr. In situ hybridization with BMP-2 RNA probe. The  $\gamma$ -secretase inhibitor L-685,458 ( $15 \mu\text{M}$ ) was added at  $t_0$ . Scale bars =  $800 \mu\text{m}$ .

in organotypic culture medium. At time zero, chick embryo dorsal skin exhibits three rows of primordia (Fig. 10A). After 18 hr, that is, at the end of the reorganization phase, rectangular primordia have formed, which, in the medial part of the skin explant, are the result of lateral fusions of prospective round primordia, or in the lateral part, of fusions of primordia from the fifth to seventh rows on the rostro-caudal axis (Fig. 10B) ( $n = 11/15$ ). After 48 hr, the fused primordia gave rise to giant feather buds (data not shown). Thus, the absence of Notch signalling does not inhibit primordia formation, but instead leads to a fluidity/lability of their boundaries. Consequently, the Notch system is not in control of the initial events in feather morphogenesis, i.e., the formation of the placode, then of the dermal condensation, but rather it is involved in boundary formation and maintenance.

### DISCUSSION

We have developed a model to study the initial steps of cutaneous appendage primordium formation in organotypic culture. The loss and the reinitiation of differentiation in vitro show that this process is autonomous as it

occurs in skin dissected from the embryo, thus isolated from any influences of the underlying organs. This phenomenon allows us to study the impact of different factors by modifying the culture medium, and it could be also useful to establish the order of expression of different genes. Altogether, our results, although obtained in vitro, strongly suggest that feather primordium in vivo morphogenesis might also be due to cell rearrangement and migration rather than differential proliferation.

Wnt-7a has been implicated in the growth of cutaneous appendages as it is expressed throughout the feather placode and then in the posterior half of the feather bud epidermis (Chuong et al., 1996; Widelitz et al., 1999). Wnt-7a is also uniformly expressed where the future placode will form, before the thickening of the epidermis, as shown for the chick scale development (Prin et al., 2004). In our present work, Wnt-7a expression is the first of those factors analyzed to decrease. It might, therefore, be involved in the determination of the placode itself as well as later its proximodistal orientation and growth. Epidermal cells of the placode express factors that promote dermal condensation formation

(Cadi et al., 1983; Dhouailly and Sawyer, 1984; Chuong et al., 1996). These factors may have direct or indirect target genes, some of them being expressed in dense dermis, then in the dermal condensation, and they work together to create the microenvironment of the primordium. The decrease of placodal gene expression in our culture of skin fragments appears to be succeeded by the loss of gene expression in dermal condensation. Thus, BMP-2, which is expressed both in placode and dermal condensation (Jung et al., 1998), and then FGF-10 (known to promote cell proliferation; Tao et al., 2002) in the dermal condensation, disappear, apparently sequentially. Nevertheless, this proposed sequence needs to be confirmed by other studies.

After the loss of this microenvironment, the isolated and cultured dorsal skin redifferentiates to form feather primordia autonomously and *de novo*. Reformation of dermal condensations that contain cells from both the previous dermal condensations and the inter-follicular domain, shows the plasticity of dermal cells at stage HH30. This result is supported by a separate previous experiment of Dr. Chuong's laboratory (Jiang et al., 1999) in which dermal cells were completely dissociated followed by re-association, with the result that cells that had previously been found in the dermal condensation could be found in the inter-follicular dermis after reformation of the condensations. Moreover, this new pattern can show some irregularities even in the control conditions. However, striking differences occur only when the dermal cell migration or the stabilization is disturbed (see below).

A previous work (McKinnell et al., 2004a) showed that there is no RhoA or RhoB expression in the dermis, while RhoB is expressed in the epidermis, and that the use of a specific ROCK inhibitor prevents the formation of the placode. The implication of RhoB in the maintenance of the morphogenetic program leading to feather bud development is thus well demonstrated. Our RT-PCR results show that, firstly, RhoB is expressed at a low level in the dermis, maybe not enough to be detected by *in situ* hybridization in comparison to its strong expression in the placode; and, sec-

ondly, that RhoC is expressed in both the dermis and the epidermis. Specific inhibition of ROCK, thus, not only alters the formation of the placode, but also can have an impact on fibroblast migration in cell culture. The disrupting of primordia formation thus could be due to a combination of effects on both the epidermis and the dermis. The dense dermis organization, thus, could require fibroblast migration via the action of Rho family GTPases on the actin cytoskeleton.

This migration also involves the dynamic regulation of Integrin affinity. In cell migration assays, as well as in micromass formation and in organotypic culture, modifications of Integrin affinity, as of Rho family GTPases activity, lead to perturbations of dermal fibroblast properties, i.e., their capacities for migration and aggregation. Integrins, thus, play an important role in dermal condensation formation. Positive regulation of Integrins by intracellular Calcium accelerates micromass formation, even though switching to the high-affinity state via  $Mn^{2+}$  activation leads to a defect of cell aggregation.

In the cell migration assay, we showed that the activation of Calcium signalling induced a decrease in cell migration; this result was confirmed in the organotypic culture, but not in the micromass formation. These apparently opposing effects might arise from the fact that in organotypic culture, we started with formed dermal condensations, while in the micromass method, we induced this formation from a homogeneous cell suspension.

When Fibronectin is blocked in organotypic culture, dermal condensations are more diffuse than in control conditions. Our results are in accordance with a previous study (Jiang and Chuong, 1992), which has shown that the inhibition of the interaction between  $\beta 1$ -Integrin and Fibronectin leads to defects of dermal condensation formation. So, cells might use this Integrin ligand to migrate during dermal condensation formation. With activation of Integrins by intracellular Calcium, or with Manganese, the lability of the dermal condensations is not observed. The preformed rows do not disappear and the development continues without the microenviron-

ment being lost. Thus, the maintenance of cell adhesion is a key factor for the maintenance of expression of the different genes, such as BMP-2, Wnt-7a, and FGF-10, that are involved in cutaneous appendage formation. The activation of Integrins plays a direct or indirect signalling role during activation of these genes, as well as for the maintenance of their expression. Contradictory results are obtained by the activation of Integrins via Calcium or Manganese. In the micromass formation, the Calcium activates this formation whereas the Manganese inhibits it. This difference might come from the mechanism of Integrin activation: the Manganese, by its direct fixation on the MIDAS domain (Leitinger et al., 2000), switches Integrins in a high-affinity state, whereas activation of calcium signalling modifies the regulatory pathway of Integrin affinity. In the organotypic culture, we obtained the same result with Calcium and with Manganese. In both methods, the complete switch in the high-affinity state of Integrins fixed the initial situation (dispersed cells for the micromass formation and maintenance of dermal condensations in organotypic culture). The Integrin activation leads to the maintenance of the feather primordium.

A recent study using conditional knockout mice showed that deletion of Notch-1 in the epidermis leads to abnormal hair development (Vauclair et al., 2005). In our culture model, Notch signalling is inhibited in both epidermal and dermal cells. Due to the contact-dependent, trans-acting nature of the Notch ligands/receptor complex, the cellular reorganization of dense dermis, and consequent loss of cell contact, the Notch signal might be lost in the first hours of culture. The inhibition of this signal, by use of a  $\gamma$ -secretase inhibitor, does not inhibit primordium formation, but leads to a perturbation of pattern establishment by fusion of some primordia. Fusion of primordia might reflect a dynamic requirement of Notch signalling for the maintenance of the dermal condensation. The most common hypothesis of the role of the Notch system in boundary formation and in segregation of one cell type from another has been previously described in other models



such as axial skeletal formation (Bulman et al., 2000) and chondrogenesis (Fujimaki et al., 2006). Here we show that Notch signalling appears to be implicated not in the initial choice between the two fates of embryonic skin, but in a later step to allow stabilization of the newly formed pattern. To go further, a new hypothesis could be developed in regard to the interaction between the NICD and  $\beta 1$  Integrin. Indeed, to enhance the efficiency of Integrins signalling (inside-out and outside-in), there could be a clustering of  $\beta 1$  Integrin and Notch-1 to facilitate the interaction of the NICD and  $\beta 1$  Integrin. A study on neural stem cells has proposed a model of differentiation based on free concentration of the NICD (Campos et al., 2006). They have shown an interaction between the NICD and the intracellular tail of  $\beta 1$  Integrin and have proposed that this interaction could modify NICD localization as a function of the extracellular matrix composition. With Fibronectin, there is strong interaction between the NICD and  $\beta 1$  Integrin, resulting in a low pool of free NICD. This would prompt cells to migrate and/or to commit to differentiation. So, interaction of Notch and Integrins might lead to inside-out and outside-in signalling via modifications of Integrin affinity, and intracytoplasmic concentration of the NICD. This could be a good hypothesis to explain many aspects of dermal condensation formation. On the dermal condensation domain, characterized by a high amount of Fibronectin, there could be a strong NICD/ $\beta 1$  Integrin interaction, leading to a switch of Integrins to a high-affinity state, necessary for dermal condensation stabilization, with low nuclear NICD, which promotes dermal cell differentiation.

In conclusion, Integrins might play at least two important roles in dermal condensation formation: firstly, in the migration of dermal fibroblasts to the appendage domain via engagement of Integrins on Fibronectin, and, secondly, in their stabilization via interaction with Notch intracellular domain. Furthermore, the stability of the feather dermal condensation boundaries allows, via cell adhesion and outside-in signalling, cell differentiation by sending signals required for at least the maintenance, and per-

haps even the activation, of the expression of several genes known to be essential for cutaneous appendage formation. Although there are many studies showing similarities of feather formation between in vivo and organotypic culture (Novel, 1973; Sengel, 1976; Jung et al., 1998), our results, having been obtained in vitro, should be generalized with care, and confirmed with new in vivo experiments.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Chick Embryos and Materials

Fertilized chicken eggs (JA957 strain, SFPA, St Marcellin, France) were incubated at 38°C until the embryos reached Hamburger Hamilton stage 30 (corresponding to 3 rows of feather primordia) (Hamburger and Hamilton, 1992). Ionomycin,  $\gamma$ -secretase inhibitor (L-685,458), ROCK Inhibitor (Y-27632), and Cyclosporin A were purchased from VWR International (France).

### Organotypic Cultures

Seven-day chick embryo (stage HH 30) dorsal skins were dissected as a single piece starting from the wing to the femoral level, or cut in two symmetrical fragments. They were placed on a liquid-permeable plastic sheet (cellophane) in organ culture dishes (Dominique Dutcher, France) at the air-liquid interface and cultured with DMEM (Gibco) containing 10% FBS and 0.2% Gentamycin (Sigma-Aldrich) for the times indicated in the figure legends.

### Antibodies

The B3/D6 hybridoma (monoclonal antibody specific for avian fibronectin) and the TROMA-III hybridoma (monoclonal antibody specific for rat cytokeratin 19, used as an isotype control for B3/D6), developed, respectively, by D.M. Fambrough, W. Halfter, and R. Kemler, were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242. Primary antibody was

detected with a secondary antibody directed against the appropriate species labelled with Alexa Fluor-546 (Molecular Probes, Eugene, OR). Nuclei were routinely counterstained with DAPI (Sigma-Aldrich).

### Histological Study

Skin explants were fixed in ethanol 95%/acetic acid 5%, and embedded in paraffin. Sections (7  $\mu$ m) were stained with Hematoxylin/Scarlett Biebrich.

### DiI Labelling

Microinjections of 0.2 to 1  $\mu$ l of DiI (2  $\mu$ g/ml in DMSO) (Sigma-Aldrich) were performed in dermal condensations at the femoral level in the medial row of HH 30 chick embryo dorsal skin with a Transjector 5246 (Eppendorf). DNA was stained with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) to identify high nuclei density regions such as dermal condensations. Explants were then cultured for the times indicated in the figure legend.

### In Situ Hybridization

The chick *FGF-10* probe was cloned via PCR into the pGEM-T Easy vectors (Promega, France) (based on its published sequence; Ohuchi et al., 1997). The chick *Wnt-7a* probe was a gift from Dr. C. Logan (U.K.). The chick *BMP-2* probe was a gift from Dr. A.-H. Monsoro-Burq (Monsoro-Burq et al., 1996). Alkaline phosphatase-labelled in situ hybridizations were carried out as previously described (Wilkinson and Nieto, 1993).

### Molecular Biology

Dorsal skin (HH30) pieces were separated into dermis and epidermis after 5 min of Trypsin 2.5%/Pancreatin 4% (Sigma-Aldrich) treatment. Tissues were mechanically dissociated into single cell suspension. RNAs were isolated with the High Pure RNA tissue kit (Roche). Reverse transcription of mRNA was performed with the SuperScript First-Strand synthesis system (Invitrogen, La Jolla, CA). Polymerase Chain reaction was done with the Taq Polymerase (Promega, Madison, WI). Reactions have migrated in a 1% agarose gel and pictures were analyzed with the ImageJ software (NIH).

Primers used, cActine sense: AGAC-CTTCAACACCCAGC; cActine antisense: TGATTTTCATGTGTGCTAGG; cFGF10 sense: GTTTCAGTACAAT-GTGCAAATGG; cFGF10 antisense: AGTTCCTTCATCTATGACATTAC; cRhoA sense: TCAATCGATAGTCCT-GATAGT; cRhoA antisense: TAT-AAGAGAAGGCACCCGAC; cRhoB sense: GCGCAACGACGAGCACGT-GCG; cRhoB antisense: TATAGGAC-CTTGACGAATTG; cRhoC sense: ACTACATCGCCGACATTGAGG; cRhoC antisense: TCACAGCAG-CGGGACCCCG.

### Wound-Healing Test

A fresh single cell suspension of dermal fibroblasts was prepared. Cells were cultured at 780 cells/mm<sup>2</sup> dish with DMEM, 10% FBS, 0.2% Gentamycin, and 2 mM Thymidine (VWR International) to arrest cell proliferation. Wounds were made with a plastic tip after 12 hr of culture. Pictures were taken 20 hr after wounding.

### Cell Migration Assay

A fresh single cell suspension of dermal fibroblasts was prepared. For each condition, 250,000 cells were used in the Innocyte cell migration assay, 24-well plate (VWR International) (Lauffenburger, 1996). The migration was measured after 10 hr of migration by the fluorescence due to the Calcein-AM dye. Fetal Bovine Serum was used as an attracting factor for cells.

### Micromasses Culture

A fresh single cell suspension of dermal fibroblasts was prepared. Ten microliters of a  $2.5 \times 10^6$  cells/ml suspension, with DMEM 10% FBS (Fibronectin-depleted), 0.2% Gentamycin, were spotted as hanging-drop cultures. Pictures were taken after 24 hr of culture.

### Immunofluorescence

Seven-day chick embryos (stage HH30) were fixed in Paraformaldehyde 4%, 30 min at 4°C. They were cryoprotected with an infiltration of 30% Sucrose overnight at 4°C and then embedded in OCT-compound, sectioned (7 μm), and stored at -80°C.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. D.J. Pearton for helpful comments and critical reading of the manuscript, Dr. I. Olivera-Martinez for chick embryo skin photographs, Mrs. B. Peyrusse for the iconography, and Miss P. Betton for technical assistance. F. Michon was the recipient of a doctoral fellowship from the French Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche. This work was supported by a grant from the Laboratoire de Biologie Cellulaire Cutanée, Institut de Recherche Pierre Fabre, to Pr. D. Dhouailly.

### REFERENCES

- Ben-Yair R, Kahane N, Kalcheim C. 2003. Coherent development of dermomyotome and dermis from the entire mediolateral extent of the dorsal somite. *Development* 130:4325-4336.
- Bennett JS, Vilaire G. 1979. Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J Clin Invest* 64:1393-1401.
- Bulman MP, Kusumi K, Frayling TM, McKeown C, Garrett C, Lander ES, Krumlauf R, Hattersley AT, Ellard S, Turnpenny PD. 2000. Mutations in the human delta homologue, DLL3, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis. *Nat Genet* 24:438-441.
- Cadi R, Dhouailly D, 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.
- Campos LS, Decker L, Taylor V, Skarnes W. 2006. Notch, epidermal growth factor receptor, and beta1-integrin pathways are coordinated in neural stem cells. *J Biol Chem* 281:5300-5309.
- Chang CH, Jiang TX, Lin CM, Burrus LW, Chuong CM, Widelitz R. 2004. Distinct Wnt members regulate the hierarchical morphogenesis of skin regions (spinal tract) and individual feathers. *Mech Dev* 121:157-171.
- Chen CW, Jung HS, Jiang TX, Chuong CM. 1997. Asymmetric expression of Notch/Delta/Serrate is associated with the anterior-posterior axis of feather buds. *Dev Biol* 188:181-187.
- Chuong CM, Widelitz RB, Ting-Berretth S, Jiang TX. 1996. Early events during avian skin appendage regeneration: dependence on epithelial-mesenchymal interaction and order of molecular reappearance. *J Invest Dermatol* 107:639-646.
- Clark EA, Brugge JS. 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268:233-239.
- Desbiens X, Queva C, Jaffredo T, Stehelin D, 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, Olivera-Martinez I, Fliniaux I, Missier S, Viallet JP, Thelu J. 2004. Skin field formation: morphogenetic events. *Int J Dev Biol* 48:85-91.
- Dhouailly D, Sawyer RH. 1984. Avian scale development. XI. Initial appearance of the dermal defect in scaleless skin. *Dev Biol* 105:343-350.
- Dhouailly D. 1984. Specification of feather and scale patterns. In: Malacinski GM, Bryant SV, editors. *Pattern formation*. New York: Macmillan Publishing. p. 581-601.
- Dhouailly D. 1977. Dermo-epidermal interactions during morphogenesis of cutaneous appendages in amniotes. In: Creitel RL, editor. *Front matrix biology*. 4:85-91.
- Etienne-Manneville S, Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-635.
- Favier B, Fliniaux I, Thelu J, Viallet JP, Demarchez M, Jahoda CA, 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.
- Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ. 1992. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3686-3690.
- Fujimaki R, Toyama Y, Hozumi N, Tezuka K. 2006. Involvement of Notch signaling in initiation of prechondrogenic condensation and nodule formation in limb bud micromass cultures. *J Bone Miner Metab* 24:191-198.
- 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.
- Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514.
- Hamburger V, Hamilton HL. 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* 195: 231-272.
- Harris MP, Linkhart BL, Fallon JF. 2004. Bmp7 mediates early signaling events during induction of chick epidermal organs. *Dev Dyn* 231:22-32.
- Harrisson F, Van Nassauw L, Van Hoof J, Foidart JM. 1993. Microinjection of anti-fibronectin antibodies in the chicken blastoderm: inhibition of mesoblast cell migration but not of cell ingression at the primitive streak. *Anat Rec* 236:685-696.
- Hartfield PJ, Greaves MW, Camp RD. 1993. Beta 1 integrin-mediated T cell adhesion is regulated by calcium ionophores and endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 196:1183-1187.
- Hornik K, Krishan K, Yusuf F, Scaal M, Brand-Saberi B. 2005. cDermo-1 misexpression induces dense dermis, feathers, and scales. *Dev Biol* 277:42-50.

- Houghton L, Lindon C, Morgan BA. 2005. The ectodysplasin pathway in feather tract development. *Development* 132: 863–872.
- Hyduk SJ, Chan JR, Duffy ST, Chen M, Peterson MD, Waddell TK, Digby GC, Szaszi K, Kapus A, Cybulsky MI. 2007. Phospholipase C, calcium and calmodulin are critical for  $\alpha_4\beta_1$  integrin affinity up-regulation and monocyte arrest triggered by chemoattractants. *Blood* 109:176–184.
- Jamora C, DasGupta R, Kocieniewski P, Fuchs E. 2003. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* 422:317–322.
- Jiang TX, Chuong CM. 1992. Mechanism of skin morphogenesis. I. Analyses with antibodies to adhesion molecules tenascin, N-CAM, and integrin. *Dev Biol* 150:82–98.
- Jiang TX, Jung HS, Widelitz RB, Chuong CM. 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 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.
- Jung HS, Francis-West PH, Widelitz RB, Jiang TX, Ting-Berreth S, Tickle C, Wolpert L, Chuong CM. 1998. Local inhibitory action of BMPs and their relationships with activators in feather formation: implications for periodic patterning. *Dev Biol* 196:11–23.
- Kuznetsov G, Brostrom MA, Brostrom CO. 1992. Demonstration of a calcium requirement for secretory protein processing and export. Differential effects of calcium and dithiothreitol. *J Biol Chem* 267: 3932–3939.
- Lauffenburger DA. 1996. Cell motility. Making connections count. *Nature* 383: 390–391.
- Leitinger B, Hogg N. 2002. The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. *J Cell Sci* 115:963–972.
- Leitinger B, McDowall A, Stanley P, Hogg N. 2000. The regulation of integrin function by  $Ca^{2+}$ . *Biochim Biophys Acta* 1498:91–98.
- Leong KG, Hu X, Li L, Noseda M, Larrivee B, Hull C, Hood L, Wong F, Karsan A. 2002. Activated Notch4 inhibits angiogenesis: role of beta 1-integrin activation. *Mol Cell Biol* 22:2830–2841.
- Liu C, Hermann TE. 1978. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem* 253:5892–5894.
- Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285:895–898.
- Mandler M, Neubuser A. 2004. FGF signaling is required for initiation of feather placode development. *Development* 131: 3333–3343.
- Mauger A, Demarchez M, Herbage D, Grimaud JA, Druguet M, Hartmann D, 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.
- McKinnell IW, Makarenkova H, de Curtis I, Turmaine M, Patel K. 2004a. EphA4, RhoB and the molecular development of feather buds are maintained by the integrity of the actin cytoskeleton. *Dev Biol* 270:94–105.
- McKinnell IW, Turmaine M, Patel K. 2004b. Sonic Hedgehog functions by localizing the region of proliferation in early developing feather buds. *Dev Biol* 272:76–88.
- Monsoro-Burq AH, Duprez D, Watanabe Y, Bontoux M, Vincent C, Brickell P, Le Douarin N. 1996. The role of bone morphogenetic proteins in vertebral development. *Development* 122:3607–3616.
- Morgan BA, Orkin RW, Noramly S, Perez A. 1998. Stage-specific effects of sonic hedgehog expression in the epidermis. *Dev Biol* 201:1–12.
- Nobes CD, Hall A. 1995. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* 23:456–459.
- Noveen A, Jiang TX, Chuong CM. 1995. Protein kinase A and protein kinase C modulators have reciprocal effects on mesenchymal condensation during skin appendage morphogenesis. *Dev Biol* 171: 677–693.
- Novel G. 1973. Feather pattern stability and reorganization in cultured skin. *J Embryol Exp Morphol* 30:605–633.
- Ohuchi H, Nakagawa T, Yamamoto A, Araga A, Ohata T, Ishimaru Y, Yoshioka H, Kuwana T, Nohno T, Yamasaki M, Itoh N, Noji S. 1997. The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development* 124: 2235–2244.
- Olivera-Martinez I, Thelu J, Teillet MA, Dhoulailly 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, Dhoulailly D. 2002. Differential regulation of the chick dorsal thoracic dermal progenitors from the medial dermomyotome. *Development* 129:4763–4772.
- Olivera-Martinez I, Viallet JP, Michon F, Pearton DJ, Dhoulailly D. 2004. The different steps of skin formation in vertebrates. *Int J Dev Biol* 48:107–115.
- Olsen IM, Ffrench-Constant C. 2005. Dynamic regulation of integrin activation by intracellular and extracellular signals controls oligodendrocyte morphology. *BMC Biol* 3:25.
- Pan Y, Lin MH, Tian X, Cheng HT, Gridley T, Shen J, Kopan R. 2004. gamma-secretase functions through Notch signaling to maintain skin appendages but is not required for their patterning or initial morphogenesis. *Dev Cell* 7: 731–743.
- Pearson DJ, Yang Y, Dhoulailly D. 2005. Transdifferentiation of corneal epithelium into epidermis occurs by means of a multistep process triggered by dermal developmental signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3714–3719.
- Prin F, Logan C, D'Souza D, Ensini M, Dhoulailly D. 2004. Dorsal versus ventral scales and the dorsoventral patterning of chick foot epidermis. *Dev Dyn* 229:564–578.
- Raftopoulou M, Hall A. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265:23–32.
- Rouzankina I, Abate-Shen C, Niswander L. 2004. Dlx genes integrate positive and negative signals during feather bud development. *Dev Biol* 265:219–233.
- Scaal M, Fuchtbauer EM, Brand-Saberi B. 2001. cDermo-1 expression indicates a role in avian skin development. *Anat Embryol (Berl)* 203:1–7.
- Sengel P. 1976. Morphogenesis of skin. Cambridge: Cambridge University Press.
- Sengel P, Abbott UK. 1963. In Vitro Studies with the Scaleless Mutant. Interactions During Feather and Scale Differentiation. *J Hered* 54:255–262.
- Song H, Wang Y, Goetinck PF. 1996. Fibroblast growth factor 2 can replace ectodermal signaling for feather development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10246–10249.
- Stott NS, Chuong CM. 2000. Retroviral gene transduction in limb bud micro-mass cultures. *Methods Mol Biol* 135: 509–513.
- Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA. 2002. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 110:599–511.
- Tao H, Yoshimoto Y, Yoshioka H, Nohno T, Noji S, Ohuchi H. 2002. FGF10 is a mesenchymally derived stimulator for epidermal development in the chick embryonic skin. *Mech Dev* 116:39–49.
- Ting-Berreth SA, Chuong CM. 1996a. Local delivery of TGF beta2 can substitute for placode epithelium to induce mesenchymal condensation during skin appendage morphogenesis. *Dev Biol* 179: 347–359.
- Ting-Berreth SA, Chuong CM. 1996b. Sonic Hedgehog in feather morphogenesis: induction of mesenchymal condensation and association with cell death. *Dev Dyn* 207:157–170.
- Turing AM. 1990. The chemical basis of morphogenesis. 1953. *Bull Math Biol* 52: 153–197; discussion 119–152.
- Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. 1997. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-asso-



- ciated protein kinase in hypertension. *Nature* 389:990–994.
- van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, Cozijnsen M, Robine S, Winton DJ, Radtke F, Clevers H. 2005. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435:959–963.
- Vauclair S, Nicolas M, Barrandon Y, Radtke F. 2005. Notch1 is essential for postnatal hair follicle development and homeostasis. *Dev Biol* 284:184–193.
- Viallet JP, Prin F, Olivera-Martinez I, Hirsinger E, Pourquie O, Dhouailly D. 1998. Chick Delta-1 gene expression and the formation of the feather primordia. *Mech Dev* 72:159–168.
- Weinmaster G, Roberts VJ, Lemke G. 1991. A homolog of *Drosophila* Notch expressed during mammalian development. *Development* 113:199–205.
- Werfel SJ, Yednock TA, Matsumoto K, Sterbinsky SA, Schleimer RP, Bochner BS. 1996. Functional regulation of beta 1 integrins on human eosinophils by divalent cations and cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14:44–52.
- Wessells NK. 1965. Morphology and proliferation during early feather development. *Dev Biol* 12:131–153.
- Widelitz RB, Jiang TX, Chen CW, Stott NS, Chuong CM. 1999. Wnt-7a in feather morphogenesis: involvement of anterior-posterior asymmetry and proximal-distal elongation demonstrated with an in vitro reconstitution model. *Development* 126:2577–2587.
- Widelitz RB, Jiang TX, Lu J, Chuong CM. 2000. beta-catenin in epithelial morphogenesis: conversion of part of avian foot scales into feather buds with a mutated beta-catenin. *Dev Biol* 219:98–114.
- Wilkinson DG, Nieto MA. 1993. Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods Enzymol* 225:361–373.

*Publication II*

## 2. Publication n°2

### **BMP-2 and BMP-7 play separate, antagonistic roles in feather induction.**

Frederic Michon, Loïc Forest, Jacques Demongeot and Danielle Dhouailly

Submit to Developmental Cell

#### **Abstract**

During embryonic development, feathers first appear as primordia consisting of an epidermal placode associated with a dermal condensation. In most previous studies, the BMPs have been proposed to function as inhibitors of the formation of cutaneous appendages (Pummila et al., 2007). We demonstrate that the function of BMPs is actually quite nuanced: BMP-2 and BMP-7, which are expressed in both skin components, act antagonistically and yet are both required for the formation of dermal condensations. BMP-7, the first to be expressed, is implicated in chemotaxis which leads to cell recruitment to the condensation, whereas BMP-2, which is expressed later, leads to an arrest of the cell migration, likely via its modulation of the *Fibronectin EIIIA* domain expression. We propose a mathematical model, a reaction-diffusion system, based on cell proliferation, chemotaxis and the timing of *BMP-2* and *BMP-7* expression, which simulates the endogenous situation and reproduces the negative effects of excess BMP-2 or BMP-7 on feather patterning.

# **BMP-2 and BMP-7 play separate, antagonistic roles in feather induction**

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

<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

\*Corresponding author: [Danielle.Dhouailly@ujf-grenoble.fr](mailto:Danielle.Dhouailly@ujf-grenoble.fr)

\*\* Present address: Laboratoire de Mathématiques de l’INSA (LMI), Place Emile Blondel, BP 08, 76131 Mont Saint Aignan Cedex - France

Key words: dermis, cutaneous appendage, chemotaxis, migration, Fibronectin, mathematical model, skin

## Abstract

During embryonic development, feathers first appear as primordia consisting of an epidermal placode associated with a dermal condensation. In most previous studies, the BMPs have been proposed to function as inhibitors of the formation of cutaneous appendages (Pummila et al., 2007). We demonstrate that the function of BMPs is actually quite nuanced: BMP-2 and BMP-7, which are expressed in both skin components, act antagonistically and yet are both required for the formation of dermal condensations. BMP-7, the first to be expressed, is implicated in chemotaxis which leads to cell recruitment to the condensation, whereas BMP-2, which is expressed later, leads to an arrest of the cell migration, likely via its modulation of the *Fibronectin EIIIA* domain expression. We propose a mathematical model, a reaction-diffusion system, based on cell proliferation, chemotaxis and the timing of *BMP-2* and *BMP-7* expression, which simulates the endogenous situation and reproduces the negative effects of excess BMP-2 or BMP-7 on feather patterning.

## Introduction

The chick skin can be divided into different domains: pterylae (feather area), semi-apteria (with a few feathers) and apteria (glabrous area) (Mayerson and Fallon, 1985; Sengel, 1976). The future pterylae are characterized by the formation of a dense dermis (Sengel, 1976). In the back skin, 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 feather will appear, undergoes a further density increase. Before the cell migration leading to dermal condensation formation occurs, cells proliferate until a threshold is reached (2.60 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: 2.0 nuclei/1000 $\mu\text{m}^3$  for the dorso-scapular and 0.9 nuclei/1000 $\mu\text{m}^3$  for the mid-dorsal semi-apteria (Olivera-Martinez et al., 2001). When the cell density has exceeded the 2.60 nuclei/1000 $\mu\text{m}^3$  threshold, cell proliferation stops and there is redistribution (Michon et al., 2007) of dermal cells to form dermal condensations (5.52 nuclei/1000 $\mu\text{m}^3$ , (Wessells, 1965)) under epidermal placodes. Together, these two structures form the feather primordium. The lateral propagation of this process creates a hexagonal feather pattern (Sengel, 1976).

The cross-talk between the epidermis and the dense dermis, leading to feather morphogenesis (Dhouailly, 1977), involves numerous pathways (for a review: (Chuong, 1998)). However, the orchestration of the dialogue within the narrow time window of feather primordium formation is not yet clearly established. The different signals have been classified either as activators (FGFs, Shh, cAMP, TGF $\beta$ 2...) or as inhibitors (BMPs, PKC activators...) of this process (Jung et al., 1998). The FGF pathway is implicated in both epidermal and dermal differentiation (Tao et al., 2002; Widelitz et al., 1996). In particular, epidermal *FGF-2* expression is involved in dermal condensation formation via its chemotactic effect on fibroblasts (Song et al., 1996; Song et al., 2004; Viallet et al., 1998). In what concerns the

BMP family, three members are expressed in the feather primordium domain. BMP-2 and BMP-4 belong to the same subgroup and share redundant pathways, whereas BMP-7 belongs to another subgroup (Miyazono et al., 2005). *BMP-2* is initially expressed in the preplacodal epidermis, then its expression is restricted in the placode and in the dermal condensation during its formation (Noramly and Morgan, 1998). *BMP-4* transcripts are detected only in the forming dermal condensation (Noramly and Morgan, 1998). *BMP-7* transcripts are initially detected throughout the epidermis before placode formation and subsequently its expression is restricted to the follicular domain, in both dermis and epidermis before dermal condensation formation, and is maintained after primordium formation (Harris et al., 2004). *BMP-2* expression is described as earlier than *BMP-4* (Houghton et al., 2005), and the *BMP-2* expression has been proposed to be later than *BMP-7* (Harris et al., 2004). The regulation of *BMP-2* and *BMP-4* expression in chick embryonic skin is still unknown whilst *BMP-7* is differentially regulated in the two skin components. *BMP-7* is expressed early in the epidermis, under the control of an yet unknown dermal signal, whereas its dermal expression is regulated by the canonical Wnt signaling from the placode (Harris et al., 2004).

The BMP pathway is currently considered as an inhibitor of feather (Jung et al., 1998) as well as hair or even tooth formation (Pummila et al., 2007). The application of BMP-4 coated beads on explanted chick HH28 (E6) dorsal skin inhibits adjacent feather bud formation (Jung et al., 1998). In addition, over-expression of *BMP-4* in the chick embryo dorsal skin, via infection with a BMP-4 expressing RCAS virus, leads to the formation of glabrous areas (Noramly and Morgan, 1998). However, the different studies addressing the role of BMPs in feather formation appear to be contradictory. The application of BMP-7 coated beads leads to an inhibition of feather formation (Patel et al., 1999), whereas its expression has more recently been shown to be required (Harris et al., 2004). Likewise, an ectopic feather forming dermis can be obtained in two opposite ways: by the inhibition of

BMP pathway at HH13 (E2), following the graft of Noggin producing cells in the mid-ventral apterium (Fliniaux et al., 2004), or at HH22 (E4) by the graft of a bead coated with BMP-4 in the dorso-scapular semi-apterium (Scaal et al., 2002). These apparently contradictory results might be explained by body location, as the molecular mechanisms responsible for the establishment of the early dermis in the back and the ventral region are different (Fliniaux et al., 2004; Olivera-Martinez et al., 2002). With respect to the contradictory results for the back region ((Jung et al., 1998; Noramly and Morgan, 1998; Patel et al., 1999) versus (Scaal et al., 2002)), it might be noticed that in those experiments the amounts of BMP are quite different, which involves differences in the duration of activation of the BMP pathway. The use of RCAS infection (Noramly and Morgan, 1998) or high concentration coated beads (660µg/ml) leads to an inhibitory effect (Jung et al., 1998), while the used of low concentration coated beads (20µg/ml) (Scaal et al., 2002) led to activation. Other results also appear to contradict the dogma according to which the BMP signaling is required to be inhibited to allow cutaneous appendage formation. *Msx-1* and *Msx-2*, two BMP target genes, are expressed in the placode (Noveen et al., 1995). Two principal BMP signaling antagonists have been identified in chick skin, Follistatin and *Drm/Gremlin*. Although *Follistatin* expression, regulated by BMP-7, initially occurs throughout the follicular domain, it shifts rapidly to a peripheral ring when the placode is formed (Patel et al., 1999), while *Drm/Gremlin* is restricted to the interfollicular domain (Bardot et al., 2004). A recent study has proposed the Eda/Edar pathway as the BMP inhibitor for hair formation (Pummila et al., 2007), but in chick these molecules are expressed after BMP-2 expression has started (Houghton et al., 2005), and thus would function only to temporally limit its effects. 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 amount of BMP amount delivered experimentally, indicate a more nuanced role for the BMPs.



In order to probe this issue in chick embryo, we undertook three types of analyses which focus on dermal condensation formation. Firstly, we investigated the expression of another set of downstream targets of BMP signaling, the Id genes, which were known to modify cell differentiation (Kreider et al., 1992; Miyazono and Miyazawa, 2002; Ogata et al., 1993). In chick, four Id genes have been reported in neural crest derivatives (Kee and Bronner-Fraser, 2001), and we studied here their potential expression in skin. Secondly, we addressed the issue of dermal fibroblast behavior. In going from a dense dermis to the dermal condensation, fibroblasts migrate on extracellular matrix (Mauger et al., 1982), and Fibronectin, a major actor for cell migration, has been implicated (Chuong, 1993; Michon et al., 2007). Alternative splicing of *Fibronectin* has been identified as a key regulator of Integrin affinity in CHO cells, with the EIIIA domain modulating the Fibronectin/Integrin interaction (Manabe et al., 1997). Another role of the EIIIA domain is its ability to induce the G1-S transition by promoting adhesion on  $\alpha 5\beta 1$  Integrin (Manabe et al., 1999). We thus studied the changes in the expression of the *EIIIA* domain during dermal organization. Thirdly, we established a mathematical model that takes into account these new parameters and more closely resembled the *in vivo* situation than the pioneering corresponding model (Jiang et al., 2004) based on an activation/inhibition diffusion Turing system (Turing, 1952). Our numerical simulation was in agreement not only with our current biological experimental results, but also explained previous apparently contradictory results (Jung et al., 1998; Noramly and Morgan, 1998). Finally, we showed here that instead of acting as inhibitors of feather formation, the BMPs play several roles, from the regulation of dermal condensation formation to the continuation of feather morphogenesis.

## Results

### The BMP pathway is implicated in early feather primordium formation

To determine the timing of *BMP-2* and *BMP-7* expression in feather formation we compared the two femoral feather tracts of the same embryo, as they develop synchronously on the left and right sides of the embryo, so that it is possible to compare changes in gene expression over a developmental series (Houghton et al., 2005). Feather rows were numbered accordingly 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 which will give rise to the third row occurred (Houghton et al., 2005). This third row forms the boundary between the femoral and the zeugopodial tracts, which are on each side of a semi-apteria. We examined the pattern of expression of either *BMP-2* and *BMP-7*, or *BMP-2* and *Follistatin* in the corresponding feather primordia of the left and right halves of the same embryo. As expected, their expression was detected in the HH30 embryo femoral tract (n=6/6 for each comparison). In the second row of this tract, *BMP-2* was detected in only two feather primordia (Figure 1A), whereas *BMP-7* was expressed in five primordia (Figure 1B). *Follistatin* (Figure 1D), a BMP inhibitor, was expressed after *BMP-2* (Figure 1C). Likewise, in agreement with the fact that BMPs are expressed before any of their inhibitors, the BMP target genes *Ids* are expressed in feather primordia. *Id-1* transcripts were detected in HH30 chick embryo dorsal skin in the primordium, with expression appearing to be stronger in newly formed rows and lower in the earlier ones (Figure S1A). *Id-3* was also expressed in the primordium (Figure S1B). *Id-4* expression appeared initially in the complete primordium (newly formed rows), but subsequently the transcripts were detected only as a ring in the follicular domain (Figure S1C).

Thus, the BMP pathway appeared to be involved in feather primordium formation. What is its potential role, particularly during dermal condensation formation?

### **BMP-2 and BMP-7 have opposite effects on fibroblast migration**

In order to distinguish the role of BMP-2 and BMP-7 on dermal cells, we quantified their effects on migration through a membrane under various conditions (Figure 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 chemoattractive effect. Secondly, we added FGF-2, which is known to have a positive chemoattractive effect on dermal cells (Song et al., 2004), to the basic media. Each result, 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% ( $p < 0.001$ ). As it was previously described, FGF-2 activated cell motility, both in presence (+11.9%,  $p < 0.01$ ) or absence (+10.7%,  $p < 0.01$ ) of FBS. Interestingly, BMP-7 has an even stronger effect than FGF-2 on dermal fibroblasts at +22.2% ( $p < 0.01$ ) in the presence or +20% ( $p < 0.01$ ) in the absence of FBS, while BMP-2 has an inhibitory effect on migration: -18.7% ( $p < 0.01$ ) with and -11.9% ( $p < 0.01$ ) without FBS. Combining BMP-2 and BMP-7 in the same medium cancelled out the effect of each factor on dermal cell migration, the comparison with BMP-7 attracting effect is striking -24.1% ( $p < 0.02$ ) with and -18.9% ( $p < 0.01$ ) without FBS. *In vivo*, it should be noticed that BMP-2 is expressed after BMP-7 and thus might limit dermal cell migration after the start of dermal condensation formation. Our *in vitro* assay was independent of extracellular matrix, but *in vivo*, what might the interactions between the BMPs and the extracellular matrix involve?

### **The Fibronectin EIIIA domain is implicated in dermal organization**

Analysis of the *Fibronectin EIIIA* domain in chick embryo dorsal skin showed a loss of expression in fully-formed dermal condensations at HH29+, whereas its expression was high in areas where the dense dermis was still undergoing organization (Figure 3A). At HH30,

there was a lateral expansion of *EIIIA* domain expression and a slight decrease of expression in the interfollicular domain of the first rows formed (Figure 3B). To analyze the timing of the loss of the *EIIIA* domain expression, we compared its expression with *BMP-2* in the femoral tract (n=9/9 for each experiment). Whereas *BMP-2* is expressed in five primordia on the fourth row (Figure 3C), the loss of *EIIIA* expression occurred only in two primordia of the same row (Figure 3D). Furthermore, a strong expression was detected at the distal boundary of the tract close to the third row which has started to form. The expression of *BMP-2* thus preceded the alternative splicing of the *EIIIA* Fibronectin domain.

To study the alternative splicing of *EIIIA*, we have used freshly isolated dermal cells in two complementary methods: hanging drop and adherent cultures. In order to mimic the formation of dermal condensations *in vitro* by dispersed fibroblasts, we used the micromass method (as previously described (Michon et al., 2007)) to follow cell aggregation for 3 days. Semi-quantitative RT-PCR, done in triplicate, was performed in order to follow *Fibronectin* and *EIIIA* expressions (Figure 3E). At time zero, 59.4 +/- 1.9% of the total expressed *Fibronectin* (100%) contained the *EIIIA* domain. After 24 hours, *Fibronectin* expression decreased (89.5 +/-2.4%) along with a decrease of the *EIIIA* (47.2 +/-1.9%). After 48 hours, the total expression of *Fibronectin* has stabilized (92.8 +/-2.5%), whereas the proportion containing *EIIIA* expression continued to decrease (39.3 +/-2.2%). After 72 hours, the total *Fibronectin* expression has decreased still further (64.1 +/-3.5%) and the proportion of *Fibronectin* containing *EIIIA* has been reduced to 24.3 +/-2.5%. The relative decrease of *EIIIA* domain containing *Fibronectin* can also be induced in adherent culture via the addition of *BMP-2* (Figure 3F). RT-PCR of primary (P0) cultured dermal fibroblast showed expression of the *EIIIA* domain after 29 hours of culture under control conditions, whereas the addition of *BMP-2* led to a complete loss of *EIIIA* after 12 hours. The alternative splicing of *EIIIA* thus appears to be regulated by *BMP-2*. As the *EIIIA* domain was not only shown to modulate

Fibronectin/Integrin interaction, but also to be implicated in the control of cell proliferation (Manabe et al., 1999), we wanted to quantify the population of cycling cells in the dorsal skin before and after dermal condensation formation.

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

Cycling cells have been previously localized in the interfollicular dermis and not in the dermal condensation (Rouzankina et al., 2004; Wessells, 1965). To take into account cell proliferation during dermal condensation formation, we studied it in chick embryo dorsal skin from HH29 to HH30. At these stages, the dorsal skin can be divided into three parts: the medial part, carrying the first dermal condensation at HH30, and two lateral parts, surrounding this. The proportion of cycling dermal cells in each part was determined via flow cytometry (Figure S2). At HH29, the difference between the lateral and medial parts was not significant: 83.7% of cells in G1 in the medial part, compared to 78.9% in the lateral part. 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 dermal cells were in G1. The proliferation of dermal cells just before condensation formation is likely to be an important factor leading to the establishment of the required cell density.

### **Mathematical model formulation for dermal condensation formation**

Taken together, our results allowed us to build a mathematical model for feather primordium formation which included cell density and proliferation as well as cell migration, regulated by BMP-7 and BMP-2, and the timing of expression of these morphogenetic factors. The model was inspired by activator-inhibitor model proposed by Gierer and Meinhardt (Gierer and Meinhardt, 1972). It also included dermal cell density and migration according to

chemotaxis as in previous studies (Cruywagen et al., 1992; Painter et al., 1999). In our model, BMP-7 is an activator of feather primordium formation via its effect on chemotaxis and cell recruitment, whereas BMP-2 counteracts the positive effect of BMP-7 on cell migration.

The mathematical model described the spatiotemporal dynamics of four variables:  $n_1$ ,  $n_2$ ,  $u$  and  $v$  in a two dimensional space  $\Omega$ . The dermal cell population, which concentration is noted  $n$  ( $n = n_1 + n_2$ ), was divided into two subpopulations  $n_1$  (cycling cells), and  $n_2$  (migrant cells).  $n_1$  cells proliferated (with  $k_p$  as a proliferation constant and  $N$  the maximal cell population) 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 became able to migrate.  $n_2$  is the population of migrant cells. This transition is determined by a “differentiation” constant  $k_d$ . Equations for  $n_1$  are then described by:

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

For  $n_2$  cells, the migration flux was modeled by a diffusive part with constant  $D_n$  and a chemotactic part with a constant  $\chi$ . The chemoattractant is  $u$  (BMP-7).

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

$u$  (BMP-7) and  $v$  (BMP-2) were given by reaction-diffusion equations.  $D_u$  and  $D_v$  denoted 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:

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

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

$u$  plays an activator role and  $v$  is an inhibitor.  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$  and  $c_4$  are positive constants.

Production terms stated that *BMP-7* expression was reinforced by a “spot” (dermal condensation) microenvironment. Its chemotactic effect was inhibited by *BMP-2*. And both *BMP-2* and *BMP-7* were expressed by the same cell population (primordium domain). Initial conditions for  $u$  and  $v$  are given by  $u_0$  and  $v_0$  generally taken equal to 0.

The model is then completely described by equations (2), (3) and (4) with the initial conditions and no flux boundary conditions for all variables.

### **Dermal condensation formation obtained with numerical resolution**

The end result of running the simulation is 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 (Figure 4A-D; Movies S1 and S2). Based on previous observations of our laboratory (Olivera-Martinez et al., 2001), we included the cell densities in the dermis of apteria, semi-apteria and pterylae 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 (Figure 5A). Under this threshold ( $q=0.2$  to  $0.12$ ), the pattern formation is not regular (Figure 5B and C), similar to what is observed in semi-apteria. The cell density limit was obtained with  $q=0.11$  (only 9% difference) where no spots were formed (Figure 5D), similar to what occurs with the *in vivo* formation of apteria.

### **Effects of *BMP-7* and *BMP-2* pulses *in vivo* on feather patterning are mimicked by our mathematical model**

Our mathematical model allowed us to show the sequential formation of spots, similarly to dermal condensation morphogenesis, as a function of *BMP-7* and *BMP-2* expression and effects. We tested our model under a regime of a local or homogeneous pulse of *BMP-7* or *BMP-2* as compared to biological experiments.

Culture of HH29 chick embryo dorsal skin for 48 hours led to the formation of a hexagonal pattern, even in the presence of PBS coated bead (Figure 6A), as was obtained by the mathematical model (Figure 6B). The chemoattractive effect of *BMP-7* was tested by the use of coated beads on HH29 chick skin. Under the bead, there was an increase of cell density, presumably due to the chemotactic effect of *BMP-7* (Figure 6C). These results were also obtained with our model (Figure 6D), where a local pulse of activator led to the recruitment of cells under the source according to the chemoattractive effect. The excess of cell recruitment resulted in an area of lower cell density around the source that could not support the formation of spots. The inhibition of spot formation followed the over-activation of cell recruitment but the pattern was maintained beyond this circle of depleted cell density (Movies S3, S4). The addition of *BMP-2* in the culture medium inhibited the cell migration induced by *BMP-7* throughout the explant and consequently the primordia formation (Figure 6E). These results were also mimicked in our simulation: a homogeneous pulse of inhibitor led to an arrest of cell migration and a lack of formation of spots (Figure 6F and Movies S5, S6). Likewise, a local pulse of inhibitor exhibited a glabrous area, due to the inhibition of cell migration (data not shown), simulating previous results (Patel et al., 1999).



## Discussion

For the last ten years, the BMP pathway has been considered as inhibitor of cutaneous appendage formation (Botchkarev, 2003; Jung et al., 1998; Pummila et al., 2007). However, expression of BMP target genes such as *Id-1*, *-3* and *-4*, as shown here, or *Msx-1* and *Msx-2* previously shown (Chuong et al., 1996) are clues that the positive effects of the BMP pathway are required for feather morphogenesis. Only one previous study has proposed a BMP pathway positive role by mediating the competence of epidermis to respond to the primary dermal inductive signal (Harris et al., 2004).

In this study, we propose separate and antagonistic roles for BMP-7 and BMP-2, two factors expressed during feather primordium formation. BMP-7 appears to act as a chemoattractive factor, leading to dermal fibroblast migration, while BMP-2, which is expressed later, appears to arrest the migration, leading to a brake on recruitment to the condensation. The later expression of *BMP-4* in the dermal condensation could also act in the arrest of cell migration due to its redundant activity with BMP-2 (Noramly and Morgan, 1998). As previously suggested in the osteogenic differentiation (Hazama et al., 1995), the concomitant presence of *BMP-2*, *BMP-4* and *BMP-7* in the dermal condensation microenvironment could lead to a modification of the effect of each factor on cell migration. The BMP pathway thus could both regulate the formation of the dermal condensation, and by promoting *Id* and *Msx* expression, allow the further feather morphogenesis.

In what concerns BMP-7, its chemotactic effect has been previously described on human mesenchymal stem cell (Lee et al., 2006). BMP-7 activity is mediated by its fixation on Activin type I and II receptors (ActR-I) (Miyazono, 1999), (ActR-II) (Sebald and Mueller, 2003). Recent studies have proposed a direct link between cell migration and ActR activation in keratinocytes (Zhang et al., 2005), as well as in breast tumor cells (Giehl et al., 2007).

These mechanisms, which involved Rho-GTPases, proteins shown to be required for fibroblast migration (Michon et al., 2007), could thus be involved in dermal cell chemotaxis.

BMP-2/-4 activity is mediated by their fixation on BMP type I and II receptors (Botchkarev, 2003), and at least three kinds of effects could be implicated in their negative role on cell migration. The skin expression pattern of the *EIII*A domain reflects the state of dermal organization at HH30: the medial formation of dermal condensations (loss of *EIII*A expression) and the lateral cell proliferation and migration (*EIII*A expression). Although there is an increase of Fibronectin deposition in the dermal condensation (Mauger et al., 1982; Michon et al., 2007), the *EIII*A domain is spliced out in this area, thus migration is arrested. This alternative splicing was regulated by BMP-2 in primary cultured dermal fibroblasts. The loss of the *EIII*A domain of Fibronectin in dermal condensation correlates, as previously shown in other organs (Manabe et al., 1999; Manabe et al., 1997), with a modification not only of cell migration but also of cell proliferation. Indeed, the decrease of *EIII*A expression during cell aggregation correlates with the absence of cycling cell in the dermal condensation (Jiang and Chuong, 1992; Wessells, 1965), and could thus reflect an indirect role for the BMP-2 pathway on the cell cycle regulation in the feather primordium domain. BMP-2 might also regulate the cell migration via a direct effect on Integrin expression, as it was recently shown in osteoblasts with increase of  $\beta$ 1-Integrin expression (Sotobori et al., 2006), and in satellite cells with increase of  $\alpha$ 2 and decrease of  $\alpha$ 7-Integrin expression (Ozeki et al., 2007). This direct link could explain the rapid effect on primary dermal cells that we observed in cell migration assay.

This new view of BMPs and dermis organization allows us to propose a model for their effect on chick dermal patterning, which is consistent with previous studies (among others: (Chuong, 1991; Chuong, 2000; Chuong et al., 1996; Harris et al., 2004; Michon et al., 2007; Olivera-Martinez et al., 2004; Sengel, 1975; Viallet et al., 1998)). Based on BMPs and

a few other genes, it only concerns dermal condensation formation but not placode formation and bud orientation. Our model proposes the following steps (Figure 7): Initially there is limited proliferation along the dorsal midline until a critical cell density ( $2.60 \text{ nuclei} / 1000\mu\text{m}^3$ ) is obtained (Wessells, 1965). Then, the molecular dialogue between epidermis and dermis, which leads to primordium formation, can start. Activation of  $\beta$ -catenin in the epidermis (Noramly et al., 1999) is necessary to allow placode formation and consequently dermal organization. So, the first permissive dermal signaling might be a combination of factors like a Wnt, for  $\beta$ -catenin stabilization, and another one for *FGF-2* and *BMP-7* expression (Harris et al., 2004). At least two epidermal responses occur: *FGF-2* expression, its loss leading to an absence of feather primordia formation as in *Scaleless* mutant (Song et al., 1996; Song et al., 2004; Viallet et al., 1998) and *BMP-7* expression, loss of which leads also to the arrest of feather induction (Harris et al., 2004). *FGF-2* (Song et al., 2004) and *BMP-7*, both epidermal diffusible factors, might initiate dermal cell migration to the under placodal area by their chemoattractive effects. Then, the dermal expression of *BMP-7*, which is regulated by a placodal Wnt signal (Harris et al., 2004), could enhance this process. The *BMP-2* expression, in the placode and then in dermal condensation (Noramly and Morgan, 1998), could modify dermal *Integrin* expression and regulate alternative splicing of *EIIIA*, both events leading to a decrease of dermal cell migration capabilities. Two other facts could contribute to the limitation of the primordium. The induction of *Follistatin* expression by *BMP-7* activity (Patel et al., 1999) leads to lateral inhibition of BMP pathways. This inhibition is reinforced by the expression of *Drm/Gremlin* in the interfollicular domain (Bardot et al., 2004). Finally, the induction of the Notch system (Chen et al., 1997), after *BMP-2* expression (Michon, unpublished data), stabilizes the follicular domain identity by the strengthening of its boundaries.

Consistent with these processes, we propose a mathematical model that includes cell proliferation, cell migration by chemotaxis and leads to sequential hexagonal feather pattern formation. In this model, we have attributed a chemoattractive role to BMP-7 and an arrest role of this chemotaxis to BMP-2. The first result was that running our model closely mimics the sequential pattern formation observed *in vivo*. Another notable result obtained is a clarification of 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 very small (9%).

Our mathematical model can also explain the previous biological results which have concluded that BMP factors are inhibitors of feather primordium formation. Indeed, the use of a point source of 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 BMP-7 coated bead, that was previously interpreted as an inhibitory effect (Patel et al., 1999). Our model explains this result as an over-activation of chemotaxis. Another kind of biological result which can be reproduced by our model was the skin infection with RCAS-BMP-2 (Noramly and Morgan, 1998), or the use of BMP-2 coated beads (Jung et al., 1998), or even the addition of BMP-2 in the culture medium (our own experiments). All these methods led to the homogeneous over-expression of *BMP-2* in areas which then stay glabrous. Our simulation showed that a local or homogeneous high concentration of the factor that arrests cell migration led to the formation of a glabrous area.

Our main conclusion is that different members of the BMP pathway play at least two important roles in the dermal condensation formation. Firstly, epidermal, then dermal BMP-7 activates the migration of dermal fibroblasts to the appendage domain via chemotaxis; secondly, epidermal, then dermal BMP-2 stops the migration, probably by regulating *Integrin*

and *EIII*A expression. This effect, later reinforced by expression of *BMP-4* in the dermis, may lead to the limitation of the dermal condensation size. Moreover, the activation of target genes such as the *Id* and *Msx* families suggests a subtle cell transcriptome regulation in the primordium, due to the transcriptional inhibitor role of *Id* factors (Kreider et al., 1992; Miyazono and Miyazawa, 2002), and the transcriptional activator role of *Msx* factors (Lallemand et al., 2005; Ramos and Robert, 2005) during the continuation of feather morphogenesis.

## **Experimental procedures**

### **Chick embryos, materials and histology**

Fertilized eggs (JA957 strain, St Marcellin, France) were incubated at 38°C until the embryos reached Hamburger Hamilton stage 29 or 30 (Hamburger and Hamilton, 1951). rhBMP-2, rhBMP-7 and rhFGF-2 were purchased from R&D Systems Europe.

### **Organotypic cultures**

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 placed on a liquid-permeable plastic sheet (cellophane) in organ culture dishes (Dominique Dutcher, France) at the air-liquid interface and cultured with DMEM (Gibco) containing 10% FBS and 0.2% Gentamycin (Sigma-Aldrich) for the times indicated. For local application, 150 to 200µm diameter Affigel Blue beads (Bio-Rad) were soaked into PBS or BMP-7 (333µg/ml) and then placed on the top of the explants.

### **Dermal fibroblast isolation, cell migration assay and micromasses culture**

Dorsal skin (HH 30) pieces were separated into dermis and epidermis after 5 minutes of Trypsin 1.25% / Pancreatin 4% (Sigma-Aldrich) treatment. The dermis was mechanically dissociated into a single cell suspension. Cells were used for RT-PCR, cell migration assay, adherent cell culture or micromass formation. To evaluate the cell migration,  $25 \cdot 10^4$  cells were used for each condition in the Innocyte cell migration assay, 24-well plate (VWR International) (Lauffenburger, 1996). The migration was measured after 10 hours by the fluorescence of the Calcein-AM dye. Fetal Bovine Serum was used as an attracting factor for cells as a positive control. For the micromasses culture, 10µl aliquots of a  $2.5 \times 10^6$  cells/ml

suspension, with DMEM 10% FBS (Fibronectin-depleted), 0.2% Gentamycin, were spotted as hanging-drop cultures.

### **FACS analysis**

HH29 and HH30 chick embryo dorsal skins were dissected and the medial part separated of lateral ones. Obtained dermal cell suspensions were fixed 30 minutes in cold ethanol absolute ( $2 \cdot 10^6$  cells/ml). Cell aggregates were broken mechanically and cells were labeled 20 minutes in a specific solution (0,1% NP40, 0,1mg/ml RNase A, 50 $\mu$ g/ml Propidium Iodide (Sigma)). Cells were rinsed in PBS and analyze performed with FACScan equipped with CellQuest Pro software (Becton Dickinson).

### **Molecular Biology**

RNA was isolated from dermal fibroblasts using the High Pure RNA tissue kit (Roche). Reverse transcription of mRNA was performed with the SuperScript First-Strand synthesis system (Invitrogen). Polymerase Chain Reaction was done using the Taq Polymerase (Promega). Products were separated on a 1.5% agarose gel and pictures were analyzed with the ImageJ software (NIH). Primers used: cActin sense: AGACCTTCAACACCCAGC; cActin antisense: TGATTTTCATTGTGCTAGG; cEIIIA sense: ATGGTACAGCGTCTATGCTCA; cEIIIA antisense: AGACTGGTAGGAGTTACCTGA. Primers for chick Actin were designed across and intron to discriminate between genomic and complementary DNA (926pb vs 619pb).

### ***In situ* hybridization**

The chick *EIIIA* probe was cloned via PCR into the pGEM-T Easy vectors (Promega, France) (based on its published sequence, (Norton and Hynes, 1987)). The chick *BMP-2* and

*BMP-7* probe were a gift from Dr. A-H. Monsoro-Burq (Monsoro-Burq et al., 1996; Wang et al., 1999). The chick *Follistatin* probe was a gift from Dr. A. Graham (Graham and Lumsden, 1996). The chick *Id-1*, *Id-3* and *Id-4* probes were a gift from Dr. M. Bronner-Fraser (Kee and Bronner-Fraser, 2001). Alkaline phosphatase-labelled *in situ* hybridizations were carried out as previously described (Wilkinson and Nieto, 1993).

### **Numerical simulations**

The simulations of the model were carried out using the numerical approximation of the finite element method. The calculations were made using the software COMSOL Multiphysics 3.2 ©.



## **Aknowledgments**

The authors thank Dr. D. J. Pearton and E. Collomb for helpful comments and critical reading of the manuscript, Mrs B. Peyrusse for the iconography. N. T. Chartier for the FACS experiments and analyzes. F. Michon was the recipient of a doctoral fellowship from the French Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Joseph Fourier University and by the Institut National de la Recherche Medicale (INSERM).

## Figure Legends

### Figure 1. *BMP-7* was expressed before *BMP-2* and *Follistatin*

The left and right femoral tract of the same HH30 embryo were compared, the numbers correspond to the order of appearance of rows. The second row (R2) had only two feather primordia expressing *BMP-2* (A), whereas five expressed *BMP-7* (B). The additional primordia are noted with red and corresponding ones with black arrows. The distal border (yellow arrow), which preceded the appearance of R3, delimited the femoral and zeugopodial tracts and already expressed *BMP-7* (B) but not *BMP-2* (A). In another embryo, R4 was expressing *BMP-2* on the left side (C) while *Follistatin* was expressed only in three rows on the right femoral tract (D). Note that there was a continuous line, contiguous to R3, which was the distal border of the tract, which expressed *Follistatin* and not *BMP-2*.

*In situ* hybridization with RNA probes.

Bars: A-D: 1000 $\mu$ m.

### Figure 2. Comparative effects of *BMP-2* and *BMP-7* on dermal fibroblasts 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 $\mu$ m pore membrane. Two types of controls were performed: two of basic media (+/- FBS), and two with or without FGF-2. The first control allowed a normalization of the cell migration measurement (50.1% and 100%); the second, the validation of the chemotaxic effect with FGF-2 (60.8% and 110.9%). *BMP-7* had a chemoattractive effect (70.1% and 122.3%). Perturbation of fibroblast migration was clearly shown with *BMP-2* (38.1% and 81.6%). The chemoattractive effect of *BMP-7* decreased with the addition of *BMP-2* (51.2% and 98.2%).

The migration was evaluated in triplicate by a fluorescent method. The Student's t-test has a relevance of  $p < 0.05$ .

BMP-2 and BMP-7: 0.5 $\mu$ g/ml; FGF-2: 0.33 $\mu$ g/ml.

**Figure 3. The Fibronectin exon EIIIA was implicated in the migration that led to dermal condensation formation**

(A-B) Chick embryo dorsal skin. At HH29+, *EIIIA* was expressed in the periphery (red arrow) of the first feather primordia (and excluded from their center), as well as in two ribbons on either side of the first row of primordia (black arrows) (A). At HH30, the *EIIIA* transcripts were expressed in the periphery of feather primordia and in two ribbons (black arrows) on either side of feather rows, but there was a slightly decrease of its expression in the interfollicular domain in the three first rows (red arrow) (B). (C-D) *BMP-2* and *EIIIA* expression in the left and right femoral tract of the same HH30 embryo. Five feather primordia of the fourth row (R4) expressed *BMP-2* (C), while only two primordia showed *EIIIA* expression in the corresponding right row (D). The additional primordia were noted with red arrows and corresponding ones with black arrows. The R3, expressing the *EIIIA* has started to form close to the distal border continuous line. (E-F) *EIIIA* expression in cultured dermal fibroblasts. Cells were cultured in hanging drops for 24, 48 or 72 hours. RT-PCR for *Actin*, total *Fibronectin* and *EIIIA* exon were performed. There is a small decrease in *Fibronectin* expression between  $t_0$  (100%) and  $t_{48}$  (92.8%), And, a significant decrease at  $t_{72}$  (64.1%). In the same time, the portion of *Fibronectin* containing the *EIIIA* exon decreased (from 59.4% to 24.3%) (E). Cells were placed in adherent culture with or without BMP-2 for 29 hours. RT-PCR to detect *EIIIA* expression was performed. The *EIIIA* expression was lost after 12 hours of culture with BMP-2 (F).

A-E: *In situ* hybridization with RNA probes.

BMP-2: 0.5 $\mu$ g/ml.

Bars: A-B: 800 $\mu$ m; C-D: 1000 $\mu$ m.

#### **Figure 4. Sequential appearance and patterning of spots with mathematical simulation**

The resolution of the mathematical model led to the formation of a primary migrating cell midline (**A**). The redistribution of these cells, via chemotaxis, led to the formation of spots, while laterally new cells started to migrate (**B**). The lateral expansion of the pattern was due to migrating cells under chemoattractive and arresting factors (**C**). At the end of the simulation, the hexagonal pattern occurred all over the modeled domain (**D**).

#### **Figure 5. Dermal cell density involvement in apteria, semi-apteria and pterylae differentiation**

(**A-D**) The progressive decrease of the cell density correlated with the formation of an apterium from a pteryla, the latter being characterized by a regular pattern (**A**). The decrease from  $q=0.2$  (**B**) and  $q=0.12$  (**C**) led to a less dense and irregular pattern as in semi-apteria. Note that the switch from spot formation to a glabrous region (**D**) implicated only a small difference in cell density ( $q=0.12$  versus  $q=0.11$ ).

#### **Figure 6. Effects of BMP-7 and BMP-2 application *in vivo* can be obtained by mathematical simulation**

The control organotypic culture of a HH29 dorsal skin piece with a PBS bead (asterisk) led to a regular feather patterning (**A**). A similar pattern was obtained with our mathematical model (**B**). The local application of a BMP-7 via a coated bead led to a decrease in cell density around the bead, preventing dermal condensation formation, whereas the pattern resumed outside (**C**). Simulation of a local pulse of activator in the model led to the formation of a large spot of cells due to chemotaxis, surrounded with a ring of inhibition. (**D**). (**E-F**) Homogeneous application of BMP-2 in the culture medium led to a total inhibition of

primordium formation (**E**). Simulation of a global pulse of BMP-2 led to the absence of spot formation (**F**).

BMP-7: 333 $\mu$ g/ml (n=7/9); BMP-2: 500 $\mu$ g/ml (n=9/9).

Bars: 500 $\mu$ m.

### **Figure 7. Model of dermal condensation formation in dorsal chick embryo skin**

The chronological events from dense dermis to stabilized dermal condensation require a molecular dialogue inter- and intra- tissular in the skin (see the text). Note that the placodes are larger and earlier than the dermal condensations (Dhouailly, 1984).

## References

- Bardot, B., Lecoin, L., Fliniaux, I., Huillard, E., Marx, M., and Viallet, J. P. (2004). Dm/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. (1991). Position-specific expression of homeoprotein gradients in different feather tracts. *Ann N Y Acad Sci* *642*, 462-464.
- 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*, R.G. Landes Company edn (Austin).
- Chuong, C. M. (2000). Skin morphogenesis. Embryonic chicken skin explant cultures. *Methods Mol Biol* *136*, 101-106.
- Chuong, C. M., Widelitz, R. B., Ting-Berreth, 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*, L. Robert, ed. (Creteil), pp. 85-91.
- Dhouailly, D. (1984). Specification of feather and scale patterns. In *Pattern formation*, G. Malacinski, and S. Bryant, eds. (Macmillan Publishing), pp. 581-601.
- Fliniaux, I., Viallet, J. P., and Dhouailly, D. (2004). Signaling dynamics of feather tract formation from the chick somatopleure. *Development* *131*, 3955-3966.
- Giehl, K., Imamichi, Y., and Menke, A. (2007). Smad4-independent TGF-beta signaling in tumor cell migration. *Cells Tissues Organs* *185*, 123-130.
- Gierer, A., and Meinhardt, H. (1972). A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* *12*, 30-39.
- Graham, A., and Lumsden, A. (1996). Interactions between rhombomeres modulate Krox-20 and follistatin expression in the chick embryo hindbrain. *Development* *122*, 473-480.
- 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.
- Houghton, L., Lindon, C., and Morgan, B. A. (2005). The ectodysplasin pathway in feather tract development. *Development* *132*, 863-872.
- 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.
- Lallemant, 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., Oh-e, 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.
- 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.
- 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., 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.
- Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2002). Id: a target of BMP signaling. *Sci STKE* *2002*, PE40.
- Monsoro-Burq, A. H., Duprez, D., Watanabe, Y., Bontoux, M., Vincent, C., Brickell, P., and Le Douarin, N. (1996). The role of bone morphogenetic proteins in vertebral development. *Development* *122*, 3607-3616.
- 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. (1998). BMPs mediate lateral inhibition at successive stages in feather tract development. *Development* *125*, 3775-3787.

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 U S A* 90, 9219-9222.

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.

Olivera-Martinez, I., Thelu, J., and Dhouailly, D. (2004). Molecular mechanisms controlling dorsal dermis generation from the somitic dermomyotome. *Int J Dev Biol* 48, 93-101.

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.

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 U S A* 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., Prots, 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. (1975). Feather pattern development. *Ciba Found Symp* 0, 51-70.

Sengel, P. (1976). *Morphogenesis of Skin*, Vol 3, Cambridge University Press edn (Cambridge).

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.

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., Nohno, 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 II*, 37-72.
- Viallet, J. P., Prin, F., Olivera-Martinez, I., Hirsinger, E., Pourquie, O., and Dhouailly, D. (1998). Chick Delta-1 gene expression and the formation of the feather primordia. *Mech Dev* 72, 159-168.
- Wang, W. P., Widelitz, R. B., Jiang, T. X., and Chuong, C. M. (1999). Msx-2 and the regulation of organ size: epidermal thickness and hair length. *J Invest Dermatol Symp Proc* 4, 278-281.
- 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. *Methods Enzymol* 225, 361-373.
- Zhang, L., Deng, M., Parthasarathy, R., Wang, L., Mongan, M., Molkentin, J. D., Zheng, Y., and Xia, Y. (2005). MEKK1 transduces activin signals in keratinocytes to induce actin stress fiber formation and migration. *Mol Cell Biol* 25, 60-65.

Figure 1. Michon et al.

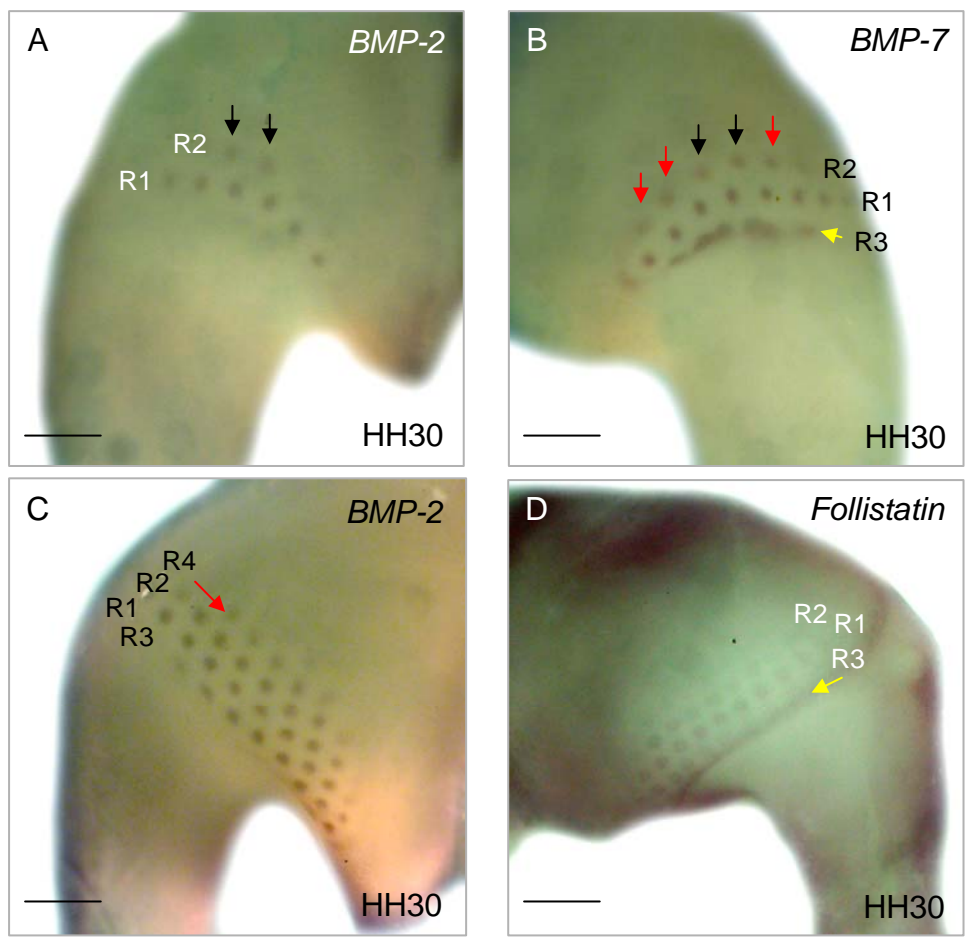


Figure 2. Michon et al.

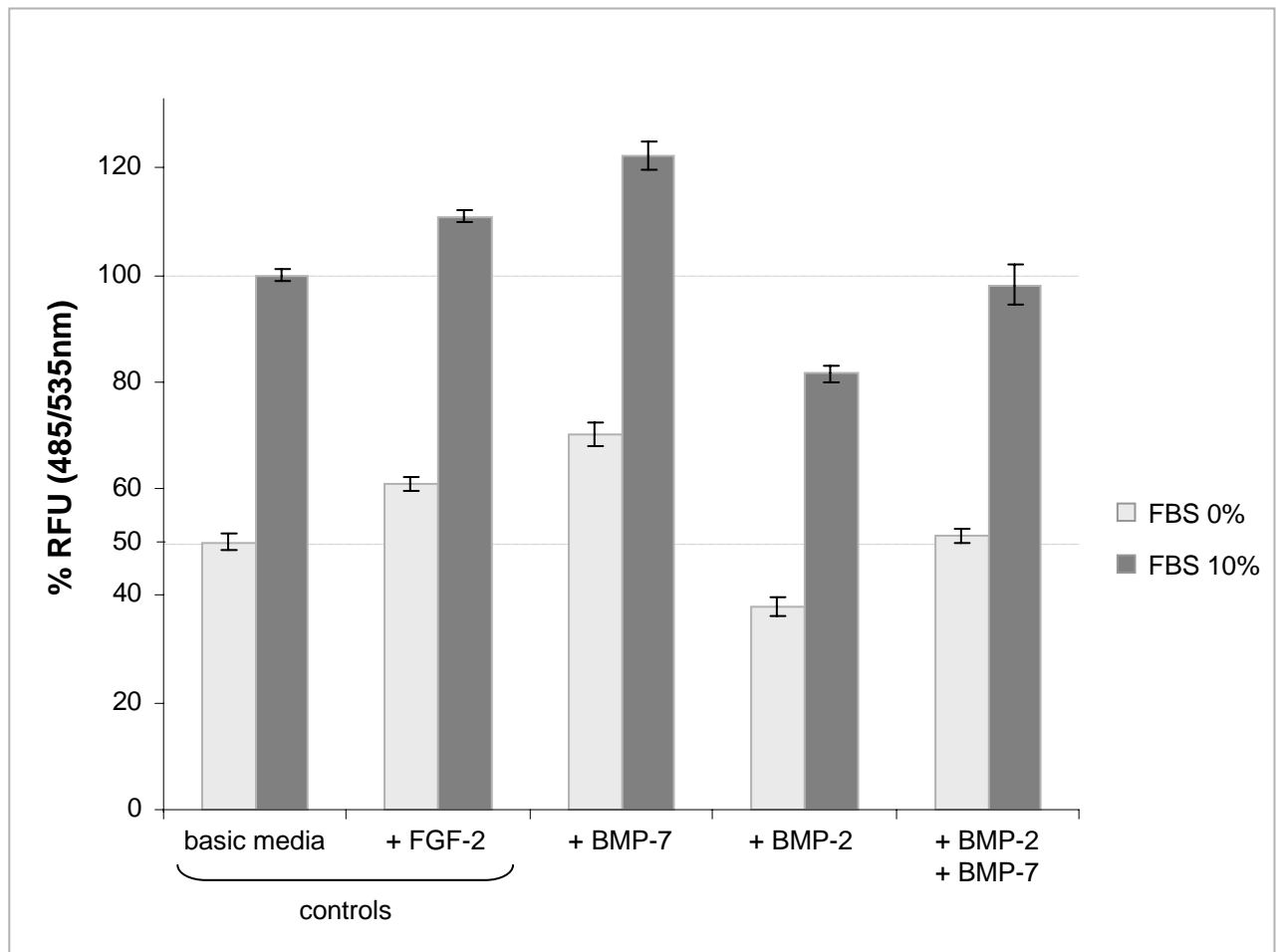


Figure 3. Michon et al.

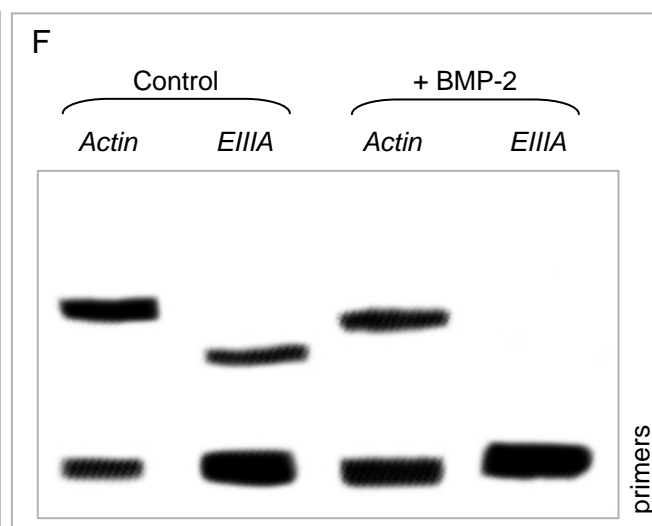
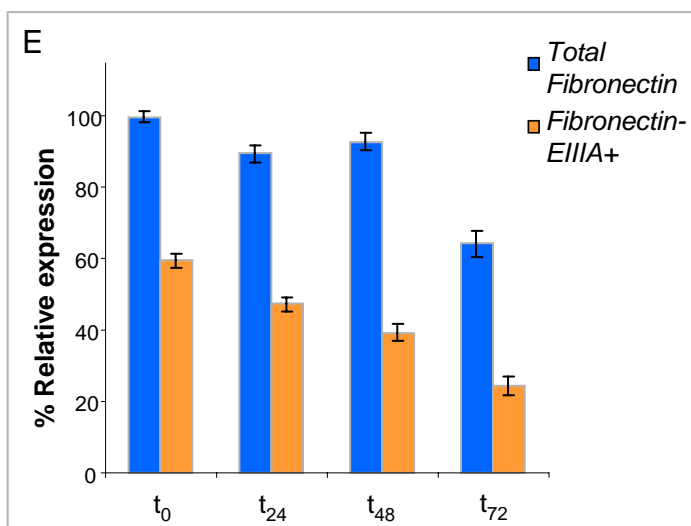
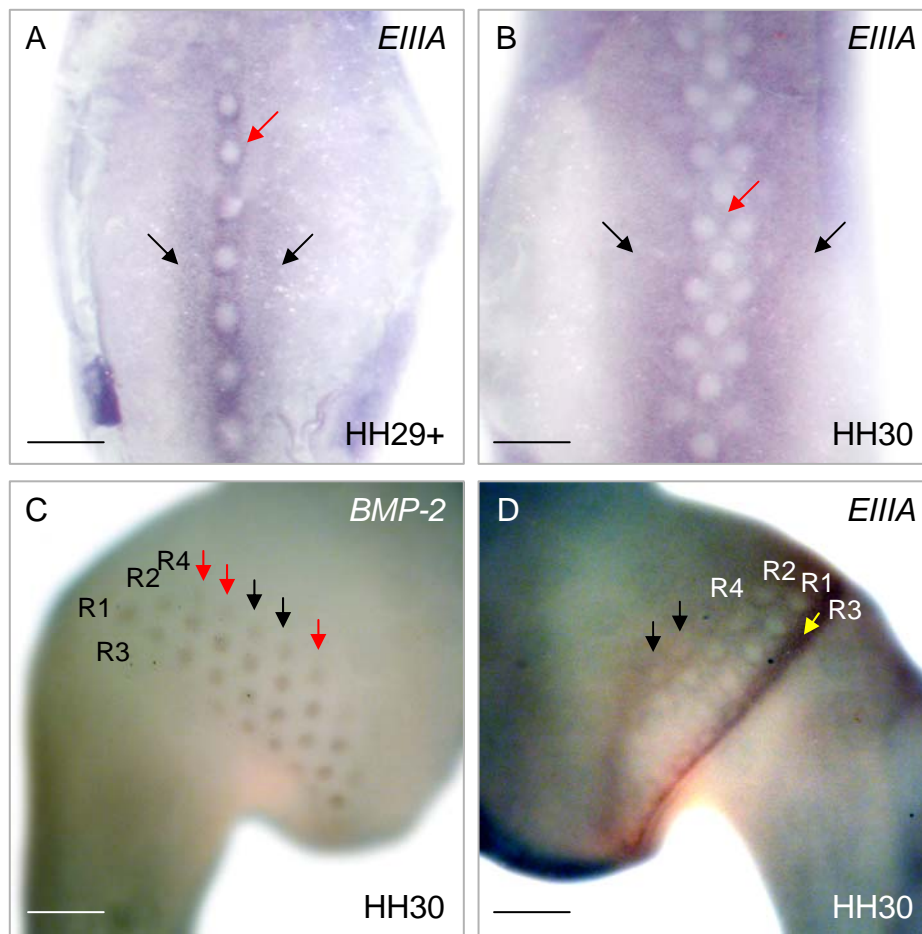


Figure 4. Michon et al.

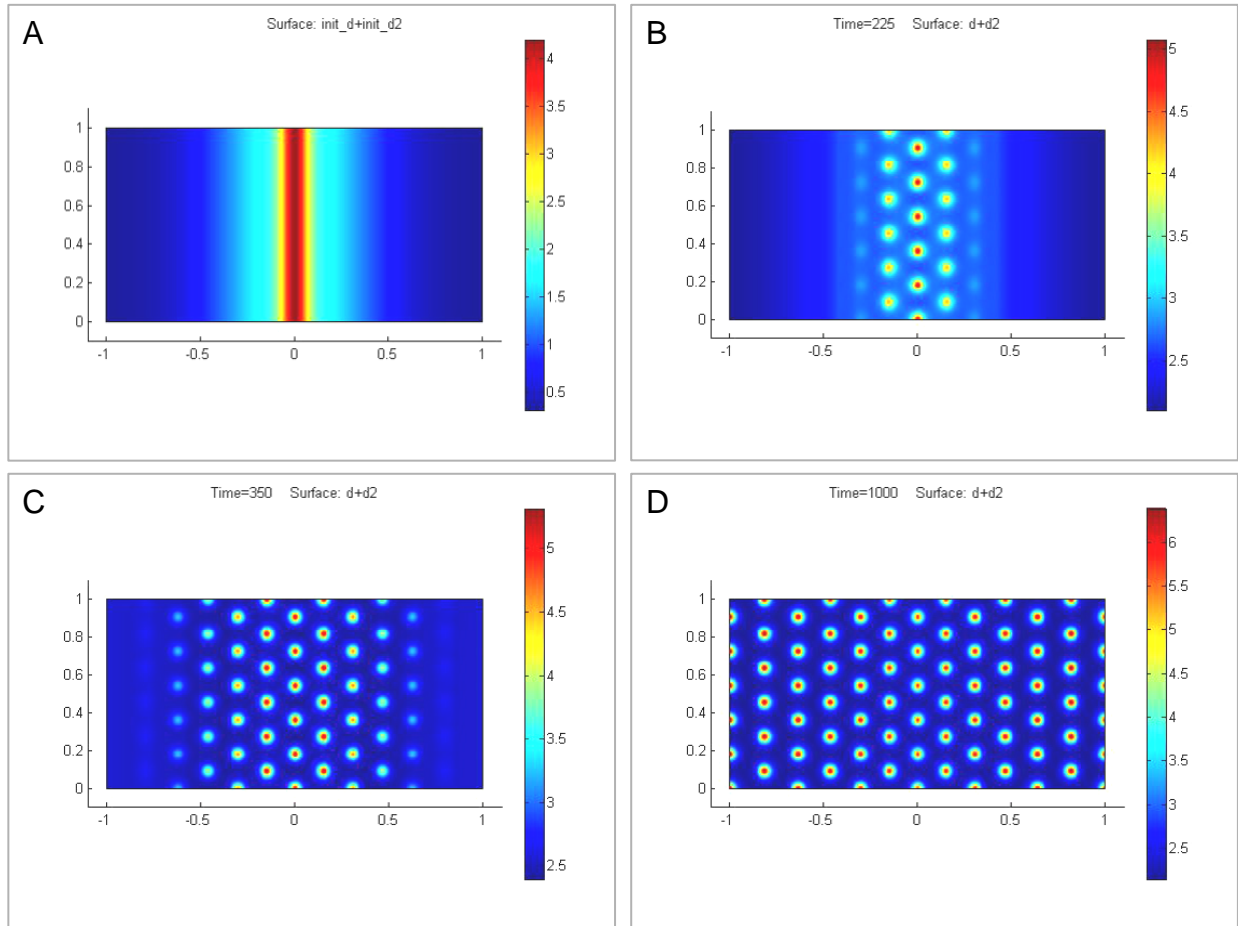


Figure 5. Michon et al.

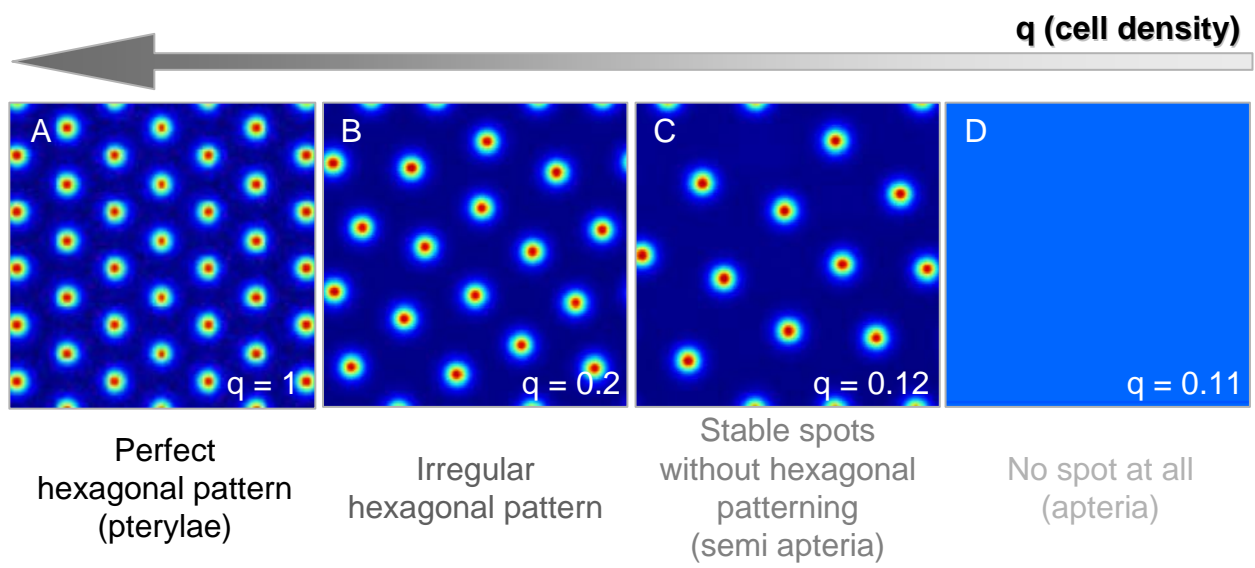


Figure 6. Michon et al.

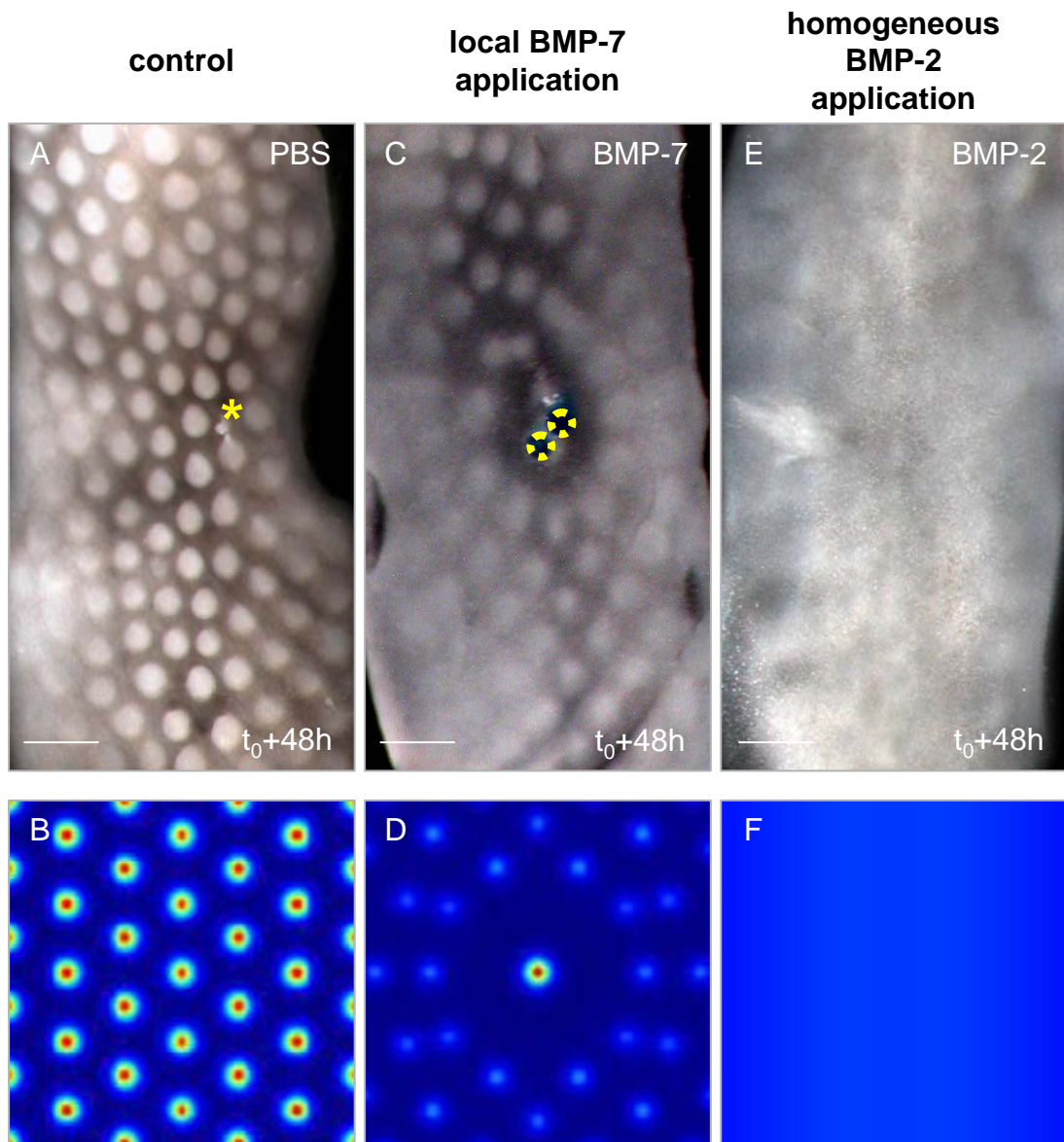


Figure 7. Michon et al.

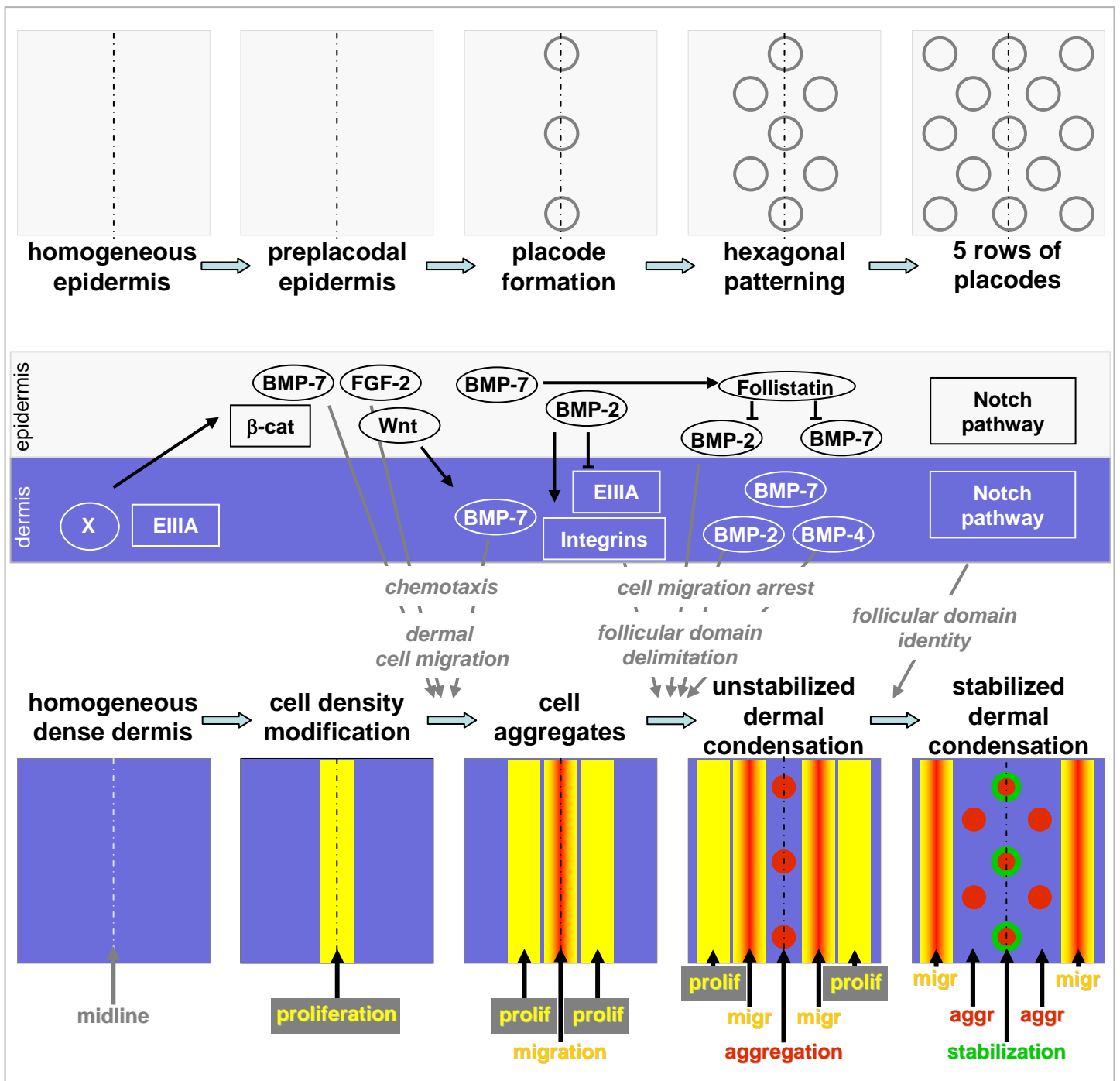




Figure S1. Michon et al.

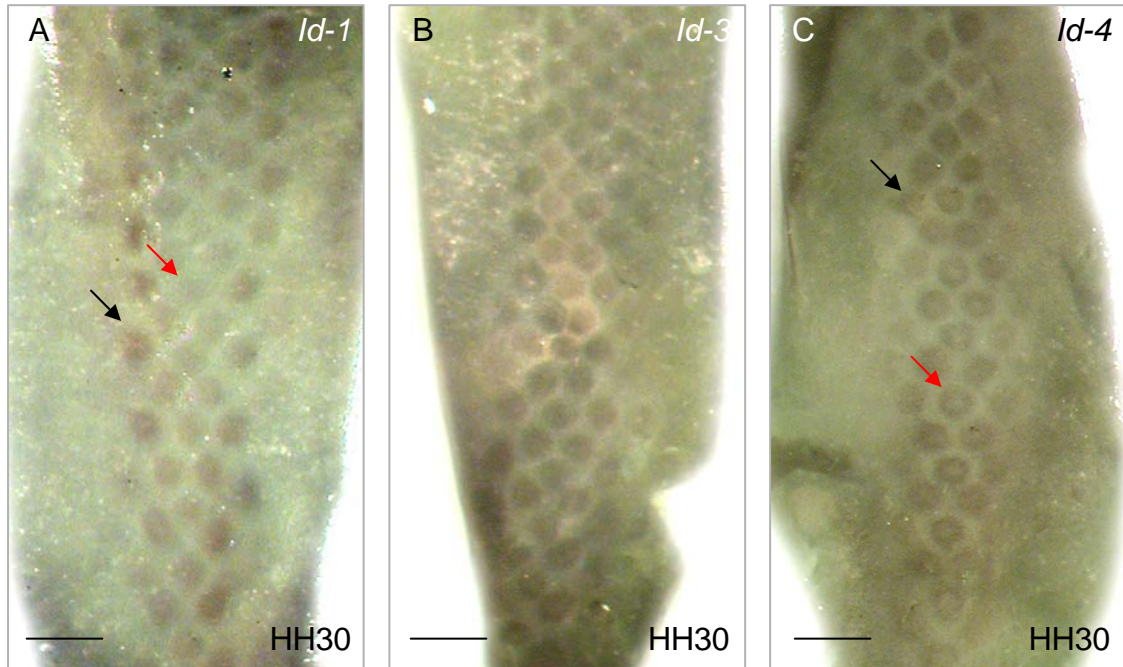
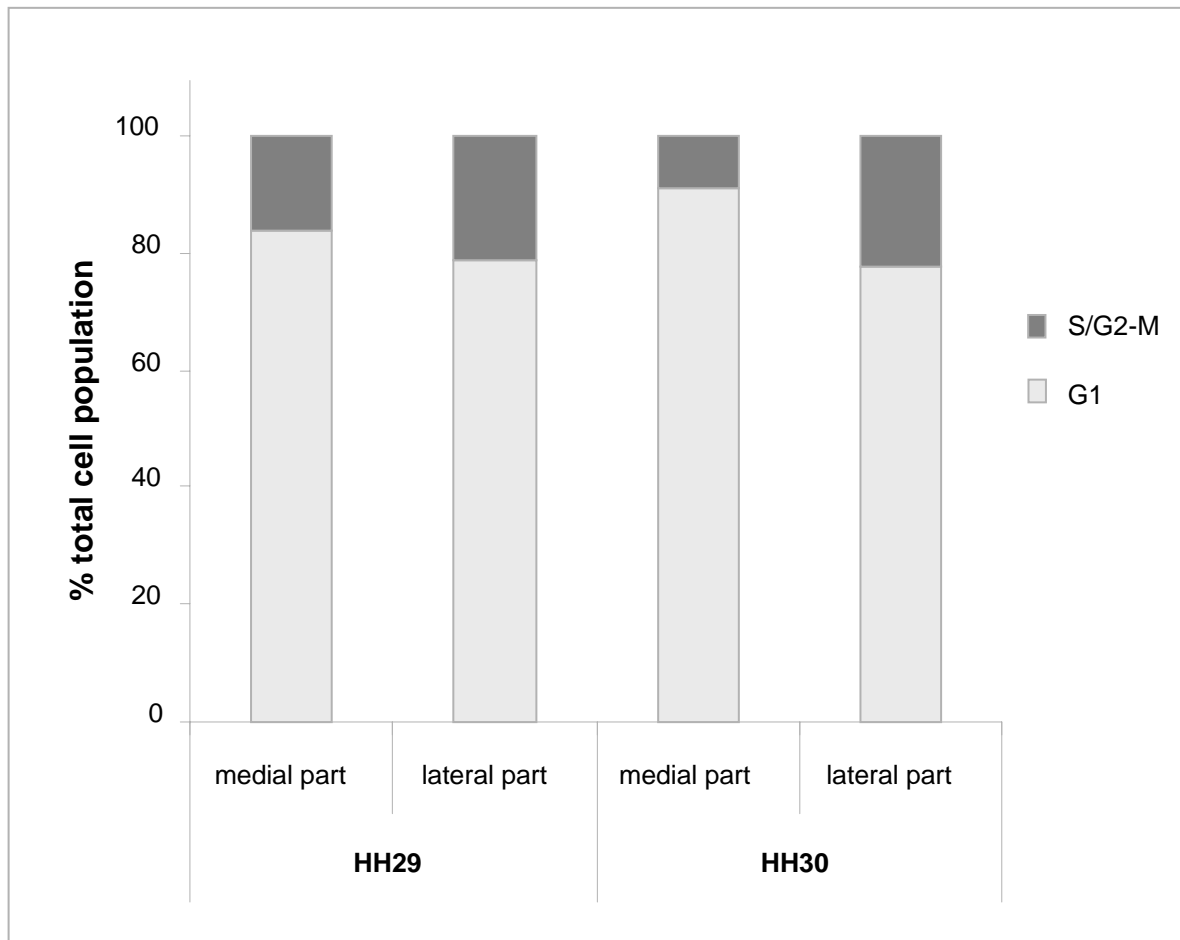


Figure S2. Michon et al.



## Supplemental Data

# BMP-2 and BMP-7 play separate, antagonistic roles in feather induction

Frederic Michon, Loic Forest, Jacques Demongeot and Danielle Dhouailly

### Extended mathematical model formulation

We have built a mathematical model, not only based on the activation/diffusion system, but taking into account the cell proliferation and the cell migration directed by chemotaxis as well as the amount of activators factors. The initial situation was 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  $\Omega$ .  $n_1(x,y,t)$  represents the concentration of dermal cycling cells at point  $(x,y) \in \Omega$  and at time  $t$ .  $n_2(x,y,t)$  denotes the concentration of dermal migrant cells.  $u$  and  $v$  represent the concentration and cellular effect of BMP-7 and BMP-2.

The dermal cell population, which concentration is noted  $n$  ( $n = n_1 + n_2$ ), is then divided into two subpopulations  $n_1$  and  $n_2$  cells. When not precised, in the following, “cell density” is for “total dermal cell population concentration” i.e.  $n$ .

$n_1$  cells proliferate until they reach a threshold  $n^*$ . The proliferation period is modeled by a logistic growth where  $k_p$  is a proliferation constant and  $N$  is the maximal cell concentration. After the concentration overcomes the threshold,  $n_1$  cells progressively stop proliferating and become able to migrate.  $n_2$  is the population of migrant cells. This transition is determined by a “differentiation” constant  $k_d$ . Equations for  $n_1$  are then described by:

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

The initial distribution of  $n_1$  is given by  $n_{1,0}$ :  $n_1(x, y, 0) = n_{1,0}(x, y)$ .

$t^*(x, y)$  is the time when the threshold is reached (i.e.  $n_1(x, y, t^*(x, y)) = n^*$ ) at point  $(x, y)$ .

$n^*$  is determined as a fraction  $Q$  of the maximal cell concentration  $N$  that is  $n^* = QN$ .

The analytic solution of (1) is :

$$n_1(x, y, t) = \frac{Nn_{1,0}(x, y)e^{Nk_d t}}{N + n_{1,0}(x, y)(e^{Nk_d t} - 1)} \text{ for } t \leq t^*(x, y) \text{ and then } n_1(x, y, t) = n^* e^{k_d(t^*-t)}.$$

$$t^*(x, y) \text{ is given by : } t^*(x, y) = \frac{1}{Nk_d} \ln \left( \frac{Q(N - n_{1,0}(x, y))}{n_{1,0}(x, y)(1 - Q)} \right).$$

For migrant cells  $n_2$  the migration flux is modeled by a diffusive part with constant  $D_n$  and a chemotactic part with a constant  $\chi$ . The chemoattractant is  $u$ .

$$\frac{\partial n_2}{\partial t} = D_n \Delta n_2 - \nabla \cdot (\chi n_2 \nabla u) + f(n_1, t) \quad (2)$$

$$f \text{ is the production term of cell } n_2 : f(n_1, t) = \begin{cases} 0 & \text{if } t \leq t^* \\ k_d n_1 & \text{else} \end{cases}.$$

The previous analytical treatment of equation (1) allows describing  $f$  as delayed production

$$\text{term: } f(n_1, t) = \begin{cases} 0 & \text{if } t \leq t^* \\ k_d n^* e^{k_d(t^*-t)} & \text{else} \end{cases} \text{ and not have to integrate } n_1 \text{ cells dynamics in the}$$

numerical treatment of the model.  $n_{2,0}$  is the initial concentration of  $n_2$  cells. This initial condition is taken so as to start with migrant cells preferentially located along a central line.

$u$  and  $v$  are given by reaction-diffusion equations.  $D_u$  and  $D_v$  denotes the respective diffusion constant. Reaction terms are made of a linear degradation part (with constants  $k_u$  and  $k_v$ ) and a production part. The production part for each chemical is 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 :

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

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

$u$  plays an activator role and  $v$  is an inhibitor.  $c_1, c_2, c_3$  and  $c_4$  are positive constants.

Production terms state that:

- *BMP-7* expression is reinforced by “spots” (dermal condensations) microenvironment.
- *BMP-7* chemotaxis effect is inhibited by *BMP-2*.
- *BMP-2* is expressed by *BMP-7* expressing cells.

Initial conditions for  $u$  and  $v$  are given by  $u_0$  and  $v_0$  generally taken equal to 0.

The model is then completely described by equations (2), (3) and (4) with the initial conditions and no flux boundary conditions for all variables. Initial conditions for  $n_i$  are also required for the calculation of  $t^*(x, y)$ .

### Numerical simulations data

Simulations were all run using  $\Omega = ]-1,1[ \times ]0,1[$  and the following parameters:  $\chi = 8 \cdot 10^{-5}$ ,  $k_p = 6 \cdot 10^{-3}$ ,  $k_d = 5 \cdot 10^{-3}$ ,  $N = 2.6$ ,  $Q = 0.95$ ,  $D_n \approx 7 \cdot 10^{-5}$ ,  $D_u \approx 0.006$ ,  $D_v \approx 0.135$ ,  $k_u = 15$ ,  $k_v = 35$ ,  $c_1 = 100$ ,  $c_2 = 40$ ,  $c_3 = 6$ ,  $c_4 = 4500$ .

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 the *BMP-7* or *BMP-2*. For the local pulse of *BMP-7* experiment, equation (3)

becomes equation (3)': 
$$\frac{\partial u}{\partial t} = D_u \Delta u + \frac{c_1 n_2 (1 + c_2 u^2)}{(c_3 + u^2)(1 + v)} - k_u u + p_u \quad \text{where}$$

$p_u(x, y) = 25 \exp\left(-500\left(x^2 + (y - 0.5)^2\right)\right)$ . This expression of the additional term allows

specifying a sharp pulse located in the centre of the domain. For the global pulse of BMP-2 we used the new term:  $p_v = 1000$  and equation (4) becomes equation (4)':

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

To investigate the impact of cell density on the pattern, we run the model from initial situations where  $n_2$  cells are homogeneously distributed in the domain with a density  $q$ . The homogeneous repartitions are affected by small random fluctuations.  $n_1$  cells are not modeled and  $u_0$  and  $v_0$  are taken equal to 0. Patterns are observed at the same time  $t=1000$ .

## Supplemental Figure Legends

### Figure S1. BMP target genes *Id-1*, *Id-3* and *Id-4* expression in chick embryo dorsal skin

(A) *Id-1* expression was detected in the primordia; there was a decrease of its expression from the new formed primordia (black arrow) to the older ones (red arrow). (B) *Id-3* transcripts were also detected in the primordia domain. (C) *Id-4* expression exhibited an early expression on the entire primordia domain (black arrow), and a later expression restricted to a peripheral ring on this domain (red arrow).

*In situ* hybridization with RNA probes.

Bars: A-C: 800 $\mu$ m.

### Figure S2. Dermal cell proliferation before and during the dermal condensation formation

The DNA quantification of dermal cells was performed by flow cytometry on HH29 and HH30 cells isolated from medial or lateral part. In HH29 skin, 83.7% of cells from the medial part were in G1 phase, whereas 78.9% of cells from the lateral part were in G1 phase. The difference was even clearer in HH30 skin, where only 77.5% of cells from the lateral part were in G1 while there were 90.9% of G1 cells in the medial part.

## **Supplemental Movie Legends**

### **Movie S1. Chick embryo dorsal skin pattern formation (2D)**

This movie presented the formation of the hexagonal skin patterning resulting of the numerical resolution of the mathematical model in two dimensions. Cell density was represented in false colors.

### **Movie S2. Chick embryo dorsal skin pattern formation (3D)**

The movie presented the formation of the hexagonal skin patterning resulting of the numerical resolution of the mathematical model in three dimensions. Cell density was represented in false colors.

### **Movie S3. Peripheral inhibition led by an excess of activator effect (2D)**

The movie presented the formation of the skin patterning with a local pulse of activator resulting of the numerical resolution of the mathematical model in two dimensions. The peripheral inhibition, due to a massive cell migration under the pulse, led to a reorganization of the hexagonal pattern. Cell density was represented in false colors.

### **Movie S4. Peripheral inhibition led by an excess of activator effect (3D)**

The movie presented the formation of the skin patterning with a local pulse of activator resulting of the numerical resolution of the mathematical model in three dimensions. The peripheral inhibition, due to a massive cell migration under the pulse, led to a reorganization of the hexagonal pattern. Cell density was represented in false colors.

### **Movie S5. Homogeneous inhibitory effect led by an excess of inhibitor factor (2D)**

The movie presented the inhibition of the formation of the skin patterning with a homogeneous pulse of inhibitor resulting of the numerical resolution of the mathematical model in two dimensions. The absence of cell migration blocked the spots formation. Cell density was represented in false colors.

### **Movie S6. Homogeneous inhibitory effect led by an excess of inhibitor factor (3D)**



The movie presented the inhibition of the formation of the skin patterning with a homogeneous pulse of inhibitor resulting of the numerical resolution of the mathematical model in three dimensions. The absence of cell migration blocked the spots formation. Cell density was represented in false colors.

## Supplemental Table

**Table S1: Parameters for the mathematical model**

<b>parameters</b>	<b>values</b>	
N	2.6	
Q	0.95	
Du	0.00625	
Dv	0.13333	
Dn	0.00007	
$X$	0.00008	
ku	15	
kv	35	
kp	0.006	
kd	0.005	
c1	100	
c2	40	
c3	6	
c4	4500	
<b>functions</b>	<b>expressions</b>	
n1,0(x)	$0.25+1.7*\exp(-(x)^2*5)+0.2*\exp(-(x)^2*200)$	<b>sequential formation</b>
n2,0(x)	$0.05+2*\exp(-(x)^2*200)$	<b>sequential formation</b>
n1,0(x)	0	<b>impact of cell initial density</b>
n2,0(x,y)	q+fluctuations	<b>impact of cell initial density</b>
pu(x)	$25*\exp(-(x^2+(y-0.5)^2)*5000)$	<b>local pulse of activator</b>
pv	1000	<b>homogeneous pulse of inhibitor</b>

## **Supplemental Table Legend**

### **Table S1: Parameters for the mathematical model**

In this table were presented various constants and parameters used in the numerical resolution of the mathematical model.

*Publication III*

### 3. Publication n°3

## Notch and p21<sup>WAF1/CIP1</sup> involvement during dermal condensation formation and stabilization

Frederic Michon, Loïc Forest, Jacques Demongeot and Danielle Dhouailly

Manuscript in preparation

#### Abstract

During chick embryonic development, feathers appear first as primordia consisting of an epidermal placode associated with a dermal condensation. The proliferation in the dense dermis ended in the forming dermal condensation, but the mechanism of this arrest has never been resolved. Here we show that the expression of the p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein, which blocks the G1/S transition, is involved in the arrest of the proliferation in the dermal condensation domain. The Notch signaling involved in the latest steps of the primordium formation for the appearance of boundaries between the follicular and inter-follicular domains. Here we show that *Notch-1*, *-2*, *Delta-1* and *Serrate-2* are expressed after *BMP-2* and this signaling is upstream of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression. The inhibition of the Notch signaling leads to an impaired of this expression by the dermal fibroblast. We have compiled these results to an extended version of our previous mathematical model for a better understanding of the dermal condensation formation.

## *Conclusion Générale*

## CONCLUSION GENERALE

Mes travaux avaient pour but de déterminer les étapes et les facteurs impliqués lors de la mise en place de la condensation dermique du primordium de phanère au sein d'une peau dorsale homogène d'embryon de poulet. Je me suis attaché à étudier l'implication de phénomènes cellulaires tels que la prolifération, la migration et la différenciation au cours de cette morphogénèse. J'ai établi une collaboration avec un mathématicien, Loïc Forest, pour élaborer un nouveau modèle mathématique prenant en compte ces différents éléments.

### I. Mise en place de la condensation dermique

Les étapes nécessaires à la transition entre une peau homogène et une peau composée des domaines folliculaire et interfolliculaire impliquent une organisation du derme dense. Le motif hexagonal obtenu chez l'embryon de poulet correspond à la meilleure occupation possible de l'espace (Turing, 1952). Lorsque par prolifération la densité cellulaire dermique dépasse  $2,6 \text{ cellules}/1000\mu\text{m}^3$ , un message homogène dermique, sans doute un Wnt (Noramly et al., 1999) induit la formation des placodes. Les protéines FGF-2 (Song et al., 2004; Viallet et al., 1998) et BMP-7 {Harris, 2004 #266}, émises par la placode, exercent un rôle de chémo-attraction pour les fibroblastes et provoque un changement de la composition de la matrice extracellulaire (synthèse de HSPG) de la condensation dermique (Song et al., 2004). Parallèlement, dans le derme se forment de petits agrégats par suite de la migration des fibroblastes se fixant à l'aide des Intégrines (Publi. I) sur la Fibronectine contenant l'exon EIIIA (Publi. II). Les fibroblastes déjà en place sous la placode expriment BMP-7, premier BMP à être exprimé lors de la morphogénèse cutanée. Ce facteur attire les autres fibroblastes dermiques par chémo-attraction, ce qui provoque l'augmentation de taille de la condensation

dermique (Publi. II). Une fois la condensation dermique mise en place, la placode et la condensation dermique vont exprimer BMP-2 (Noramly and Morgan, 1998). Ce dernier a une action négative sur l'attraction des cellules vers le territoire de la condensation dermique. En effet, BMP-2 induit l'épissage alternatif de l'exon EIIIA de la Fibronectine, qui ne sera alors plus présent dans le territoire folliculaire (Publi. II). Cette action de limitation de la taille du primordium est renforcée par l'expression de la Follistatine par les cellules de la placode situées à sa périphérie (Patel et al., 1999), à destination des molécules de BMP diffusant dans le derme, ainsi que par l'expression dermique dans le domaine interfolliculaire de *Drm/Gremlin* (Bardot et al., 2004), autre inhibiteur de la signalisation BMP.

La présence des transcrits *Msx-1*, *Msx-2* (Chuong et al., 1996), *Id-1*, *Id-3* et *Id-4* (Publi. II) sont les reflets de l'action de la signalisation BMP dans le domaine folliculaire agissant sur la poursuite de la morphogénèse plumaire. Cette voie de signalisation qui était considérée comme inhibitrice de la formation plumaire (entre autres, (Jung et al., 1998)), est en fait nécessaire à la mise en place du primordium de phanère. Mes résultats démontrent que trois fonctions sont à individualiser : l'attraction des fibroblastes par BMP-7, le rôle d'arrêt de la migration joué par BMP-2, et enfin un troisième rôle (implication d'un, deux ou des trois BMP présents ?), qui en activant l'expression de gènes cibles intervient dans la poursuite de la morphogénèse plumaire.

La proximité des cellules dans la condensation dermique favorise la mise en œuvre de la signalisation Notch. Une des premières fonctions de cette dernière est d'induire l'expression de la protéine  $p21^{WAF1/CIP1}$  (Okuyama et al., 2004) (Publi. III), qui en bloquant la transition G1/S permet l'arrêt de la prolifération au sein de la condensation dermique. Des résultats récents du laboratoire du Pr. Thesleff (communication personnelle, M. Mikkola) concordant avec ceux que j'ai obtenu, montrent que cette protéine est effectivement surexprimée dans la condensation dermique chez la souris. La seconde fonction de la



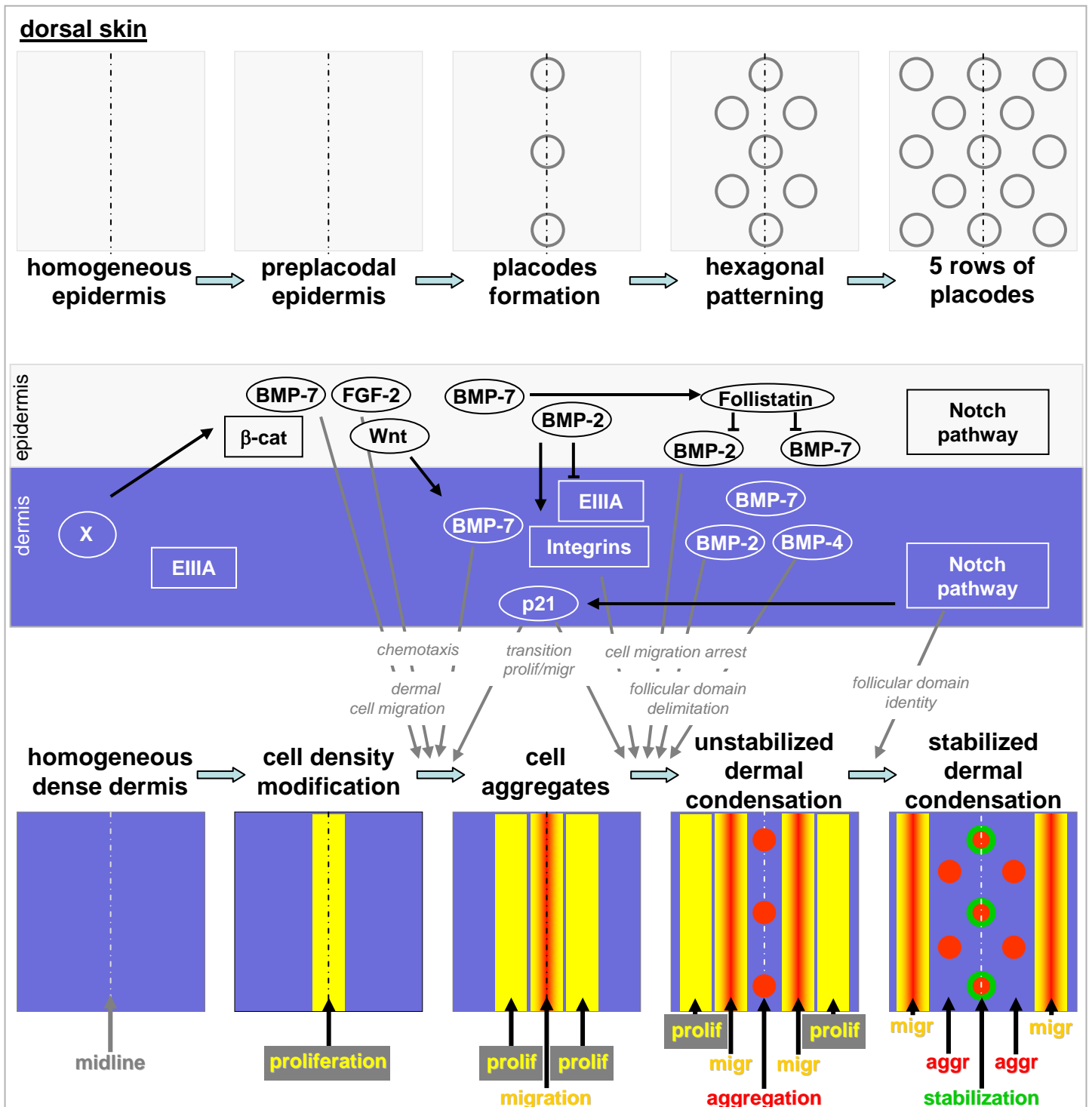
signalisation Notch sera d'induire la stabilisation de la placode et de la condensation dermique et ainsi créer la frontière entre les territoires folliculaire et interfolliculaire. Ce rôle de frontière a été montré pour la première fois chez la *Drosophile* (Panin et al., 1997). Cette stabilisation est favorisée aussi par l'engagement des Intégrines sur la Fibronectine. Celle-ci a une expression renforcée dans la condensation (Mauger et al., 1982), mais ne contient plus l'exon EIIIA (Publi. II). Ces différentes étapes menant à la formation de la condensation dermique peuvent être résumées dans un modèle théorique à quatre étapes qui seraient « prolifération-migration-agrégation-stabilisation » (**Fig. 19**). La condensation dermique est à l'origine de la papille dermique de la plume adulte et permettra son renouvellement lors de la mue. Chez les mammifères, il a été montré que condensation puis papille dermique sont investies de la capacité à induire la formation d'un phanère dans tout épithélium d'origine ectodermique, épiderme (Jahoda, 1992), cornée (Ferraris et al., 2000) ou amnios (D. Dhouailly, communication personnelle).

## II. Apports du modèle mathématique

Sur la base du modèle théorique de la formation de la condensation dermique en quatre étapes (cf. paragraphe précédent), nous avons mis au point un modèle mathématique prenant en compte les différents paramètres biologiques étudiés précédemment. Nous avons ainsi établi un modèle mathématique (Publi. II) incluant la prolifération cellulaire, la migration guidée par chémo-attraction, et aboutissant à la formation du « micropattern » hexagonal, ainsi qu'à la séquence d'apparition des primordia dans la ptéryle dorsale lombaire.

Ce modèle parvient non seulement à mimer la mise en place d'un champ plumaire, mais aussi celle d'une semi-aptérie ou d'une aptérie en fonction de la densité cellulaire dermique qui est bien différente (Olivera-Martinez et al., 2001). De plus, ce modèle a permis

d'apporter un éclairage nouveau sur les précédents résultats d'autres groupes (Jung et al., 1998; Noramly and Morgan, 1998; Patel et al., 1999) concernant la signalisation BMP. Celle-ci était jusqu'à présent considérée comme simplement inhibitrice de la formation des primordia de phanère, tant chez les oiseaux que chez les mammifères. Nous montrons que l'inhibition médiée par BMP-7 (Patel et al., 1999) provient en fait d'un excès de recrutement de fibroblastes déplaçant les zones voisines et laissant leur densité cellulaire en deçà du seuil nécessaire à la formation des primordia (Publi. II). De son côté, l'inhibition médiée par un excès de BMP-2 (Noramly and Morgan, 1998), en amplifiant le rôle de limitation de la taille de la condensation dermique, produit un blocage général de la migration des fibroblastes dermiques, empêchant ainsi l'organisation du derme (Publi. II).



**Figure 19 : Modèle intégratif de la formation de la condensation dermique en quatre étapes (prolifération/migration/agrégation/stabilisation).**

Le passage d'une peau homogène à une peau composée des domaines folliculaire et inter-folliculaire se fait en quatre étapes. La prolifération permet au derme de dépasser la densité de 2,6 cellules/1000 $\mu$ m<sup>3</sup>. Puis, l'action combinée de BMP-7 et FGF-2 induit la migration des cellules dermiques sous les placodes. Ces dernières forment des agrégats cellulaires. La transition entre prolifération et agrégation se fait grâce à l'engagement de la signalisation Notch et l'expression de p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Lors de la formation de la condensation dermique, la présence de BMP-2 et de Follistatine permet de limiter la taille de la condensation en délimitant son domaine, alors que la signalisation Notch permet la stabilisation des domaines folliculaire et inter-folliculaire.

*Perspectives*

## PERSPECTIVES

Les résultats obtenus permettent d'envisager une suite des travaux correspondant à trois thèmes.

### **I. Orchestration des différents facteurs impliqués dans la mise en place des primordia de phanère**

Deux groupes d'analyses effectuées au cours de ma thèse sont complémentaires et ouvrent la voie à une étude de la chronologie des différents facteurs étudiés. Dans un premier temps j'ai établi *in vitro* la disparition et réapparition des facteurs composant le microenvironnement du primordium, par exemple FGF-10 disparaît après BMP-2 (Publi. I). J'ai aussi montré, par la comparaison des ptéryles fémorales droite et gauche d'un même embryon, qu'*in vivo* BMP-7 était le facteur le plus précocement exprimé, parmi ceux étudiés, dans la condensation dermique, alors que les protéines du système Notch étaient les plus tardivement exprimées (Publi. II et III). L'étude systématique du moment d'expression des différents facteurs *in vivo* permettra d'établir leur orchestration. D'autre part, l'analyse de la perte, puis de la réinduction, d'expression de ces facteurs *in vitro* permettra de déterminer si la disparition et la reformation des structures du primordium en culture organotypique récapitulent à l'identique l'initiation première observée *in vivo*.

## II. Poursuite de la morphogénèse et ségrégation des cellules souches

L'expression, dans le domaine folliculaire, de Msx-1 et Msx-2, qui sont des facteurs de transcription, ainsi que certains Id, qui sont des inhibiteurs de transcription et de différenciation, reflète une régulation fine du transcriptome des cellules du primordium par la signalisation BMP. Il serait intéressant de savoir quels sont les rôles de ces deux familles de gènes lors de la morphogénèse du phanère.

Chez la souris la délétion simultanée des gènes Msx-1 et Msx-2 ne perturbe cependant pas la mise en place des primordia de vibrisses (B. Robert, communication personnelle). Concernant les gènes Id, une récente étude (O'Shaughnessy et al., 2004) suggère qu'ils pourraient avoir un rôle lors de la ségrégation des cellules souches. Le gène Id-4, particulièrement, exprimé en couronne dans le primordium (Publi. II), pourrait être impliqué dans le maintien d'un état indifférencié des futures cellules souches adultes. La signalisation BMP, quant à elle, en inhibant la signalisation Wnt canonique ( $\beta$ -caténine), intervient dans le maintien en quiescence de cellules du « bulge » (niche de cellules souches associée au poil) (Kobielak et al., 2007). La voie de signalisation Notch a été impliquée depuis presque dix ans lors de la morphogénèse cutanée (entre autres, (Favier et al., 2000; Viallet et al., 1998)). Son rôle dans l'arrêt de la prolifération, ainsi que dans la mise en place des frontières, étant admis, il serait intéressant de savoir si cette voie de signalisation joue un rôle lors de la ségrégation des cellules souches dermiques, tout comme il a été montré dans le compartiment épidermique (Blanpain et al., 2006). Les souris transgénique KO développées par le Dr. F. Radtke (Radtke et al., 1999) ont permis de décortiquer l'implication de Notch-1 dans l'homéostasie de l'épiderme, mais qu'en est-il du compartiment dermique ? Reste à déterminer l'impact de ces différents gènes sur la morphogénèse pileuse et sur le cycle pileux. L'expression d'Id-3 dans la papille dermique est nécessaire au bon déroulement du cycle

pileux, mais quel est son rôle lors de la morphogénèse cutanée ? Des travaux d'inactivation ciblée (tissus et stades spécifiques) de ces gènes permettraient de répondre à ces questions.

### **III. Améliorations du modèle mathématique**

L'établissement d'un modèle mathématique basé sur l'antagonisme des facteurs BMP-2 et BMP-7 était délicat à mettre en place, mais il répond aux différentes sollicitations et est de plus prédictif. Son avantage réside dans le faible nombre de ses paramètres. Il serait cependant intéressant de pouvoir intégrer à ce modèle d'autres voies de signalisation aux effets connus tels que Wnt-7a (Widelitz et al., 1999) et Shh (Morgan et al., 1998), afin d'induire l'orientation et la croissance de bourgeons plumaires ; ou de l'adapter à la morphogénèse d'autres champs cutanés tels que les champs fémoraux, qui ont une extension unilatérale alors que le champ plumaire lombaire a une extension bilatérale. D'autre part, ce modèle devra être confronté aux « macropatterns » spécifiques d'autres oiseaux. Par exemple, la caille possède dans la ptéryle dorsale deux lignes primitives où s'individualisent les primordia, puis une autre se met en place au milieu des deux précédentes (observations personnelles). De même, la mise en place des condensations dermiques chez les mammifères sera à étudier d'un point de vue biologique, avant de pouvoir l'adapter numériquement. Un nouveau doctorant essaie de répondre à cette dernière question au sein de notre laboratoire.

## *Bibliographie*



## BIBLIOGRAPHIE

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. and Kemler, R.** (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* **16**, 3797-804.
- 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. *J Cell Sci* **107** (Pt 12), 3655-63.
- Akimaru, H., Chen, Y., Dai, P., Hou, D. X., Nonaka, M., Smolik, S. M., Armstrong, S., Goodman, R. H. and Ishii, S.** (1997). Drosophila CBP is a co-activator of cubitus interruptus in hedgehog signalling. *Nature* **386**, 735-8.
- Akimoto, Y., Obinata, A., Endo, H. and Hirano, H.** (1992). Immunohistochemical study of basement membrane reconstruction by an epidermis-dermis recombination experiment using cultured chick embryonic skin: induction of tenascin. *J Histochem Cytochem* **40**, 1129-37.
- Amalric, F., Bouche, G., Bonnet, H., Brethenou, P., Roman, A. M., Truchet, I. and Quarto, N.** (1994). Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the nucleus: translocation process and targets. *Biochem Pharmacol* **47**, 111-5.
- Ambler, C. A. and Watt, F. M.** (2007). Expression of Notch pathway genes in mammalian epidermis and modulation by beta-Catenin. *Dev Dyn* **236**, 1595-601.
- Athar, M., Tang, X., Lee, J. L., Kopelovich, L. and Kim, A. L.** (2006). Hedgehog signalling in skin development and cancer. *Exp Dermatol* **15**, 667-77.
- Axelrod, J. D., Miller, J. R., Shulman, J. M., Moon, R. T. and Perrimon, N.** (1998). Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev* **12**, 2610-22.
- Bach, A., Lallemand, Y., Nicola, M. A., Ramos, C., Mathis, L., Maufrais, M. and Robert, B.** (2003). Msx1 is required for dorsal diencephalon patterning. *Development* **130**, 4025-36.

- Baig-Lewis, S., Peterson-Nedry, W. and Wehrli, M.** (2007). Wingless/Wnt signal transduction requires distinct initiation and amplification steps that both depend on Arrow/LRP. *Dev Biol*.
- Bard, S. and Sengel, P.** (1984). Reconstitution of the epidermal basement membrane after enzymatic dermal-epidermal separation of embryonic mouse skin. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* **73**, 239-57.
- 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**, 149-56.
- Bayes, M., Hartung, A. J., Ezer, S., Pispa, J., Thesleff, I., Srivastava, A. K. and Kere, J.** (1998). The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats. *Hum Mol Genet* **7**, 1661-9.
- Bazzi, H., Fantauzzo, K. A., Richardson, G. D., Jahoda, C. A. and Christiano, A. M.** (2007). The Wnt inhibitor, Dickkopf 4, is induced by canonical Wnt signaling during ectodermal appendage morphogenesis. *Dev Biol* **305**, 498-507.
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. and Birchmeier, W.** (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**, 638-42.
- Benazeraf, B., Chen, Q., Peco, E., Lobjois, V., Medevielle, F., Ducommun, B. and Pituello, F.** (2006). Identification of an unexpected link between the Shh pathway and a G2/M regulator, the phosphatase CDC25B. *Dev Biol* **294**, 133-47.
- Berechid, B. E., Kitzmann, M., Foltz, D. R., Roach, A. H., Seiffert, D., Thompson, L. A., Olson, R. E., Bernstein, A., Donoviel, D. B. and Nye, J. S.** (2002). Identification and characterization of presenilin-independent Notch signaling. *J Biol Chem* **277**, 8154-65.

- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., Hsieh, J. C., Wang, Y., Macke, J. P., Andrew, D., Nathans, J. and Nusse, R.** (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* **382**, 225-30.
- Binari, R. C., Staveley, B. E., Johnson, W. A., Godavarti, R., Sasisekharan, R. and Manoukian, A. S.** (1997). Genetic evidence that heparin-like glycosaminoglycans are involved in wingless signaling. *Development* **124**, 2623-32.
- Blanpain, C., Lowry, W. E., Pasolli, H. A. and Fuchs, E.** (2006). Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes Dev* **20**, 3022-35.
- Bouche, G., Baldin, V., Belenguer, P., Prats, H. and Amalric, F.** (1994). Activation of rDNA transcription by FGF-2: key role of protein kinase CKII. *Cell Mol Biol Res* **40**, 547-54.
- Bouvard, D., Molla, A. and Block, M. R.** (1998). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II controls alpha5beta1 integrin-mediated inside-out signaling. *J Cell Sci* **111** ( Pt 5), 657-65.
- Bouwmeester, T., Kim, S., Sasai, Y., Lu, B. and De Robertis, E. M.** (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* **382**, 595-601.
- Bradley, R. S. and Brown, A. M.** (1990). The proto-oncogene int-1 encodes a secreted protein associated with the extracellular matrix. *Embo J* **9**, 1569-75.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A. and Israel, A.** (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* **5**, 207-16.
- Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H. and Cohen, S.** (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* **406**, 411-5.

- Brunner, E., Peter, O., Schweizer, L. and Basler, K.** (1997). pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature* **385**, 829-33.
- Burrus, L. W., Zuber, M. E., Lueddecke, B. A. and Olwin, B. B.** (1992). Identification of a cysteine-rich receptor for fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol* **12**, 5600-9.
- Bush, K. A., Downing, B. R., Walsh, S. E. and Pins, G. D.** (2007). Conjugation of extracellular matrix proteins to basal lamina analogs enhances keratinocyte attachment. *J Biomed Mater Res A* **80**, 444-52.
- 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**, 489-95.
- Canalis, E., Economides, A. N. and Gazzerro, E.** (2003). Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* **24**, 218-35.
- Candia, A. F., Watabe, T., Hawley, S. H., Onichtchouk, D., Zhang, Y., Derynck, R., Niehrs, C. and Cho, K. W.** (1997). Cellular interpretation of multiple TGF-beta signals: intracellular antagonism between activin/BVg1 and BMP-2/4 signaling mediated by Smads. *Development* **124**, 4467-80.
- Chang, C. and Hemmati-Brivanlou, A.** (1998). Cell fate determination in embryonic ectoderm. *J Neurobiol* **36**, 128-51.
- 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. *Mech Dev* **121**, 157-71.
- Chellaiah, A. T., McEwen, D. G., Werner, S., Xu, J. and Ornitz, D. M.** (1994). Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3. Alternative splicing in immunoglobulin-like domain III creates a receptor highly specific for acidic FGF/FGF-1. *J Biol Chem* **269**, 11620-7.

- 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**, 181-7.
- Chiba, S.** (2006). Notch signaling in stem cell systems. *Stem Cells* **24**, 2437-47.
- Chuang, P. T. and McMahon, A. P.** (1999). Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* **397**, 617-21.
- Chuong, C. M.** (1998). Molecular Basis of Epithelial Appendage Morphogenesis. Austin.
- Chuong, C. M., Widelitz, R. B., Ting-Berreth, 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**, 639-46.
- Clark, E. A. and Brugge, J. S.** (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268**, 233-9.
- Cohen, B., Bashirullah, A., Dagnino, L., Campbell, C., Fisher, W. W., Leow, C. C., Whiting, E., Ryan, D., Zinyk, D., Boulianne, G. et al.** (1997). Fringe boundaries coincide with Notch-dependent patterning centres in mammals and alter Notch-dependent development in *Drosophila*. *Nat Genet* **16**, 283-8.
- 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* **103 Suppl**, 101-13.
- 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.
- 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**, 227-48.
- Cui, C. Y., Durmowicz, M., Tanaka, T. S., Hartung, A. J., Tezuka, T., Hashimoto, K., Ko, M. S., Srivastava, A. K. and Schlessinger, D.** (2002). EDA targets revealed by skin

gene expression profiles of wild-type, Tabby and Tabby EDA-A1 transgenic mice. *Hum Mol Genet* **11**, 1763-73.

**Davidson, D.** (1983a). The mechanism of feather pattern development in the chick. 1. The time of determination of feather position. *J Embryol Exp Morphol* **74**, 245-59.

**Davidson, D.** (1983b). The mechanism of feather pattern development in the chick. II. Control of the sequence of pattern formation. *J Embryol Exp Morphol* **74**, 261-73.

**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* **111**, 699-713.

**Devgan, V., Mammucari, C., Millar, S. E., Briskin, C. and Dotto, G. P.** (2005). p21WAF1/Cip1 is a negative transcriptional regulator of Wnt4 expression downstream of Notch1 activation. *Genes Dev* **19**, 1485-95.

**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. Creteil.

**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. and Sengel, P.** (1973). [Morphogenic interactions between reptilian epidermis and birds or mammalian dermis]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **277**, 1221-4.

**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**, 1007-10.

**Drew, C. F., Lin, C. M., Jiang, T. X., Blunt, G., Mou, C., Chuong, C. M. and Headon, D. J.** (2007). The Edar subfamily in feather placode formation. *Dev Biol* **305**, 232-45.

- Du, S. J., Purcell, S. M., Christian, J. L., McGrew, L. L. and Moon, R. T.** (1995). Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol* **15**, 2625-34.
- Ede, D. A.** (1972). Cell behaviour and embryonic development. *Int J Neurosci* **3**, 165-74.
- Ehebauer, M., Hayward, P. and Martinez-Arias, A.** (2006). Notch signaling pathway. *Sci STKE* **2006**, cm7.
- el-Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M., Velculescu, V. E., Canman, C. E., Jackman, J., Pietenpol, J. A., Burrell, M., Hill, D. E., Wang, Y. et al.** (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* **54**, 1169-74.
- Elomaa, O., Pulkkinen, K., Hannelius, U., Mikkola, M., Saarialho-Kere, U. and Kere, J.** (2001). Ectodysplasin is released by proteolytic shedding and binds to the EDAR protein. *Hum Mol Genet* **10**, 953-62.
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T. M. and Briscoe, J.** (1997). Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* **90**, 169-80.
- Estrach, S., Ambler, C. A., Lo Celso, C., Hozumi, K. and Watt, F. M.** (2006). Jagged 1 is a beta-catenin target gene required for ectopic hair follicle formation in adult epidermis. *Development* **133**, 4427-38.
- Fallon, J. F., Lopez, A., Ros, M. A., Savage, M. P., Olwin, B. B. and Simandl, B. K.** (1994). FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science* **264**, 104-7.
- Fan, H. and Khavari, P. A.** (1999). Sonic hedgehog opposes epithelial cell cycle arrest. *J Cell Biol* **147**, 71-6.

- 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**, 426-37.
- Fehon, R. G., Kooh, P. J., Rebay, I., Regan, C. L., Xu, T., Muskavitch, M. A. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* **61**, 523-34.
- Feng, X. H., Zhang, Y., Wu, R. Y. and Derynck, R.** (1998). The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes Dev* **12**, 2153-63.
- 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**, 5487-95.
- Ffrench-Constant, C. and Hynes, R. O.** (1989). Alternative splicing of fibronectin is temporally and spatially regulated in the chicken embryo. *Development* **106**, 375-88.
- Fleming, R. J., Gu, Y. and Hukriede, N. A.** (1997). Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the gene fringe in the dorsal compartment of the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* **124**, 2973-81.
- Fliniaux, I., Viallet, J. P. and Dhouailly, D.** (2004). Signaling dynamics of feather tract formation from the chick somatopleure. *Development* **131**, 3955-66.
- Fox, J. C. and Swain, J. L.** (1993). Auto and transactivation of FGF expression: potential mechanism for regulation of myogenic differentiation. *In Vitro Cell Dev Biol* **29A**, 228-30.
- Francis-West, P. H., Robertson, K. E., Ede, D. A., Rodriguez, C., Izpisua-Belmonte, J. C., Houston, B., Burt, D. W., Gribbin, C., Brickell, P. M. and Tickle, C.** (1995). Expression of genes encoding bone morphogenetic proteins and sonic hedgehog in talpid (ta3)



limb buds: their relationships in the signalling cascade involved in limb patterning. *Dev Dyn* **203**, 187-97.

**Francis, P. H., Richardson, M. K., Brickell, P. M. and Tickle, C.** (1994). Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development* **120**, 209-18.

**Friedman, S., Zhan, X. and Maciag, T.** (1994). Mutagenesis of the nuclear localization sequence in EGF-1 alters protein stability but not mitogenic activity. *Biochem Biophys Res Commun* **198**, 1203-8.

**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**, 605-14.

**Ghabrial, A. S. and Krasnow, M. A.** (2006). Social interactions among epithelial cells during tracheal branching morphogenesis. *Nature* **441**, 746-9.

**Gierer, A. and Meinhardt, H.** (1972). A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* **12**, 30-9.

**Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A. P., Blumenstock, C. and Niehrs, C.** (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* **391**, 357-62.

**Goetinck, P. F. and Sekelick, M. J.** (1972). Observations on collagen synthesis, lattice formation, and morphology of scaleless and normal embryonic skin. *Dev Biol* **28**, 636-48.

**Golias, C. H., Charalabopoulos, A. and Charalabopoulos, K.** (2004). Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract* **58**, 1134-41.

**Gruneberg, H.** (1965). Genes and genotypes affecting the teeth of the mouse. *J Embryol Exp Morphol* **14**, 137-59.

- Gruneberg, H.** (1971). The glandular aspects of the tabby syndrome in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* **25**, 1-19.
- Guo, N., Hawkins, C. and Nathans, J.** (2004). Frizzled6 controls hair patterning in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9277-81.
- Hacker, U., Lin, X. and Perrimon, N.** (1997). The *Drosophila* sugarless gene modulates Wingless signaling and encodes an enzyme involved in polysaccharide biosynthesis. *Development* **124**, 3565-73.
- Haddon, C., Smithers, L., Schneider-Maunoury, S., Coche, T., Henrique, D. and Lewis, J.** (1998). Multiple delta genes and lateral inhibition in zebrafish primary neurogenesis. *Development* **125**, 359-70.
- Haerry, T. E., Heslip, T. R., Marsh, J. L. and O'Connor, M. B.** (1997). Defects in glucuronate biosynthesis disrupt Wingless signaling in *Drosophila*. *Development* **124**, 3055-64.
- Hall, A.** (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-14.
- Hall, C. L., Kang, S., MacDougald, O. A. and Keller, E. T.** (2006). Role of Wnts in prostate cancer bone metastases. *J Cell Biochem* **97**, 661-72.
- Hamburger, V. and Hamilton, H. L.** (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**, 49-92.
- Harland, R. and Gerhart, J.** (1997). Formation and function of Spemann's organizer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 611-67.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S. J.** (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-16.
- 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.

- Hartfield, P. J., Greaves, M. W. and Camp, R. D.** (1993). Beta 1 integrin-mediated T cell adhesion is regulated by calcium ionophores and endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* **196**, 1183-7.
- Hayashi, K., Nakamura, S., Nishida, W. and Sobue, K.** (2006). Bone morphogenetic protein-induced MSX1 and MSX2 inhibit myocardin-dependent smooth muscle gene transcription. *Mol Cell Biol* **26**, 9456-70.
- 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**, 859-66.
- Headon, D. J., Emmal, S. A., Ferguson, B. M., Tucker, A. S., Justice, M. J., Sharpe, P. T., Zonana, J. and Overbeek, P. A.** (2001). Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development. *Nature* **414**, 913-6.
- Headon, D. J. and Overbeek, P. A.** (1999). Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction. *Nat Genet* **22**, 370-4.
- Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C. and Simpson, P.** (1996). Genes of the Enhancer of split and achaete-scute complexes are required for a regulatory loop between Notch and Delta during lateral signalling in Drosophila. *Development* **122**, 161-71.
- Hemmati-Brivanlou, A. and Melton, D. A.** (1994). Inhibition of activin receptor signaling promotes neuralization in Xenopus. *Cell* **77**, 273-81.
- Hemmati-Brivanlou, A. and Thomsen, G. H.** (1995). Ventral mesodermal patterning in Xenopus embryos: expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4. *Dev Genet* **17**, 78-89.
- Hiebert, S. W., Chellappan, S. P., Horowitz, J. M. and Nevins, J. R.** (1992). The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev* **6**, 177-85.

- Hinds, P. W., Mittnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S. I. and Weinberg, R. A.** (1992). Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* **70**, 993-1006.
- Hogan, B. L.** (1996). Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 432-8.
- 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**, 19838-45.
- Houghton, L., Lindon, C. and Morgan, B. A.** (2005). The ectodysplasin pathway in feather tract development. *Development* **132**, 863-72.
- Houzelstein, D., Cheraud, Y., Auda-Boucher, G., Fontaine-Perus, J. and Robert, B.** (2000). The expression of the homeobox gene *Msx1* reveals two populations of dermal progenitor cells originating from the somites. *Development* **127**, 2155-64.
- Hsieh, J. C., Kodjabachian, L., Rebbert, M. L., Rattner, A., Smallwood, P. M., Samos, C. H., Nusse, R., Dawid, I. B. and Nathans, J.** (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* **398**, 431-6.
- 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*. *Mol Cell Biol* **16**, 952-9.
- Hsu, D. R., Economides, A. N., Wang, X., Eimon, P. M. and Harland, R. M.** (1998). The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* **1**, 673-83.
- Hyduk, S. J., Chan, J. R., Duffy, S. T., Chen, M., Peterson, M. D., Waddell, T. K., Digby, G. C., Szaszi, K., Kapus, A. and Cybulsky, M. I.** (2007). Phospholipase C, calcium, and

calmodulin are critical for alpha4beta1 integrin affinity up-regulation and monocyte arrest triggered by chemoattractants. *Blood* **109**, 176-84.

**Hyduk, S. J. and Cybulsky, M. I.** (2002). Alpha 4 integrin signaling activates phosphatidylinositol 3-kinase and stimulates T cell adhesion to intercellular adhesion molecule-1 to a similar extent as CD3, but induces a distinct rearrangement of the actin cytoskeleton. *J Immunol* **168**, 696-704.

**Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M. and Miyazono, K.** (1997). Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* **389**, 622-6.

**Inamatsu, M., Tochio, T., Makabe, A., Endo, T., Oomizu, S., Kobayashi, E. and Yoshizato, K.** (2006). Embryonic dermal condensation and adult dermal papilla induce hair follicles in adult glabrous epidermis through different mechanisms. *Dev Growth Differ* **48**, 73-86.

**Inoue, H., Imamura, T., Ishidou, Y., Takase, M., Udagawa, Y., Oka, Y., Tsuneizumi, K., Tabata, T., Miyazono, K. and Kawabata, M.** (1998). Interplay of signal mediators of decapentaplegic (Dpp): molecular characterization of mothers against dpp, Medea, and daughters against dpp. *Mol Biol Cell* **9**, 2145-56.

**Irvine, K. D. and Wieschaus, E.** (1994). fringe, a Boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during *Drosophila* wing development. *Cell* **79**, 595-606.

**Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., Nagai, S., Nishita, M., Meneghini, M., Barker, N., Waterman, M., Bowerman, B., Clevers, H., Shibuya, H. et al.** (1999). The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature* **399**, 798-802.

- Itoh, K. and Sokol, S. Y.** (1999). Axis determination by inhibition of Wnt signaling in *Xenopus*. *Genes Dev* **13**, 2328-36.
- Jahoda, C. A.** (1992). Induction of follicle formation and hair growth by vibrissa dermal papillae implanted into rat ear wounds: vibrissa-type fibres are specified. *Development* **115**, 1103-9.
- Jamora, C., DasGupta, R., Kocieniewski, P. and Fuchs, E.** (2003). Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* **422**, 317-22.
- Janknecht, R., Wells, N. J. and Hunter, T.** (1998). TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes Dev* **12**, 2114-9.
- Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J. and Pavletich, N. P.** (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**, 313-20.
- Jiang, J. and Struhl, G.** (1996). Complementary and mutually exclusive activities of decapentaplegic and wingless organize axial patterning during *Drosophila* leg development. *Cell* **86**, 401-9.
- 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., 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**, 117-35.
- Johnson, D. E. and Williams, L. T.** (1993). Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* **60**, 1-41.
- Johnston, L. A. and Schubiger, G.** (1996). Ectopic expression of wingless in imaginal discs interferes with decapentaplegic expression and alters cell determination. *Development* **122**, 3519-29.

- Johnston, S. H., Rauskolb, C., Wilson, R., Prabhakaran, B., Irvine, K. D. and Vogt, T. F.** (1997). A family of mammalian Fringe genes implicated in boundary determination and the Notch pathway. *Development* **124**, 2245-54.
- Jones, C. and Chen, P.** (2007). Planar cell polarity signaling in vertebrates. *Bioessays* **29**, 120-32.
- Jones, R. G., Li, X., Gray, P. D., Kuang, J., Clayton, F., Samowitz, W. S., Madison, B. B., Gumucio, D. L. and Kuwada, S. K.** (2006). Conditional deletion of beta1 integrins in the intestinal epithelium causes a loss of Hedgehog expression, intestinal hyperplasia, and early postnatal lethality. *J Cell Biol* **175**, 505-14.
- 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.
- Kadowaki, T., Wilder, E., Klingensmith, J., Zachary, K. and Perrimon, N.** (1996). The segment polarity gene porcupine encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing. *Genes Dev* **10**, 3116-28.
- Kaibuchi, K.** (1999). Regulation of cytoskeleton and cell adhesion by Rho targets. *Prog Mol Subcell Biol* **22**, 23-38.
- Kawakami, Y., Wada, N., Nishimatsu, S., Komaguchi, C., Noji, S. and Nohno, T.** (2000). Identification of chick frizzled-10 expressed in the developing limb and the central nervous system. *Mech Dev* **91**, 375-8.
- Kee, Y. and Bronner-Fraser, M.** (2001). Id4 expression and its relationship to other Id genes during avian embryonic development. *Mech Dev* **109**, 341-5.
- Kidd, S., Baylies, M. K., Gasic, G. P. and Young, M. W.** (1989). Structure and distribution of the Notch protein in developing *Drosophila*. *Genes Dev* **3**, 1113-29.

- Kidd, S., Kelley, M. R. and Young, M. W.** (1986). Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Mol Cell Biol* **6**, 3094-108.
- Kiefer, P. and Dickson, C.** (1995). Nucleolar association of fibroblast growth factor 3 via specific sequence motifs has inhibitory effects on cell growth. *Mol Cell Biol* **15**, 4364-74.
- Kieny, M. and Sengel, P.** (1964). [on the Production of a Supplementary Feather Area in the Chick Embryo.]. *C R Hebd Seances Acad Sci* **258**, 714-6.
- Kindred, B.** (1967). The expression of the Tabby and crinkled genes in different genetic backgrounds in the mouse. *Genetics* **55**, 173-8.
- Kitajewski, J., Mason, J. O. and Varmus, H. E.** (1992). Interaction of Wnt-1 proteins with the binding protein BiP. *Mol Cell Biol* **12**, 784-90.
- Kobielak, K., Stokes, N., de la Cruz, J., Polak, L. and Fuchs, E.** (2007). Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Koff, A., Ohtsuki, M., Polyak, K., Roberts, J. M. and Massague, J.** (1993). Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta. *Science* **260**, 536-9.
- Kohl, R., Antoine, M., Olwin, B. B., Dickson, C. and Kiefer, P.** (2000). Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor alters secretion and intracellular routing of fibroblast growth factor 3. *J Biol Chem* **275**, 15741-8.
- Kohn, A. D. and Moon, R. T.** (2005). Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium* **38**, 439-46.
- Kojima, T., Morikawa, Y., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Senba, E. and Kitamura, T.** (2000). TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor



receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *J Biol Chem* **275**, 20742-7.

**Koppinen, P., Pispä, J., Laurikkala, J., Thesleff, I. and Mikkola, M. L.** (2001). Signaling and subcellular localization of the TNF receptor Edar. *Exp Cell Res* **269**, 180-92.

**Kretschmar, M., Liu, F., Hata, A., Doody, J. and Massague, J.** (1997). The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* **11**, 984-95.

**Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Malbon, C. C. and Moon, R. T.** (2000a). Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem* **275**, 12701-11.

**Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Park, M., Miller, J. R. and Moon, R. T.** (2000b). The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* **16**, 279-83.

**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. *J Biol Chem* **276**, 2668-77.

**Kume, S., Muto, A., Inoue, T., Suga, K., Okano, H. and Mikoshiba, K.** (1997). Role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in ventral signaling in *Xenopus* embryos. *Science* **278**, 1940-3.

**Kuznetsov, G., Brostrom, M. A. and Brostrom, C. O.** (1992). Demonstration of a calcium requirement for secretory protein processing and export. Differential effects of calcium and dithiothreitol. *J Biol Chem* **267**, 3932-9.

**Lagna, G., Hata, A., Hemmati-Brivanlou, A. and Massague, J.** (1996). Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* **383**, 832-6.

- 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**, 3003-14.
- Lam, M. H. and Rosen, J. M.** (2004). Chk1 versus Cdc25: chking one's levels of cellular proliferation. *Cell Cycle* **3**, 1355-7.
- Lamb, T. M., Knecht, A. K., Smith, W. C., Stachel, S. E., Economides, A. N., Stahl, N., Yancopolous, G. D. and Harland, R. M.** (1993). Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* **262**, 713-8.
- Laufer, E., Nelson, C. E., Johnson, R. L., Morgan, B. A. and Tabin, C.** (1994). Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* **79**, 993-1003.
- Lauffenburger, D. A.** (1996). Cell motility. Making connections count. *Nature* **383**, 390-1.
- Laurikkala, J., Mikkola, M., Mustonen, T., Aberg, T., Koppinen, P., Pispa, 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**, 443-55.
- Laurikkala, J., Pispa, 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**, 2541-53.
- 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.
- Lecourtois, M. and Schweisguth, F.** (1995). The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. *Genes Dev* **9**, 2598-608.

- Lee, J., Platt, K. A., Censullo, P. and Ruiz i Altaba, A.** (1997). Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* **124**, 2537-52.
- Lefort, K., Mandinova, A., Ostano, P., Kolev, V., Calpini, V., Kolfschoten, I., Devgan, V., Lieb, J., Raffoul, W., Hohl, D. et al.** (2007). Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCKalpha kinases. *Genes Dev* **21**, 562-77.
- Lewandoski, M., Sun, X. and Martin, G. R.** (2000). Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet* **26**, 460-3.
- Lieber, T., Wesley, C. S., Alcamo, E., Hassel, B., Krane, J. F., Campos-Ortega, J. A. and Young, M. W.** (1992). Single amino acid substitutions in EGF-like elements of Notch and Delta modify Drosophila development and affect cell adhesion in vitro. *Neuron* **9**, 847-59.
- Lin, X., Buff, E. M., Perrimon, N. and Michelson, A. M.** (1999). Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during Drosophila embryonic development. *Development* **126**, 3715-23.
- Lincoln, J., Alfieri, C. M. and Yutzey, K. E.** (2006). BMP and FGF regulatory pathways control cell lineage diversification of heart valve precursor cells. *Dev Biol* **292**, 292-302.
- Linsenmayer, T. F.** (1972). Control of integumentary patterns in the chick. *Dev Biol* **27**, 244-71.
- Liu, C. and Hermann, T. E.** (1978). Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem* **253**, 5892-4.
- Liu, F., Hata, A., Baker, J. C., Doody, J., Carcamo, J., Harland, R. M. and Massague, J.** (1996). A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* **381**, 620-3.
- Liu, N., Chen, Y. and Huang, X.** (2006). Fibronectin EIIIA splicing variant: a useful contribution to forensic wounding interval estimation. *Forensic Sci Int* **162**, 178-82.

- Ma, D., Yang, C. H., McNeill, H., Simon, M. A. and Axelrod, J. D.** (2003). Fidelity in planar cell polarity signalling. *Nature* **421**, 543-7.
- Macias-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P. A., Pirone, R., Attisano, L. and Wrana, J. L.** (1996). MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* **87**, 1215-24.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. and Narumiya, S.** (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* **285**, 895-8.
- Mammucari, C., Tommasi di Vignano, A., Sharov, A. A., Neilson, J., Havrda, M. C., Roop, D. R., Botchkarev, V. A., Crabtree, G. R. and Dotto, G. P.** (2005). Integration of Notch 1 and calcineurin/NFAT signaling pathways in keratinocyte growth and differentiation control. *Dev Cell* **8**, 665-76.
- Manabe, R., Oh-e, N. and Sekiguchi, K.** (1999). Alternatively spliced EDA segment regulates fibronectin-dependent cell cycle progression and mitogenic signal transduction. *J Biol Chem* **274**, 5919-24.
- 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.
- Mandler, M. and Neubuser, A.** (2004). FGF signaling is required for initiation of feather placode development. *Development* **131**, 3333-43.
- Mao, B. and Niehrs, C.** (2003). Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene* **302**, 179-83.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B. M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C. et al.** (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* **417**, 664-7.

- Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A. and Niehrs, C.** (2001). LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* **411**, 321-5.
- Marigo, V., Johnson, R. L., Vortkamp, A. and Tabin, C. J.** (1996). Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev Biol* **180**, 273-83.
- Marine, J. C., Bellefroid, E. J., Pendeville, H., Martial, J. A. and Pieler, T.** (1997). A role for Xenopus Gli-type zinc finger proteins in the early embryonic patterning of mesoderm and neuroectoderm. *Mech Dev* **63**, 211-25.
- Masunaga, T.** (2006). Epidermal basement membrane: its molecular organization and blistering disorders. *Connect Tissue Res* **47**, 55-66.
- Mauger, A.** (1970). [The development of dorsal feathers in the chick embryo studied by means of x-irradiation]. *Dev Biol* **22**, 412-32.
- Mauger, A.** (1972). [The role of somitic mesoderm in the development of dorsal plumage in chick embryos. I. Origin, regulative capacity and determination of the plumage-forming mesoderm]. *J Embryol Exp Morphol* **28**, 313-41.
- 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.
- Mauger, A., Demarchez, M. and Sengel, P.** (1984). Role of extracellular matrix and of dermal-epidermal junction architecture in skin development. *Prog Clin Biol Res* **151**, 115-28.
- Mauger, A. and Sengel, P.** (1970). [The spinal pterygia of the chick embryo: presumptive area, arrangement and embryonic development]. *Dev Biol* **23**, 609-33.
- Mayer, T. C. and Green, M. C.** (1978). Epidermis is the site of action of tabby (Ta) in the mouse. *Genetics* **90**, 125-31.

- 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**, 259-67.
- McCrea, P. D., Turck, C. W. and Gumbiner, B.** (1991). A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* **254**, 1359-61.
- McKinnell, I. W., Makarenkova, H., de Curtis, I., Turmaine, M. and Patel, K.** (2004a). EphA4, RhoB and the molecular development of feather buds are maintained by the integrity of the actin cytoskeleton. *Dev Biol* **270**, 94-105.
- McKinnell, I. W., Turmaine, M. and Patel, K.** (2004b). Sonic Hedgehog functions by localizing the region of proliferation in early developing feather buds. *Dev Biol* **272**, 76-88.
- McMahon, A. P. and Moon, R. T.** (1989). Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell* **58**, 1075-84.
- Meinhardt, H. and Gierer, A.** (1974). Applications of a theory of biological pattern formation based on lateral inhibition. *J Cell Sci* **15**, 321-46.
- Meinhardt, H. and Gierer, A.** (2000). Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition. *Bioessays* **22**, 753-60.
- Mikels, A. J. and Nusse, R.** (2006). Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* **4**, e115.
- Mikkola, M. L., Pispá, 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**, 133-46.
- Mikkola, M. L. and Thesleff, I.** (2003). Ectodysplasin signaling in development. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**, 211-24.
- Miller, J. R., Hocking, A. M., Brown, J. D. and Moon, R. T.** (1999). Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathways. *Oncogene* **18**, 7860-72.

- Missero, C., Calautti, E., Eckner, R., Chin, J., Tsai, L. H., Livingston, D. M. and Dotto, G. P.** (1995). Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5451-5.
- Mitsiadis, T. A., Regaudiat, L. and Gridley, T.** (2005). Role of the Notch signalling pathway in tooth morphogenesis. *Arch Oral Biol* **50**, 137-40.
- Miyazono, K. and Miyazawa, K.** (2002). Id: a target of BMP signaling. *Sci STKE* **2002**, PE40.
- Mo, R., Freer, A. M., Zinyk, D. L., Crackower, M. A., Michaud, J., Heng, H. H., Chik, K. W., Shi, X. M., Tsui, L. C., Cheng, S. H. et al.** (1997). Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* **124**, 113-23.
- Mohler, J.** (1988). Requirements for hedgehog, a segmental polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of *Drosophila*. *Genetics* **120**, 1061-72.
- Moloney, D. J., Panin, V. M., Johnston, S. H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K. D., Haltiwanger, R. S. et al.** (2000a). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* **406**, 369-75.
- Moloney, D. J., Shair, L. H., Lu, F. M., Xia, J., Locke, R., Matta, K. L. and Haltiwanger, R. S.** (2000b). Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. *J Biol Chem* **275**, 9604-11.
- Monsoro-Burq, A. H. and Le Douarin, N.** (2000). Duality of molecular signaling involved in vertebral chondrogenesis. *Curr Top Dev Biol* **48**, 43-75.
- Moon, R. T., Brown, J. D. and Torres, M.** (1997a). WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet* **13**, 157-62.
- Moon, R. T., Brown, J. D., Yang-Snyder, J. A. and Miller, J. R.** (1997b). Structurally related receptors and antagonists compete for secreted Wnt ligands. *Cell* **88**, 725-8.

- Moon, R. T., Campbell, R. M., Christian, J. L., McGrew, L. L., Shih, J. and Fraser, S.** (1993a). Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*. *Development* **119**, 97-111.
- Moon, R. T., Christian, J. L., Campbell, R. M., McGrew, L. L., DeMarais, A. A., Torres, M., Lai, C. J., Olson, D. J. and Kelly, G. M.** (1993b). Dissecting Wnt signalling pathways and Wnt-sensitive developmental processes through transient misexpression analyses in embryos of *Xenopus laevis*. *Dev Suppl*, 85-94.
- Moon, R. T., DeMarais, A. and Olson, D. J.** (1993c). Responses to Wnt signals in vertebrate embryos may involve changes in cell adhesion and cell movement. *J Cell Sci Suppl* **17**, 183-8.
- 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.
- 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**, 2149-54.
- Murray, J. D. and Oster, G. F.** (1984). Cell traction models for generating pattern and form in morphogenesis. *J Math Biol* **19**, 265-79.
- Murray, J. D., Oster, G. F. and Harris, A. K.** (1983). A mechanical model for mesenchymal morphogenesis. *J Math Biol* **17**, 125-9.
- Nguyen, B. C., Lefort, K., Mandinova, A., Antonini, D., Devgan, V., Della Gatta, G., Koster, M. I., Zhang, Z., Wang, J., Tommasi di Vignano, A. et al.** (2006). Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation. *Genes Dev* **20**, 1028-42.
- Niswander, L. and Martin, G. R.** (1993a). FGF-4 and BMP-2 have opposite effects on limb growth. *Nature* **361**, 68-71.



- Niswander, L. and Martin, G. R.** (1993b). Mixed signals from the AER: FGF-4 and Bmp-2 have opposite effects on limb growth. *Prog Clin Biol Res* **383B**, 625-33.
- Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I. and Martin, G. R.** (1993). FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* **75**, 579-87.
- Nobes, C. D. and Hall, A.** (1995). Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* **23**, 456-9.
- Nohno, T., Kawakami, Y., Ohuchi, H., Fujiwara, A., Yoshioka, H. and Noji, S.** (1995). Involvement of the Sonic hedgehog gene in chick feather formation. *Biochem Biophys Res Commun* **206**, 33-9.
- Noji, S., Koyama, E., Myokai, F., Nohno, T., Ohuchi, H., Nishikawa, K. and Taniguchi, S.** (1993). Differential expression of three chick FGF receptor genes, FGFR1, FGFR2 and FGFR3, in limb and feather development. *Prog Clin Biol Res* **383B**, 645-54.
- Noramly, S., Freeman, A. and Morgan, B. A.** (1999). beta-catenin signaling can initiate feather bud development. *Development* **126**, 3509-21.
- Noramly, S. and Morgan, B. A.** (1998). BMPs mediate lateral inhibition at successive stages in feather tract development. *Development* **125**, 3775-87.
- 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**, 4297-307.
- Noveen, A., Jiang, T. X., Ting-Berret, 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**, 711-9.
- Novel, G.** (1973). Feather pattern stability and reorganization in cultured skin. *J Embryol Exp Morphol* **30**, 605-33.
- Nusse, R.** (2001). Developmental biology. Making head or tail of Dickkopf. *Nature* **411**, 255-6.

- Nusse, R.** (2005). Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* **15**, 28-32.
- Nusse, R., van Ooyen, A., Cox, D., Fung, Y. K. and Varmus, H.** (1984). Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature* **307**, 131-6.
- O'Shaughnessy, R. F., Christiano, A. M. and Jahoda, C. A.** (2004). The role of BMP signalling in the control of ID3 expression in the hair follicle. *Exp Dermatol* **13**, 621-9.
- O'Toole, P. J., Inoue, T., Emerson, L., Morrison, I. E., Mackie, A. R., Cherry, R. J. and Norton, J. D.** (2003). Id proteins negatively regulate basic helix-loop-helix transcription factor function by disrupting subnuclear compartmentalization. *J Biol Chem* **278**, 45770-6.
- Ogura, T., Alvarez, I. S., Vogel, A., Rodriguez, C., Evans, R. M. and Izpisua Belmonte, J. C.** (1996). Evidence that Shh cooperates with a retinoic acid inducible co-factor to establish ZPA-like activity. *Development* **122**, 537-42.
- Okuyama, R., LeFort, K. and Dotto, G. P.** (2004). A dynamic model of keratinocyte stem cell renewal and differentiation: role of the p21WAF1/Cip1 and Notch1 signaling pathways. *J Invest Dermatol Symp Proc* **9**, 248-52.
- 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**, 4611-7.
- 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**, 4763-72.
- Olivera-Martinez, I., Thelu, J. and Dhouailly, D.** (2004). Molecular mechanisms controlling dorsal dermis generation from the somitic dermomyotome. *Int J Dev Biol* **48**, 93-101.

- 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**, 233-44.
- Olsen, I. M. and Ffrench-Constant, C.** (2005). Dynamic regulation of integrin activation by intracellular and extracellular signals controls oligodendrocyte morphology. *BMC Biol* **3**, 25.
- 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 U S A* **96**, 5549-54.
- Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R. and Irvine, K. D.** (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* **387**, 908-12.
- Panopoulou, G. D., Clark, M. D., Holland, L. Z., Lehrach, H. and Holland, N. D.** (1998). AmphibMP2/4, an amphioxus bone morphogenetic protein closely related to Drosophila decapentaplegic and vertebrate BMP2 and BMP4: insights into evolution of dorsoventral axis specification. *Dev Dyn* **213**, 130-9.
- Papkoff, J.** (1997). Regulation of complexed and free catenin pools by distinct mechanisms. Differential effects of Wnt-1 and v-Src. *J Biol Chem* **272**, 4536-43.
- Papkoff, J. and Aikawa, M.** (1998). WNT-1 and HGF regulate GSK3 beta activity and beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 851-8.
- Park, E., Kim, G. H., Choi, S. C. and Han, J. K.** (2006). Role of PKA as a negative regulator of PCP signaling pathway during Xenopus gastrulation movements. *Dev Biol* **292**, 344-57.
- Park, W. J., Liu, J. and Adler, P. N.** (1994). Frizzled gene expression and development of tissue polarity in the Drosophila wing. *Dev Genet* **15**, 383-9.

- 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.
- Patel, M. S. and Karsenty, G.** (2002). Regulation of bone formation and vision by LRP5. *N Engl J Med* **346**, 1572-4.
- Patry, V., Bugler, B., Amalric, F., Prome, J. C. and Prats, H.** (1994). Purification and characterization of the 210-amino acid recombinant basic fibroblast growth factor form (FGF-2). *FEBS Lett* **349**, 23-8.
- Pearton, D. J., Ferraris, C. and Dhouailly, D.** (2004). Transdifferentiation of corneal epithelium: evidence for a linkage between the segregation of epidermal stem cells and the induction of hair follicles during embryogenesis. *Int J Dev Biol* **48**, 197-201.
- 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**, 3714-9.
- Peters, J., Sechrist, J., Luetolf, S., Loredó, G. and Bronner-Fraser, M.** (2002). Spatial expression of the alternatively spliced EIIIB and EIIB segments of fibronectin in the early chicken embryo. *Cell Commun Adhes* **9**, 221-38.
- Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T. and De Robertis, E. M.** (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* **397**, 707-10.
- Pinheiro, M. and Freire-Maia, N.** (1994). Ectodermal dysplasias: a clinical classification and a causal review. *Am J Med Genet* **53**, 153-62.
- Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B. J. and Skarnes, W. C.** (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* **407**, 535-8.

- Pispa, J., Jung, H. S., Jernvall, J., Kettunen, P., Mustonen, T., Tabata, M. J., Kere, J. and Thesleff, I.** (1999). Cusp patterning defect in Tabby mouse teeth and its partial rescue by FGF. *Dev Biol* **216**, 521-34.
- Pizette, S. and Niswander, L.** (1999). BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development* **126**, 883-94.
- Platt, K. A., Michaud, J. and Joyner, A. L.** (1997). Expression of the mouse Gli and Ptc genes is adjacent to embryonic sources of hedgehog signals suggesting a conservation of pathways between flies and mice. *Mech Dev* **62**, 121-35.
- Pourquie, O.** (2001). Vertebrate somitogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 311-50.
- Prin, F., Logan, C., D'Souza, D., Ensini, M. and Dhouailly, D.** (2004). Dorsal versus ventral scales and the dorsoventral patterning of chick foot epidermis. *Dev Dyn* **229**, 564-78.
- 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**, 117-25.
- Qian, D., Jones, C., Rzadzinska, A., Mark, S., Zhang, X., Steel, K. P., Dai, X. and Chen, P.** (2007). Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev Biol*.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R. and Aguet, M.** (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**, 547-58.
- Rafferty, L. A. and Sutherland, D. J.** (1999). TGF-beta family signal transduction in Drosophila development: from Mad to Smads. *Dev Biol* **210**, 251-68.
- Rafferty, L. A., Twombly, V., Wharton, K. and Gelbart, W. M.** (1995). Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in Drosophila. *Genetics* **139**, 241-54.

- Raftopoulou, M. and Hall, A.** (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* **265**, 23-32.
- Ramos, C. and Robert, B.** (2005). msh/Msx gene family in neural development. *Trends Genet* **21**, 624-32.
- Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., Aster, J. C., Krishna, S., Metzger, D., Chambon, P. et al.** (2001). Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *Embo J* **20**, 3427-36.
- Rebay, I., Fehon, R. G. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1993). Specific truncations of Drosophila Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell* **74**, 319-29.
- Reddy, S. T., Andl, T., Lu, M. M., Morrisey, E. E. and Millar, S. E.** (2004). Expression of Frizzled genes in developing and postnatal hair follicles. *J Invest Dermatol* **123**, 275-82.
- Reichsman, F., Smith, L. and Cumberledge, S.** (1996). Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction. *J Cell Biol* **135**, 819-27.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E. and Tabin, C.** (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**, 1401-16.
- Rodriguez-Esteban, C., Schwabe, J. W., De La Pena, J., Foy, B., Eshelman, B. and Belmonte, J. C.** (1997). Radical fringe positions the apical ectodermal ridge at the dorsoventral boundary of the vertebrate limb. *Nature* **386**, 360-6.
- Rong, P. M., Teillet, M. A., Ziller, C. and Le Douarin, N. M.** (1992). The neural tube/notochord complex is necessary for vertebral but not limb and body wall striated muscle differentiation. *Development* **115**, 657-72.
- Rouzankina, I., Abate-Shen, C. and Niswander, L.** (2004). Dlx genes integrate positive and negative signals during feather bud development. *Dev Biol* **265**, 219-33.

- Saitoh, A., Hansen, L. A., Vogel, J. C. and Udey, M. C.** (1998). Characterization of Wnt gene expression in murine skin: possible involvement of epidermis-derived Wnt-4 in cutaneous epithelial-mesenchymal interactions. *Exp Cell Res* **243**, 150-60.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L. K. and De Robertis, E. M.** (1994). Xenopus chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* **79**, 779-90.
- Sasaki, H., Hui, C., Nakafuku, M. and Kondoh, H.** (1997). A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* **124**, 1313-22.
- Satija, N. K., Gurudutta, G. U., Sharma, S., Afrin, F., Gupta, P., Verma, Y. K., Singh, V. K. and Tripathi, R. P.** (2007). Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering. *Stem Cells Dev* **16**, 7-23.
- Sauer, K. and Lehner, C. F.** (1995). The role of cyclin E in the regulation of entry into S phase. *Prog Cell Cycle Res* **1**, 125-39.
- Savage, C., Das, P., Finelli, A. L., Townsend, S. R., Sun, C. Y., Baird, S. E. and Padgett, R. W.** (1996). Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 790-4.
- 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.
- Schmidt-Ullrich, R., Aebischer, T., Hulsken, J., Birchmeier, W., Klemm, U. and Scheidereit, C.** (2001). Requirement of NF-kappaB/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendices. *Development* **128**, 3843-53.

- Schwarz, J. K., Devoto, S. H., Smith, E. J., Chellappan, S. P., Jakoi, L. and Nevins, J. R.** (1993). Interactions of the p107 and Rb proteins with E2F during the cell proliferation response. *Embo J* **12**, 1013-20.
- Sengel, P.** (1956). [In vitro differentiation of feather germs of chick embryo.]. *C R Seances Soc Biol Fil* **150**, 2057-9.
- Sengel, P.** (1976). Morphogenesis of Skin. Cambridge.
- Sengel, P. and Kieny, M.** (1967a). [Production of a supplementary pteryla in the chick embryo. I. Morphologic study]. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* **56**, 11-29.
- Sengel, P. and Kieny, M.** (1967b). [Production of an additional feather tract in the chick embryo. II. Experimental analysis]. *Dev Biol* **16**, 532-63.
- Shawber, C., Nofziger, D., Hsieh, J. J., Lindsell, C., Bogler, O., Hayward, D. and Weinmaster, G.** (1996). Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* **122**, 3765-73.
- Sheldahl, L. C., Park, M., Malbon, C. C. and Moon, R. T.** (1999). Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol* **9**, 695-8.
- Sherr, C. J. and Roberts, J. M.** (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **9**, 1149-63.
- Shi, Y., Wang, Y. F., Jayaraman, L., Yang, H., Massague, J. and Pavletich, N. P.** (1998). Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* **94**, 585-94.
- Shibuya, H., Iwata, H., Masuyama, N., Gotoh, Y., Yamaguchi, K., Irie, K., Matsumoto, K., Nishida, E. and Ueno, N.** (1998). Role of TAK1 and TAB1 in BMP signaling in early *Xenopus* development. *Embo J* **17**, 1019-28.



- Shulman, J. M., Perrimon, N. and Axelrod, J. D.** (1998). Frizzled signaling and the developmental control of cell polarity. *Trends Genet* **14**, 452-8.
- Sick, S., Reinker, S., Timmer, J. and Schlake, T.** (2006). WNT and DKK determine hair follicle spacing through a reaction-diffusion mechanism. *Science* **314**, 1447-50.
- Sinha, S. K., Zachariah, S., Quinones, H. I., Shindo, M. and Chaudhary, P. M.** (2002). Role of TRAF3 and -6 in the activation of the NF-kappa B and JNK pathways by X-linked ectodermal dysplasia receptor. *J Biol Chem* **277**, 44953-61.
- Smith, W. C. and Harland, R. M.** (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* **70**, 829-40.
- Smith, W. C., McKendry, R., Ribisi, S., Jr. and Harland, R. M.** (1995). A nodal-related gene defines a physical and functional domain within the Spemann organizer. *Cell* **82**, 37-46.
- Smolich, B. D., McMahon, J. A., McMahon, A. P. and Papkoff, J.** (1993). Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface. *Mol Biol Cell* **4**, 1267-75.
- Sofaer, J. A.** (1969a). Aspects of the tabby-crinkled-downless syndrome. I. The development of tabby teeth. *J Embryol Exp Morphol* **22**, 181-205.
- Sofaer, J. A.** (1969b). Aspects of the tabby-crinkled-downless syndrome. II. Observations on the reaction to changes of genetic background. *J Embryol Exp Morphol* **22**, 207-27.
- Sofaer, J. A.** (1969c). The genetics and expression of a dental morphological variant in the mouse. *Arch Oral Biol* **14**, 1213-23.
- 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**, 10246-9.
- Song, H. K., Carver, W. E. and Sawyer, R. H.** (1994). Pattern formation in chick feather development: distribution of beta 1-integrin in normal and scaleless embryos. *Dev Dyn* **200**, 129-43.

- 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**, 741-9.
- Souchelnytskyi, S., Nakayama, T., Nakao, A., Moren, A., Heldin, C. H., Christian, J. L. and ten Dijke, P.** (1998). Physical and functional interaction of murine and *Xenopus* Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* **273**, 25364-70.
- Srivastava, A. K., Pispá, J., Hartung, A. J., Du, Y., Ezer, S., Jenks, T., Shimada, T., Pekkanen, M., Mikkola, M. L., Ko, M. S. et al.** (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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13069-74.
- Stegmaier, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., Borges, E., Lenter, M., Kocher, H. P., Kleuser, B. and Vestweber, D.** (1995). The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* **373**, 615-20.
- Sternberg, P. W.** (1988). Lateral inhibition during vulval induction in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **335**, 551-4.
- Stott, N. S. and Chuong, C. M.** (2000). Retroviral gene transduction in limb bud micromass cultures. *Methods Mol Biol* **135**, 509-13.
- Sun, X., Lewandoski, M., Meyers, E. N., Liu, Y. H., Maxson, R. E., Jr. and Martin, G. R.** (2000). Conditional inactivation of *Fgf4* reveals complexity of signalling during limb bud development. *Nat Genet* **25**, 83-6.
- Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T. and Springer, T. A.** (2002). Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* **110**, 599-11.

- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J. P. and He, X.** (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**, 530-5.
- Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z. and He, X.** (2004). A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* **13**, 149-56.
- Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T. and Honjo, T.** (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol* **5**, 1416-23.
- Teillet, M. A., Lapointe, F. and Le Douarin, N. M.** (1998). The relationships between notochord and floor plate in vertebrate development revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11733-8.
- Theisen, H., Haerry, T. E., O'Connor, M. B. and Marsh, J. L.** (1996). Developmental territories created by mutual antagonism between Wingless and Decapentaplegic. *Development* **122**, 3939-48.
- Thelu, J., Viallet, J. P. and Dhouailly, D.** (1998). Differential expression pattern of the three Fringe genes is associated with epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* **111**, 903-6.
- Topley, G. I., Okuyama, R., Gonzales, J. G., Conti, C. and Dotto, G. P.** (1999). p21(WAF1/Cip1) functions as a suppressor of malignant skin tumor formation and a determinant of keratinocyte stem-cell potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9089-94.
- Topper, J. N., DiChiara, M. R., Brown, J. D., Williams, A. J., Falb, D., Collins, T. and Gimbrone, M. A., Jr.** (1998). CREB binding protein is a required coactivator for Smad-dependent, transforming growth factor beta transcriptional responses in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9506-11.
- Torres, M. A., Yang-Snyder, J. A., Purcell, S. M., DeMarais, A. A., McGrew, L. L. and Moon, R. T.** (1996). Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are

antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol* **133**, 1123-37.

**Turing, A. M.** (1952). The chemical basis of morphogenesis. *Phil Trans R Soc Lond* **II**, 37-72.

**Turjanski, A. G., Vaque, J. P. and Gutkind, J. S.** (2007). MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* **26**, 3240-53.

**Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M. et al.** (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* **389**, 990-4.

**van der Geer, P., Hunter, T. and Lindberg, R. A.** (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 251-337.

**Vauclair, S., Nicolas, M., Barrandon, Y. and Radtke, F.** (2005). Notch1 is essential for postnatal hair follicle development and homeostasis. *Dev Biol* **284**, 184-93.

**Viallet, J. P., Prin, F., Olivera-Martinez, I., Hirsinger, E., Pourquie, O. and Dhouailly, D.** (1998). Chick Delta-1 gene expression and the formation of the feather primordia. *Mech Dev* **72**, 159-68.

**Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D. and Stillman, B.** (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**, 574-8.

**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**, 423-34.

**Wang, J. Y.** (1997). Retinoblastoma protein in growth suppression and death protection. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 39-45.

- Wehrli, M., Dougan, S. T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A. and DiNardo, S.** (2000). arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* **407**, 527-30.
- Weinberg, R. A.** (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-30.
- Weinmaster, G.** (1997). The ins and outs of notch signaling. *Mol Cell Neurosci* **9**, 91-102.
- Werfel, S. J., Yednock, T. A., Matsumoto, K., Sterbinsky, S. A., Schleimer, R. P. and Bochner, B. S.** (1996). Functional regulation of beta 1 integrins on human eosinophils by divalent cations and cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* **14**, 44-52.
- Werner, S., Duan, D. S., de Vries, C., Peters, K. G., Johnson, D. E. and Williams, L. T.** (1992). Differential splicing in the extracellular region of fibroblast growth factor receptor 1 generates receptor variants with different ligand-binding specificities. *Mol Cell Biol* **12**, 82-8.
- Wessells, N. K.** (1965). Morphology and proliferation during early feather development. *Dev Biol* **12**, 131-53.
- Wessells, N. K. and Roessner, K. D.** (1965). Nonproliferation in dermal condensations of mouse vibrissae and pelage hairs. *Dev Biol* **12**, 419-33.
- Wettstein, D. A., Turner, D. L. and Kintner, C.** (1997). The *Xenopus* homolog of *Drosophila* Suppressor of Hairless mediates Notch signaling during primary neurogenesis. *Development* **124**, 693-702.
- Wharton, K. A., Johansen, K. M., Xu, T. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* **43**, 567-81.
- White, D. G., Hall, J. W., Brandli, D. W., Gehris, A. L. and Bennett, V. D.** (1996). Chick cartilage fibronectin differs in structure from the fibronectin in limb mesenchyme. *Exp Cell Res* **224**, 391-402.

- Widelitz, R. B., Jiang, T. X., Chen, C. W., Stott, N. 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* **126**, 2577-87.
- 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.
- Wilson, D. J. and Hinchliffe, J. R.** (1985). Experimental analysis of the role of the ZPA in the development of the wing buds of wingless (ws) mutant embryos. *J Embryol Exp Morphol* **85**, 271-83.
- Wilson, P. A., Lagna, G., Suzuki, A. and Hemmati-Brivanlou, A.** (1997). Concentration-dependent patterning of the *Xenopus* ectoderm by BMP4 and its signal transducer Smad1. *Development* **124**, 3177-84.
- Wolda, S. L., Moody, C. J. and Moon, R. T.** (1993). Overlapping expression of Xwnt-3A and Xwnt-1 in neural tissue of *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol* **155**, 46-57.
- Wolpert, L.** (1971). Positional information and pattern formation. *Curr Top Dev Biol* **6**, 183-224.
- Wozney, J. M.** (1998). The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci* **106 Suppl 1**, 160-6.
- Wrana, J. L., Tran, H., Attisano, L., Arora, K., Childs, S. R., Massague, J. and O'Connor, M. B.** (1994). Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from *Drosophila melanogaster* form an activin receptor complex. *Mol Cell Biol* **14**, 944-50.
- Wu, C. H. and Nusse, R.** (2002). Ligand receptor interactions in the Wnt signaling pathway in *Drosophila*. *J Biol Chem* **277**, 41762-9.
- Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D.** (1993a). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-4.

- Xiong, Y., Zhang, H. and Beach, D.** (1993b). Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev* **7**, 1572-83.
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E. and Matsumoto, K.** (1995). Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* **270**, 2008-11.
- Yamamoto, N., Tanigaki, K., Han, H., Hiai, H. and Honjo, T.** (2003). Notch/RBP-J signaling regulates epidermis/hair fate determination of hair follicular stem cells. *Curr Biol* **13**, 333-8.
- Yamanaka, H., Moriguchi, T., Masuyama, N., Kusakabe, M., Hanafusa, H., Takada, R., Takada, S. and Nishida, E.** (2002). JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates. *EMBO Rep* **3**, 69-75.
- 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**, 523-7.
- Yan, M., Zhang, Z., Brady, J. R., Schilbach, S., Fairbrother, W. J. and Dixit, V. M.** (2002). Identification of a novel death domain-containing adaptor molecule for ectodysplasin-A receptor that is mutated in crinkled mice. *Curr Biol* **12**, 409-13.
- Yang-Snyder, J., Miller, J. R., Brown, J. D., Lai, C. J. and Moon, R. T.** (1996). A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr Biol* **6**, 1302-6.
- Yoshida, Y., Tanaka, S., Umemori, H., Minowa, O., Usui, M., Ikematsu, N., Hosoda, E., Imamura, T., Kuno, J., Yamashita, T. et al.** (2000). Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell* **103**, 1085-97.
- Zhang, C. and Evans, T.** (1996). BMP-like signals are required after the midblastula transition for blood cell development. *Dev Genet* **18**, 267-78.

- Zhang, H., Shinmyo, Y., Mito, T., Miyawaki, K., Sarashina, I., Ohuchi, H. and Noji, S.** (2005). Expression patterns of the homeotic genes *Scr*, *Antp*, *Ubx*, and *abd-A* during embryogenesis of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Gene Expr Patterns* **5**, 491-502.
- Zhang, Y., Feng, X., We, R. and Derynck, R.** (1996). Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature* **383**, 168-72.
- Zimmerman, C. M., Kariapper, M. S. and Mathews, L. S.** (1998). Smad proteins physically interact with calmodulin. *J Biol Chem* **273**, 677-80.



*Annexes : Revues publiées*

*Revue I*

## **ANNEXES : REVUES PUBLIEES**

### **I. Revue n°1**

#### **The Different steps of skin formation in vertebrates**

Isabel Olivera-Martinez, Jean P. Viallet, Frederic Michon, David J. Pearton and Danielle Dhouailly<sup>1\*</sup>

International Journal of Developmental Biology (2004) 48: 107-115

#### **Abstract**

Skin morphogenesis occurs following a continuous series of cell-cell interactions which can be subdivided into three main stages: 1- the formation of a dense dermis and its overlying epidermis in the future appendage fields (macropattern); 2- the organization of these primary homogeneous fields into heterogeneous ones by the appearance of cutaneous appendage primordia (micropattern) and 3- cutaneous appendage organogenesis itself. In this review, we will first show, by synthesizing novel and previously published data from our laboratory, how heterogenetic and heterospecific dermal/epidermal recombinations have allowed us to distinguish between the respective roles of the dermis and the epidermis. We will then summarize what is known from the work of many different research groups about the molecular signaling which mediates these interactions in order to introduce the following articles of this Special Issue and to highlight what remains to done.

# The different steps of skin formation in vertebrates

ISABEL OLIVERA-MARTINEZ<sup>#</sup>, JEAN P. VIALLET, FREDERIC MICHON, DAVID J. PEARTON  
and DANIELLE DHOUILLY\*

*Equipe Biologie de la Différenciation Epithéliale, UMR CNRS 5538, Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Grenoble, France*

**ABSTRACT** Skin morphogenesis occurs following a continuous series of cell-cell interactions which can be subdivided into three main stages: 1- the formation of a dense dermis and its overlying epidermis in the future appendage fields (macropattern); 2- the organization of these primary homogeneous fields into heterogeneous ones by the appearance of cutaneous appendage primordia (micropattern) and 3- cutaneous appendage organogenesis itself. In this review, we will first show, by synthesizing novel and previously published data from our laboratory, how heterogenetic and heterospecific dermal/epidermal recombinations have allowed us to distinguish between the respective roles of the dermis and the epidermis. We will then summarize what is known from the work of many different research groups about the molecular signaling which mediates these interactions in order to introduce the following articles of this Special Issue and to highlight what remains to be done.

**KEY WORDS:** *chick, mouse, lizard, Ottawa naked, scaleless*

## Introduction

The integument, that is, the skin and cornea, is the only organ that is immediately visible to external examination. Any deviations from wild type are immediately detectable, which explains the large number of studies that have appeared in the last few years using transgenic and K.O. mice. In amniotes, cutaneous appendages are exclusively composed of epidermal cells and during many years by the past, it was generally considered that epidermis is the effector tissue and that its morphogenesis depends to a large extent upon dermal influence (Sengel, 1976). Dhouailly (1977, 1984) first pinpointed that both components of the skin should be considered as donors and receptors of information: skin morphogenesis depends on a continuous dialogue between its two components. At each step of this dialogue, attention needs to be paid not only to the responses of one tissue to the other by the way of diffusible signaling factors, but also primarily to the activation of transcription factors and intratissue interactions, as has been beautifully shown for teeth formation (Pispa and Thesleff, 2003).

The cellular interactions, as we saw in the previous chapters of this issue, start before the formation of an embryonic skin. Indeed, before skin morphogenesis, various cellular interactions occur, which specify first the formation of dermal progenitors (Olivera-Martinez *et al.*; Fliniaux *et al.*, 2004) and then their densification

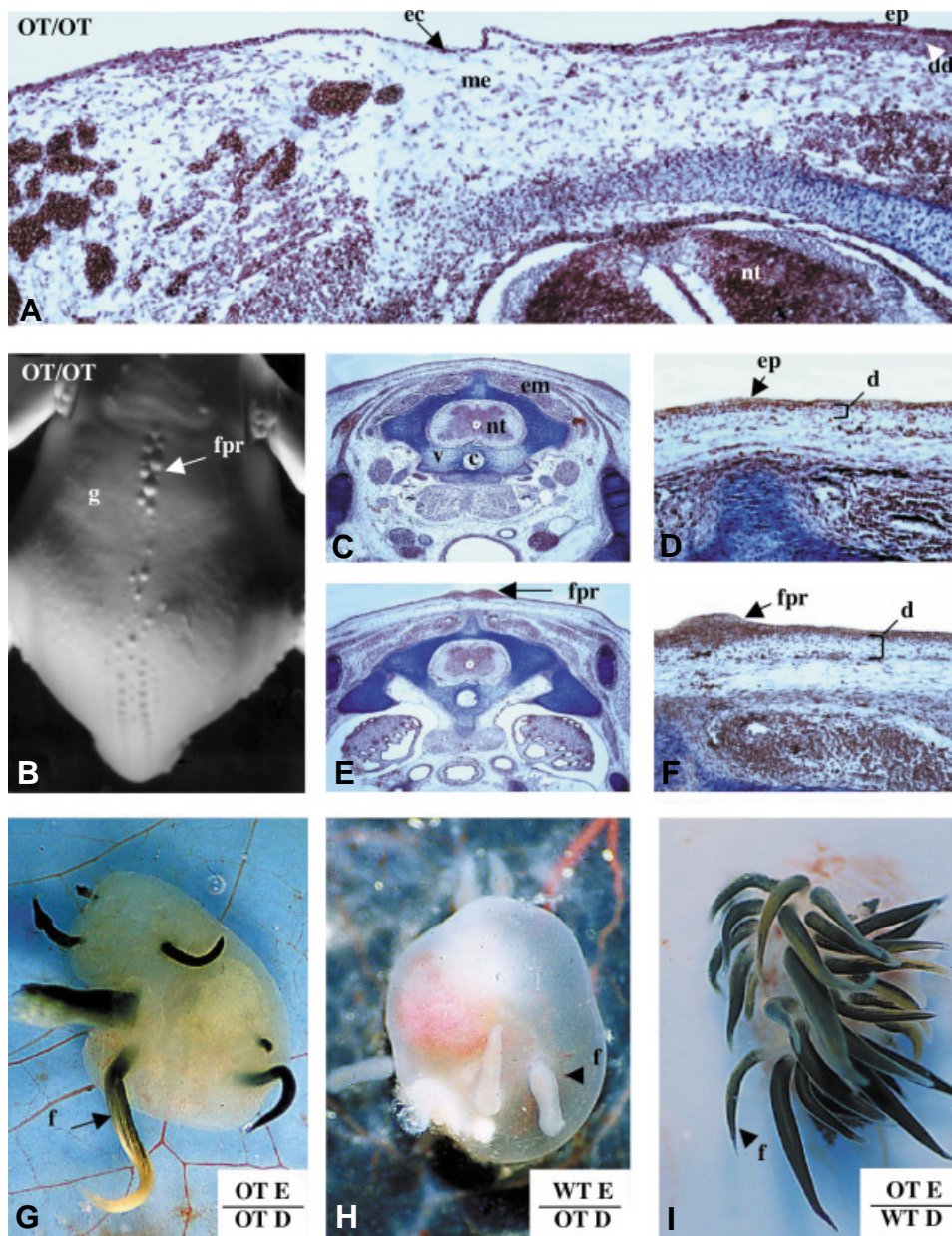
within the sub-ectodermal space, i.e. the establishment of the future cutaneous appendage fields or macropattern. These two first steps lead to the formation of a homogeneous embryonic skin, composed of an epidermis overlying a dense dermis. The next step, i.e. the initiation and organization of regular repetitive appendage primordia, or micropattern, is one of the most fascinating problems in development (Jiang *et al.*, 1999, 2004; Bardot *et al.*, 2004). The final step, the organogenesis of the epidermal primordia (placode) in a complete, mature appendage, is the most complex to elucidate and this has recently been done beautifully in the case of feather (Yu *et al.*, 2004), the most complicated epidermal structure yet evolved (Wu *et al.*, 2004).

Many results have been obtained from experiments where dermis and epidermis were separated by enzymatic or chemical (EDTA) methods and recombined in various conformations. The recombination of tissues that have varying degrees of difference allows us to dissect out the successive steps and cell interactions involved. The comparison of results obtained in heterospecific recombinants from species belonging to the same class or to two different classes of amniotes led to the classic concept of the two steps in dermal induction (Dhouailly, 1977), firstly to initiate placode formation and secondly to direct appendage organogenesis. Other information, derived from heterogenetic recombina-

*Abbreviations used in this paper:* OT, Ottawa naked.

\*Address correspondence to: Dr. Danielle Dhouailly, BDE-LEDAC, UMR CNRS 5538, Institut Albert Bonniot, Domaine de la Merci, 38706, La Tronche Cedex, France. Fax: +33-4-76-54-94-25. e-mail: danielle.dhouailly@ujf-grenoble.fr

<sup>#</sup> Current address: Division of Cell and Developmental Biology, School of Life Sciences, University of Dundee, Wellcome Trust Biocentre, Dow St., Dundee, DD1 5EH, United Kingdom.



**Fig. 1. In the chick *Ottawa naked* mutant, dense dermis formation is affected.** (A) Transversal section of the thoracic region at stage HH 30. In this case, the formation of a dense dermis (dd) and the subsequent differentiation of the ectoderm (ec) into an epidermis (ep) occurs on the right side, while the mesenchyme (me) remains loose over the neural tube. (B) Dorsal view at E10. Most parts of the spinal pterygia have not formed and the skin stays glabrous (g). In this case, a few abnormal feather primordia form along the middorsal line and on the shoulders. Their formation is delayed in comparison with the wild type. It should be noted that the skin pattern varies in each homozygous embryo. (C,D) Transversal section at E10 in the upper thoracic region of the previous embryo. Two different magnifications showing the formation of a sparse dermis (d), while the epaxial muscles (em) and the vertebra (v) differentiate around the neural tube (nt) and the cord (c). (E,F) Transversal section at E10 in the lower thoracic region of the previous embryo. Two different magnifications showing the formation of abnormal feather primordia (fpr). (G-I) A group of three skin explants, using equivalent left and right pieces of the same *Ottawa naked* embryo, cultured for 6 days on the chick chorio-allantoic membrane (G) control left *Ottawa naked* explant, with a few feather filaments (f). (H) Heterogenetic recombinant of *Ottawa* (OT) dermis (D) and wild type (WT) epidermis. Formation of only two abnormal feather filaments. (I) The reverse recombinant of wild type dermis and *Ottawa* epidermis. Formation of several normally patterned feather filaments (Experiments and photographs by I. Olivera-Martinez).

tions between the spontaneous chick scaleless mutant and wild type, first drew attention to the inability of the mutant epidermis to respond to dermal induction (Goetinck and Abbott, 1963; Sengel and Abbott, 1963). In fact the scaleless epidermis was not only unable to form a placode, but the main defect was its inability to transmit signals that are required for dermal organogenesis (Dhouailly and Sawyer, 1984).

Here we will present these pioneering contributions obtained by using heterotypic, heterogenetic and heterospecific dermal/epidermal recombinants, including the older and more recent results of our laboratory, which have allowed us to determine the origin of most of the different informative or permissive signals from one or the other of the two skin components. We will then discuss what are the molecular signals that could mediate these interactions from the results obtained by many different research groups, in particular from Dr. Chuong's laboratory, in order to highlight what remains to be done. In particular, we want to draw attention to the understudied problem of how the cells maintain the memory of their developmental settings, for example how skin cells are able to maintain their ability to establish a micropattern even if this is disrupted.

#### When the dense dermis formation is perturbed: the chick *Ottawa naked* mutant

The *Ottawa naked* (OT) is an autosomal recessive mutation that has not been genetically characterized. Chicks are almost totally naked at hatching. Frequent webbing on toes II and III is associated with the naked skin condition. Moreover, embryos examined at 6 days have frequent neural tube abnormalities or even a total absence of the caudal region. The chicks rarely reach the adult stage. When they survive, the adults might develop a few down feathers but for the most part are totally naked. The eggs from heterozygotes were obtained from Dr. J. L. Piërro (Center for Environmental Health, University of Connecticut, Storrs). At E6.75 (stage HH 30) the dermis formation is very irregular in the dorsal region and, in most parts, the subectodermal mesen-



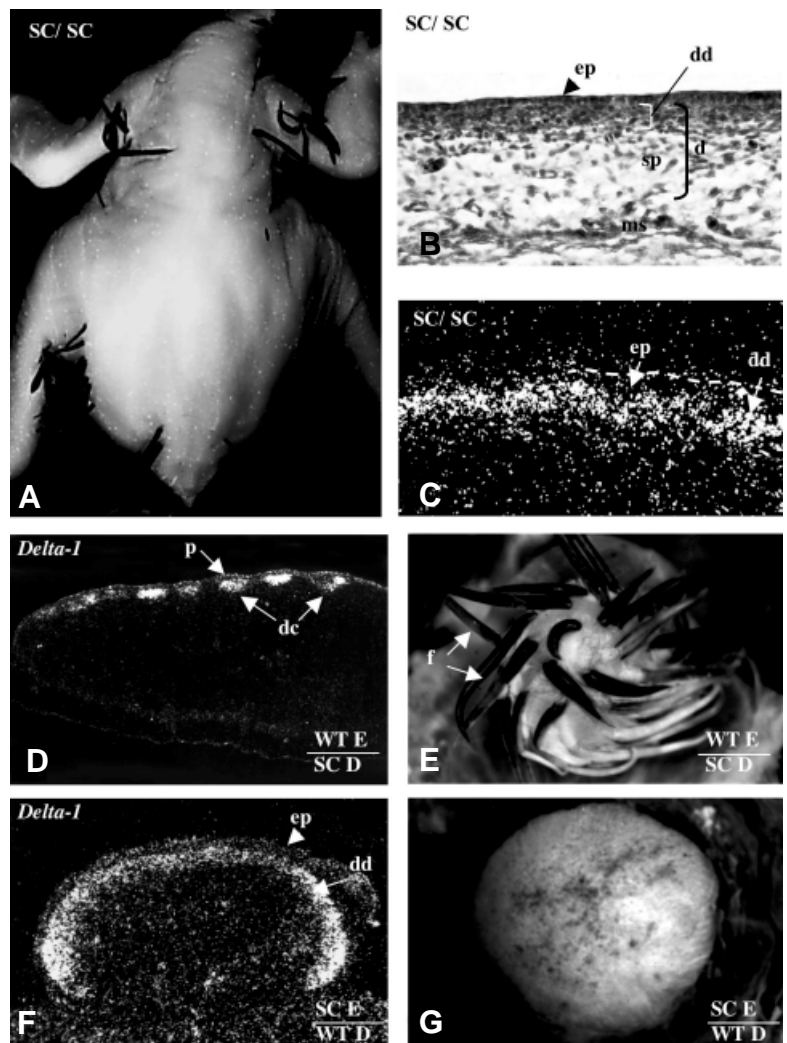
chyme remains loose (Fig. 1A). At E8.5 a few feather primordia sometimes occur, albeit delayed two days with respect to the wild type. At E10 (Fig. 1B), when a few feather buds are formed, their number, diameter, location in the dorsal field (macropattern) and their arrangement (micropattern) are very variable, but are almost symmetrical on each side of the middorsal line. A dense dermis is not present in most dorsal regions (Fig. 1C,D), although it forms and subsequently gives rise to abnormally sized dermal condensations in some (Fig. 1E,F). Heterogenetic dermal/epidermal recombinants were performed at stage HH 31 between these mutant (OT/OT) and wild type (WT/WT) embryos and then grafted for 6 days on the chick chorioallantoic membrane. The skin was dissected on each side of the middorsal line and for each mutant embryo, a group of three grafts was done: one control; one OT/OT dermis/WT/WT epidermis; and one WT/WT dermis/OT/OT epidermis. The results were consistent for each group of three (n=6) that survived. The controls and the recombinants involving an Ottawa naked dermis were featherless or poorly feathered. In addition, in those rare cases where a few feathers formed (Fig. 1G,H), they were delayed by 2-3 days with respect to the recombinants involving a wild-type dermis. The recombinants involving a wild-type dermis produced large numbers of feathers (Fig. 1I), with the corresponding primordia differentiating rapidly, as soon as the day after the recombination.

The Ottawa naked defect thus affects the formation of a dense dermis, while the Ottawa naked epidermis functions normally. The formation of the dermis is however perturbed whatever the origin of the dermal progenitors, i.e. the neural crest (Couly and Le Douarin, 1988) for facial dermis, the dermomyotome (Mauger, 1972) for dorsal dermis, or the somatopleural mesoderm (Christ *et al.*, 1983) for ventral and limb skin. This is despite the fact that the molecular mechanisms which result in the specification of the dermal progenitors appear to differ in regions where it has been studied in detail, i.e. the back (Olivera-Martinez *et al.*, 2000, 2001, 2002 and 2004) and abdomen (Fliniaux *et al.*, 2004). Moreover, as the subectodermal mesenchyme formed, we can therefore surmise that only the densification of the dermis is affected. This implies that either the mesenchymal cells are impeded in their proliferation/migration close to the ectoderm, or that they do not receive specific signals from the ectoderm, or that the signals are not at a sufficient level. The answer might come from studies currently in process in our laboratory on the respective roles of the ectoderm and mesoderm in dermal densification in wild type embryos.

#### When the dense dermis is not redistributed to form dermal condensation: the chick *Scaleless* mutant

*Scaleless* is an autosomal recessive mutation that has not been genetically characterized, but has been the subject of several scientific studies since the sixties. *Scaleless* chicks have smooth skin largely free of down feathers and their tarsometatarsus and feet lack scales.

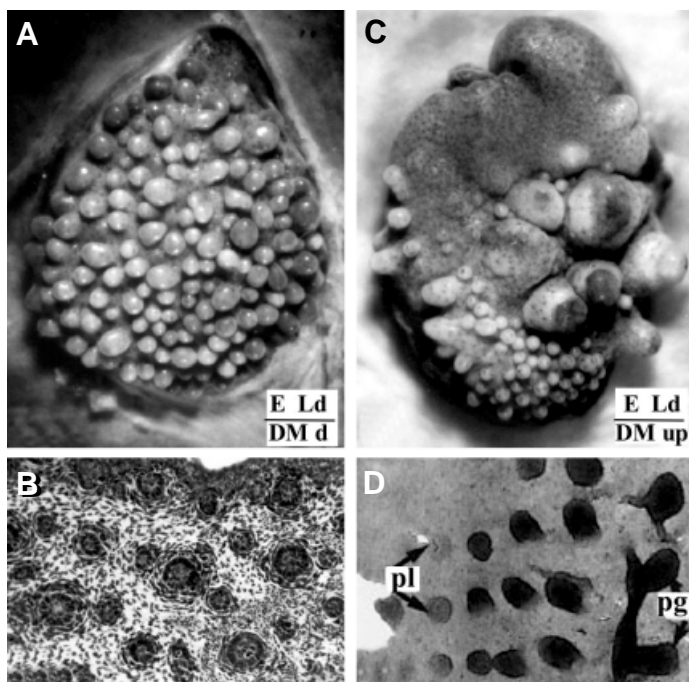
Scattered feathers are present in the head, humeral, crural and caudal pterygiae (Fig. 2A). The eggs from homozygous SC/SC mutants were obtained from J.L. Pierro (Center for Environmental Health, University of Connecticut, Storrs). Histological observation of embryos at stage HH 30 shows that the dorsal dermis formed normally and is composed of a dense dermis overlying a sparse dermis (Fig. 2B) (Viallet *et al.*, 1998). Thus, in *scaleless* embryos (Viallet *et al.*, 1998; Dhouailly *et al.*, 1998; Widelitz *et al.*, 2000; M. Harris, personal communication), as in wild type em-



**Fig. 2. The chick *scaleless* mutant: the formation of dermal condensations is affected due to a deficiency in epidermal signalling.** (A) Dorsal view at E20. Note the formation of feathers on the humeral, crural and caudal tracts. The spinal tract is entirely devoid of feathers. (B,C) At E7, the dorsal *scaleless* dermis reaches the stage of dense dermis (dd) formation (B) and this dense dermis homogeneously expresses Delta-1 transcripts. (D-G) Heterogenetic dermal/epidermal recombinants. After 36 hours, WT epidermis/SC dermis recombination (D) leads to the restriction of Delta-1 expression to the fibroblasts forming the dermal condensation (dc) of the feather primordia and, after 6 days on the chorioallantoic membrane (E), to the differentiation of feather filaments (f). The converse recombinant of SC epidermis and WT dermis leads to a homogeneous distribution of Delta-1 transcripts in the superficial dense dermis (dd) after 36 hours (F) and after 6 days (G) to a bare explant. d, dermis; ep, epidermis; ms, muscles; p, placode; sp, spare dermis. (A,B) Photographed by I. Olivera-Martinez; (C-G) courtesy of Elsevier (Viallet *et al.*, 1998).

bryos (Wessells, 1965; see also review by Dhouailly *et al.*, 2004), the formation of a dermis in areas which correspond to the pterygia is characterized by an increase in the cellular density of the fibroblasts. In scaleless embryos, however, the next step does not occur. Feather formation involves the segregation of at least two types of dermal cells, via a redistribution of the cell population that forms the dense dermis (F. Michon, unpublished data). The first type will form the dermal condensation, will then be endowed with morphogenetic properties and participate in feather formation. The second type will form the ordinary sparse dermis underlying the inter-feather epidermis. Dil experiments (Jiang *et al.*, 1999) show that the two fates of dermal fibroblasts could still be reassigned at E8 (HH 33), i. e. when the dermal condensations have already formed. The Notch pathway is known to play a role in binary choices (among others: Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995; Simpson, 1997) and *in situ* hybridization of wild type chick embryos showed that *Delta-1* transcripts are heterogeneously distributed in the forming dorsal dermal condensations at E7/E8 (Viallet *et al.*, 1998). In contrast, in scaleless embryos of the same stages, *Delta-1* transcripts are homogeneously distributed in the dense dermis (Fig. 2C) (Viallet *et al.*, 1998). Moreover, *Delta-1* over-expression using a retroviral infection in wild type embryos led to formation of large, ectopic secondary apteria (Viallet *et al.*, 1998). Pioneering experiments at the beginning of the sixties (Goetinck and Abbott, 1963; Sengel and Abbott, 1963) showed that the scaleless defect is expressed by the ectoderm while the

scaleless dermis functions normally. More precisely, heterochronic heterogenetic recombinants demonstrate that the scaleless dermis is endowed with appendage-inducing abilities at an early stage and will rapidly lose them due to a lack of interaction with a wild type epidermis (Dhouailly and Sawyer, 1984; Song and Sawyer, 1996). Heterogenetic recombination of scaleless dermis with a wild type epidermis leads, after 36 hours, to the repatterning of *Delta-1* expression in the dermis (Fig. 2D), followed, after 6 days of culture on chorioallantoic membrane, by the emergence of feathers (Fig. 2E) (Viallet *et al.*, 1998). The converse recombinant of a dorsal scaleless epidermis with a wild type dermis leads to a homogeneous distribution of *Delta-1* transcripts in the superficial dermis after 36 hours (Fig. 2F) and, 6 days later, to a smooth explant (Fig. 2G) (Viallet *et al.*, 1998). The group of P. Goetinck (Song *et al.*, 1996) showed that the defect in scaleless embryos is a lack of expression of FGF4 by the epidermis. Their experiments were done *in vitro*, by adding beads overloaded with either FGF2 or 4 on scaleless chick embryo skin explants *in vitro*. They obtained abnormal feather buds which had an abnormal micropattern and some fusions. The same year, our group was engaged in a similar type of experiment, but the pieces of dorsal scaleless embryonic skin, overlaid with FGF2 beads, were grafted on the chick chorioallantoic membrane. Perfectly differentiated feathers appeared (Viallet *et al.*, 1998) and moreover, the feather buds arose sequentially in the vicinity of the loaded beads, suggesting that the beads do not replace an epidermal placode as suggested by Song *et al.* (1996), but instead gave and expanded a general permissive message to the dermis. The endogenous FGF4 signalling of the epidermis to the dermis in wild type embryos is thus a permissive signal, which might interact indirectly with *Delta-1* expression, to allow (Viallet *et al.*, 1998; Dhouailly *et al.*, 1998) the formation of dermal condensations in feather- or scale-forming regions. Dermal scale condensations, as well as the formation of placodes which precedes the organization of the dense dermis are clearly distinguishable in whole pieces of dermis and epidermis after their separation (Dhouailly, 1984). FGF4 does not constitute a “feather-message”, as suggested by a third group (Widelitz *et al.*, 1996). Whereas they obtained supernumerary feather formation in the sub-wing semi-apterium by using FGF2 beads, we did not in the midventral apterium (Dhouailly *et al.*, 1998). The difference between the upper dermis of a semi-apterium and that of an apterium is that the former normally forms a dense dermis, albeit with a delay, as well as a few randomly distributed feathers while the later, remains loose and totally bare (Sengel *et al.*, 1969; Sengel, 1976). Moreover, FGF2 beads allow the scaleless foot skin to form scutate scales (Dhouailly *et al.*, 1998; Prin and Dhouailly, 2004).



**Fig. 3. Formation of scale buds in a hair-pelage or a hair-vibrissa pattern by a lizard embryo dorsal epidermis. (A)** With dorsal mouse dermis: formation of large and small scale buds corresponding to the central and lateral primary hair follicle pattern **(B)**. **(C)** With upper-lip mouse dermis: formation of large scale buds arranged in a whisker pattern **(D)**, surrounded by small scale buds corresponding to pelage hair pattern. The dermis is thus responsible for the pattern, while the epidermis responds according to its genetic potential (Dhouailly, 1975).

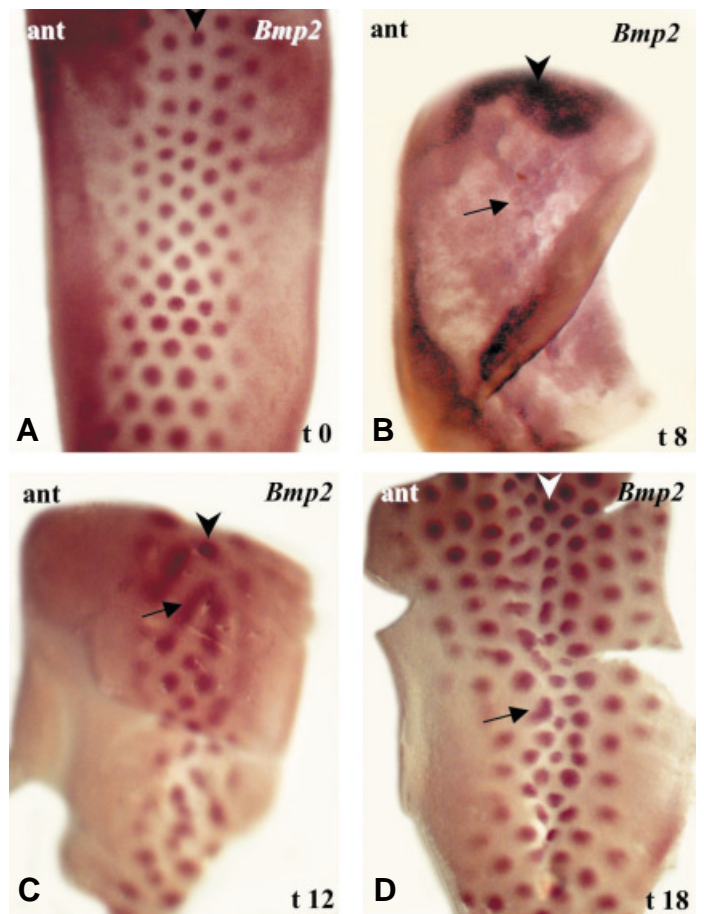
### The first dermal induction and the initiation/patterning of appendages

Heterospecific recombinations between dermis and epidermis were performed thirty years ago by using skin tissues from lizard, chick and mouse embryos, thus from the three different classes of amniotes (Dhouailly, 1973, 1975, 1977). They all yielded consistent results. In brief, class specificity of cutaneous appendages, i.e. the formation of scale- feather- or hair-type buds is epidermis dependant, whereas their initiation/ patterning and outlines are dermis dependant. The dermis, as it transmits its



initial triggering influence to initiate appendage morphogenesis in the overlying epidermis, also specifies their size and distribution pattern and the epidermis responds according to its genetic potential. These buds do not, however, give rise to mature appendages. For example, mouse pelage hair-forming dermis induces a large quantity of two size classes of scale buds in a lizard epidermis (Fig. 3A) and feather buds in a chick epidermis, corresponding to central large and lateral small primary follicles of the mouse pelage (Fig. 3B). Likewise, mouse vibrissa-forming dermis induces a small number of giant scale buds in a lizard epidermis (Fig. 3C) and giant feather buds in a chick epidermis, according to the mouse upper-lip pattern (Fig. 3D). A number of signaling factors have been shown to be expressed in the placode as well as in the dermal condensation. *Bmp 2*, 4 and 7 and follistatin (for a review: Chuong, 1998) are expressed in the feather primordia during pattern formation while gremlin is only expressed in the interbud dermis (Bardot *et al.*, 2004). The ectopic expression of *Bmp2* and 4 leads to the inhibition of the feather primordia and, reciprocally, to the over-expression of noggin, follistatin and gremlin induce the formation of ectopic or enlarged feathers (Noramly and Morgan, 1998; Patel *et al.*, 1999). Interestingly all the feather activators (BMP antagonists, FGF, Shh) and most of the inhibitors (BMP2, 4) are expressed in the primordia. This has led to the proposal of a model based on diffusion of repressor/activator signals (Chuong, 1998).

The dynamical patterning of embryonic chick dorsal skin can be followed by detection of *BMP-2* transcripts (Noramly and Morgan, 1998) first in the nascent placode, then in the dermal condensation. The entire dorsal lumbar skin was recovered from stage HH 31 chick embryos and the explants were cultured *in vitro* and harvested after 8, 12 and 18 hours. At time 0 (HH31) the expression of *BMP-2* in the placode cells allows the identification of 5/7 distinct rows of feather primordia (Fig. 4A). After 8 hours of culture, *BMP-2* expression is difficult to detect (Fig. 4B) and is no longer detected after 10 hours, when there is a complete loss of the periodic patterning. After 12 hours, this patterning is re-established, with some modifications such as fusions that occur along the lines of chevrons (Fig. 4C). It should be noted that in dorsal pteryla, the micropattern of feather buds is grossly hexagonal, so that each feather is surrounded by six other feathers. Inter-feather distances are larger longitudinally than laterally, so that the feathers appear to be arranged in oblique transverse rows or chevrons. In the trunk, the chevrons open towards the tail (Sengel, 1976; Dhouailly *et al.*, 2004). After 18 hours, almost the entire skin explant is patterned *de novo* (Fig. 4D), albeit with some abnormalities such as lateral fusions and heterogeneity of the diameter of the feather primordia. These experiments (F. Michon, unpublished data) show that the skin has the ability to autonomously rebuild a new periodic pattern when this has been disrupted by the mechanical stress of dissection/ organotypic culture. It should be noted that in this experiment, the axial row reappears first. However, the presence of the skin corresponding to the initial primary row is not necessary for the re-patterning of the integument: when it is eliminated by excision, a new dominant row appears, lateral to the initial one (Novel, 1973). The appearance of epidermal placodes precedes the organization of the dense dermis into dermal condensations (Sengel and Rusaöuen, 1968; Dhouailly, 1984) and we can suggest that the first dermal induction initiates this placode formation, which in turn allows and



**Fig. 4. Lability of the dorsal feather pattern in organotypic culture, as revealed by *in situ* hybridization with a *BMP2* probe.** Forty pieces of dorsal lumbar pteryla were dissected at stage HH 31. Ten were immediately fixed and processed for hybridization, while the rest were cultured and fixed after 8, 12 or 18 hours. (A) At time 0, five to seven rows of feather placodes have formed. (B) After 8 hours, it is very difficult (arrow) to detect heterogeneity in *BMP2* expression. (C) After 12 hours, feather formation has resumed and fusions occur laterally leading to well-defined chevrons (arrow). (D) After 18 hours, the skin explant is again entirely patterned, albeit with some abnormalities (arrow). The arrowhead indicates the dorsal midline, ant, anterior. Experiments and photographs by F. Michon.

directs the cell migration in the dermis, leading to the redistribution of the fibroblasts from the dense dermis. As the first dermal messages, responsible for the initiation and patterning of appendages have remained understandable between the three classes of amniotes, it was proposed (Dhouailly, 1977) that they were mediated by the same type of molecules that are evolutionarily well-conserved. This was indeed the case as was shown several years later in the case of chick and mouse embryos (for a review: Chuong, 1998). That these signals belong to the Wnt family was recently confirmed via experiments involving the Wnt inhibitor Dickkopf-1 (*Dkk-1*). *Dkk-1* is a soluble Wnt inhibitor that inhibits Wnt activation of the Frizzled receptor by binding the co-receptor low-density-lipoprotein-receptor-related protein 6 (LRP6) (Semenov *et al.*, 2001; He *et al.*, 2004). When dissociated chick dermal cells were transduced with RCAS-*Dkk-1* and then re-



aggregated and overlaid by an epidermis, feather formation is inhibited (Chang *et al.*, 2004). Dkk does not, however, differentiate between different Wnts and specific antagonists for each member of this large family do not exist yet.

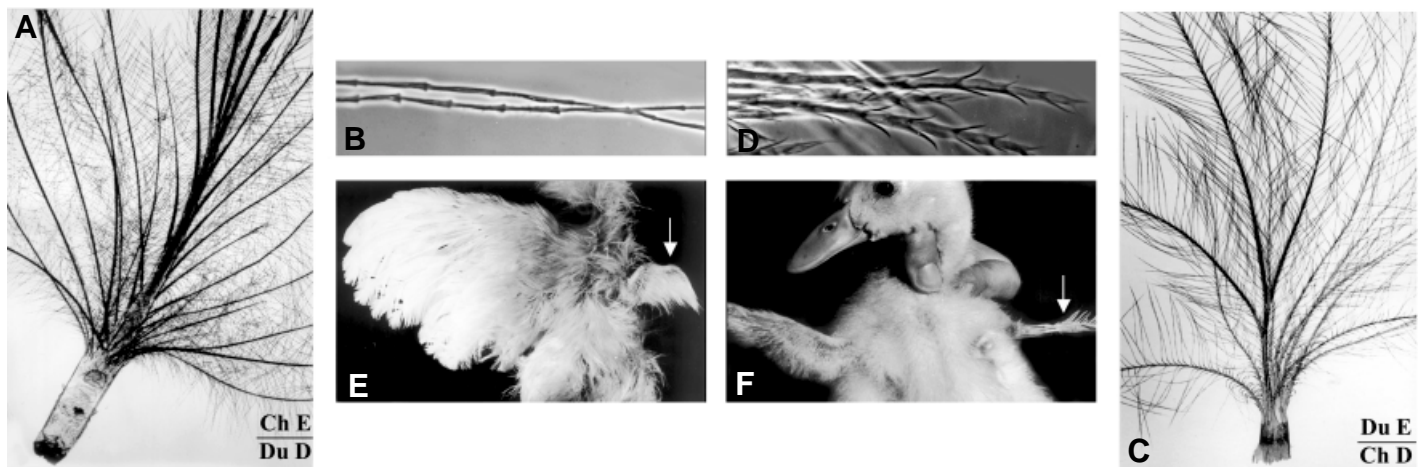
### The second dermal induction and feather organogenesis

The association of chick epidermis with hair-forming mouse dermis produces arrested feather buds, the epidermis of which forms ingrowing thickenings which can be recognized as abnormal barb ridges (Dhouailly, 1973). These hypomorphic barb ridges are formed by stacking of cells corresponding to future barb and barbule cells. Nevertheless, although the cytodifferentiation of feather cells is independent from dermal signaling once feather formation has been triggered by the first dermal messages originating from the mouse dermis, the outgrowth and typical architectural organization of the feather filament did not occur.

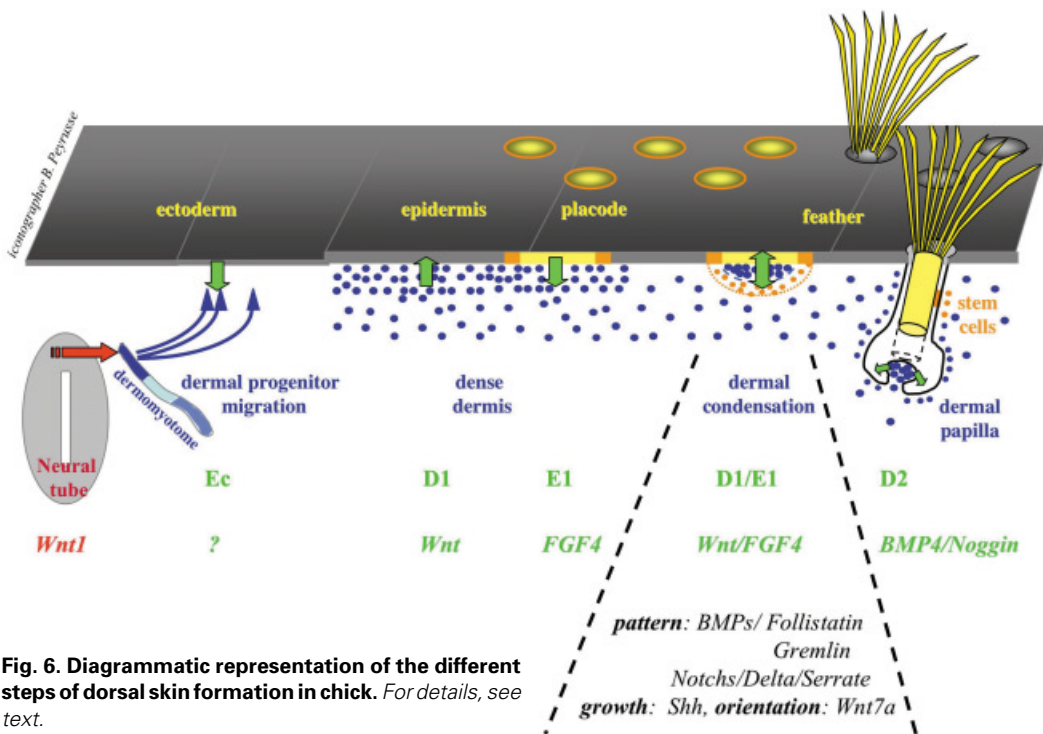
In chick neoptile feathers the number of barbs varies from 11 to 16 and the rachis, formed by the fusion of the anterior barbs, is rudimentary. In contrast, in duck neoptile feathers, the number of barbs varies from 18 to 26 and the anterior rachis is well developed. Moreover, the teleoptile remiges appear soon after birth in chick but later in duck. The number of barb ridges in the embryonic feather filament, which corresponds to that of barbs in the neoptile feather; their partial fusion at the base of the feather to form a rachis; the timing of the formation of the second generation, the juvenile feathers and their shape, are species variable characters, which are all governed by the second dermal messages (Dhouailly, 1970). The experiments to show this consisted of

heterospecific recombinations of wing bud ectoderm and mesoderm between chick and duck, grafted on chick or duck hosts. The results were clear-cut. The morphological characters of the feathers were all determined by the dermis, except the number and shape of barbule cells, which conformed to the species origin of the epidermis (Fig. 5 A-C). Moreover, the time of renewal of the appendages was also dependent on the dermis (Fig. 5 E,F). The corresponding dermal/epidermal interactions must occur in the feather follicle, between the dermal papilla and the ring (wall) of undifferentiated epidermal cells. The later proliferate and subdivide into barb ridges, which fuse with the anterior part of the ring to give rise to the rachis, with additional barb ridges forming in the posterior part of the ring. Rachis formation, as well as the addition of new barb ridges, is more pronounced in case of the duck than chick neoptile feather and occurs through the entire outgrowth of the teleoptile feather in both species.

Several signaling factors are expressed in the developing feather, including BMP2, BMP4, Noggin and Shh (Yu *et al.*, 2002; and 2004). *BMP4* is expressed mainly in the dermal papilla, while Noggin is expressed in its posterior region, where barb ridges start to form. *Shh* is expressed in the internal sheath and is essential for inducing apoptosis and thus the splitting of barb ridges. The Chuong group, in a series of elegant experiments showed that, by adding RCAS viruses carrying these genes or dominant negative genes to the follicles of plucked teleoptile feathers, abnormal feathers were formed during regeneration. Over-expression of *Noggin*, a BMP antagonist, increases the barb number and even causes them to become split, while over-expression of *BMP2* and *BMP4* caused the formation of a giant rachis and barb fusions. Suppression of *Shh* leads to the forma-



**Fig. 5. Chimeric neoptile feathers produced by heterospecific duck/chick forelimb ectoderm/ mesodermal pulp recombinants.** The dermis is responsible for the feather architecture and the time of replacement of the neoptile by the teleoptile feather, while the shape of epidermal barbule cells is conferred by the epidermal species. (A) A typical duck-type neoptile feather obtained from the association of chick epidermis and duck dermis. Note the formation of 26 barbs, most of them being attached to a well developed rachis. (B) Detail of the barbules of the feather shown in (A), showing a typical chick-type morphology, i.e. a succession of cylindrical cells, slightly swollen at their distal tip. (C) Typical chick-type neoptile feather obtained from the association of chick dermis and duck epidermis. Note the formation of 12 barbs. (D) Detail of the barbules of the feather shown in (C), showing a typical duck-type morphology, i.e. a succession of cylindrical cells, with two spiny protrusions at their distal tip. (E) A chick host, two weeks old, bearing a chimeric right wing composed of a duck mesenchymal pulp associated with a chick ectoderm. The chimeric wing is perfectly developed, but is covered only with neoptile duck-type feathers, while the left host wing is covered by the second generation, the juvenile teleoptile feathers. (F) A duck host, two weeks old, bearing a chimeric right wing composed of a chick mesenchymal pulp associated to a duck ectoderm. The chimeric wing is in this case poorly developed, because the microsurgery was not perfect, but in the second generation, the juvenile teleoptile chick-type feathers had formed (Dhouailly, 1970).



**Fig. 6. Diagrammatic representation of the different steps of dorsal skin formation in chick.** For details, see text.

tion of a remnant membrane between the barbs. It is thus very probable that a difference in the level of expression of *Noggin* and *BMP4/2* exists between the dermal papillae of the neoptile feather follicle in chick and duck, but this would be difficult to quantify.

### Conclusion: the molecular events which mediate dermal/epidermal interactions

The molecular events underlying the cellular interactions during skin morphogenesis have thus been partially documented by several laboratories using expressions pattern studies and ectopic treatment using loaded beads or over-expression using retroviruses. Many of the recently described developmental signalling pathways have been implicated in one or all of these interactions (summarised in figure 6). Among these signals, the Wnt pathway is associated first in the formation of the dorsal dermis. *Wnt1* from the dorsal neural tube has been shown to induce the specification of dermal progenitors from the dorsal dermomyotome (Olivera-Martinez *et al.*, 2001, 2002 and 2004). The dermal precursors express *Wnt 11*, which might be implicated in their migration to the subectodermal space (Olivera-Martinez *et al.*, 2002, 2004). *Wnt 1*, 3a and 5a in the feather primordia and *Wnt 11* in the interbud dermis region control the shape of the feather bud while *Wnt7a* is involved in the anterior-posterior orientation during the outgrowth of the feather bud (Chang *et al.*, 2004; Widelitz *et al.*, 1999; Chuong *et al.*, 1996). At early stage the level of  $\beta$ -catenin is homogeneous throughout feather field epidermis and then is restricted to placodes (Widelitz *et al.*, 2000). We can thus propose that this general  $\beta$ -catenin expression is the response of the epidermis to a general Wnt message originating from the dermis. Then, this message ap-

pears to become restricted to the primordia in wild-type embryo, whereas it remains as a smear over the tract fields in the scaleless embryo (Widelitz *et al.*, 2000). During pattern formation nuclear  $\beta$ -catenin staining increases in the placode and is lost in the ectoderm that adopts interfollicular fate, in addition the forced expression of  $\beta$ -catenin induces the formation of ectopic feathers (Noramly *et al.*, 1999; Widelitz *et al.*, 2000). The restriction of  $\beta$ -catenin expression, as well as that of *Delta-1* expression might be a consequence of FGF4 expression in the epidermis (Viallet *et al.*, 1998; Song *et al.*, 1996). The Notch pathway may serve to stabilize the patterning of feather primordia (Viallet *et al.*, 1998).

The coupled BMP4/BMP-antagonist is first observed during feather field specification in

the abdomen (Fliniaux and Viallet unpublished data). During pteryla formation transient *BMP2* expression is observed in the epidermis while the BMP antagonists gremlin and follistatin are expressed in the underlying dermis and the epidermis, respectively. (Noramly *et al.*, 1998; Bardot *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 1999). When the patterning occurs, BMP2, 4 and 7 and the BMP antagonists excepted gremlin are expressed in the primordia. This observation leads to a model based on activation via differential diffusion of activators and inhibitors for the formation of the periodic patterning (Chuong, 1998). Later, at the step of feather organogenesis, the BMP/antagonist pair (in this case *Noggin*) is also involved in the patterning of the barb ridges (Yu *et al.*, 2002, 2004). What is the role of *Shh*? It is expressed at 2 days by the chick endoderm (Watanabe *et al.*, 1998) and could play a role in inhibiting *BMP4* expression in the somatopleure in the abdomen and thus in allowing feather field formation. At the early stage of pattern formation *Shh* is expressed in the placode while its receptor *Ptc* is expressed both in the placode and the dermal condensation (Ting-Berreth and Chuong, 1996; Jung *et al.*, 1998; Morgan *et al.*, 1998). In our point of view, *Shh* is involved in activating cell proliferation both in the dermis and epidermis. Forced expression of *Shh* (or *Shh* treatment) causes ectopic feather formation in pteryla, semi-apteria and even in the midventral apterium and appears to be sufficient to enhance dermis density over a critical thresholds. In fact, *Shh* is strongly expressed in feather buds that elongate into feather filaments, is slightly expressed in overlapping scutate scales and is barely detectable and short lived in reticulate scales that did not overlap (Prin *et al.*, 2004). Inhibition of *Shh* signaling in chick (Prin and Dhouailly, 2004) can lead to feather growth arrest. Likewise, *Shh* knock-out mice (Chiang *et al.*, 1999) have arrested hair buds. Together all these results lead to the conclusion that *Shh* is a general growth

activator of cutaneous appendages. Moreover Shh also intervenes later, to allow apoptosis of the internal epidermal sheath and consequently the splitting of barb ridges during feather organogenesis (Yu *et al.*, 2002, 2004).

Thus, after more than thirty years of research, the cellular interactions and their mediators become clearer. However, the formation of a dense dermis and particularly the nature of the signal originating from the ectoderm, as well as the migration of dermal cells to from the dermal condensations deserve further research work. Moreover, we need to complete our preliminary diagram (Fig. 6), by adding which transcription factors and what type of intra-tissular interactions are triggered at each step. Only then we will obtain an overview of feather- and of course, hair-forming skin morphogenesis as complete as that already detailed for tooth organogenesis (for a review, see Pispá and Thesleff, 2003).

#### Acknowledgments

The authors thank Dr. Thélú and all the different ex-PhD students of the laboratory, in particular Dr. S. Blanchet-Rethore; Dr. C. Ferraris; Dr. I. Fliniaux; Dr. B. Kanzler and Dr. F. Prin, for continuous discussion leading to the elaboration of the present idea, as well as Mrs B. Peyrusse for all the iconography and Mrs. G. Chevalier and Miss. P. Betton for technical help.

#### References

- ARTAVANIS-TSAKONAS, S., MATSUNO, K. and FORTINI, M. E. (1995). Notch signaling. *Science* 268: 225-232.
- BARDOT, B., LECOIN, L., FLINIAUX, I., HUILLARD, E., MARX, M. and VIALLET, J. P. (2004). Dm/Gremlin, a BMP antagonist, defines the interbud region during feather development. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 149-156.
- 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 DŁUGOSZ, A. A. (1999). Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Dev. Biol.* 205: 1-9.
- CHRIST, B., JACOB, M. and JACOB, H. J. (1983). On the origin and development of the ventrolateral abdominal muscles in the avian embryo. An experimental and ultrastructural study. *Anat Embryol (Berl)*. 166: 87-101.
- 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. *Mech. Dev.* 121: 157-71.
- CHUONG, C. M. (1998) Feather morphogenesis: A model of the formation of epithelial appendages. In *Molecular Basis of epithelial appendage morphogenesis* (C.M. Chuong, Ed.), pp. 57-74. R.G. Landes Co., Georgetown, Texas.
- 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 Suppl.* 103: 101-113.
- DHOUAILLY, D. (1970). Déterminisme de la différenciation spécifique des plumes néoptiles et téléoptiles chez le poulet et le canard. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 18: 389-400.
- DHOUAILLY, D. (1973). Dermo-epidermal interactions between birds and mammals: differentiation of cutaneous appendages. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 30: 587-603.
- DHOUAILLY, D. (1975). Formation of cutaneous appendages in dermoepidermal recombinations between reptiles, birds and mammals. *Wilhelm, Roux Arch. Dev. Biol.* 177: 323-340.
- DHOUAILLY, D. (1977). Dermo-epidermal interactions during morphogenesis of cutaneous appendages in amniotes. In *Frontier Matrix Biology* (ed. L. Robert), Creteil. 4: 86-121.
- DHOUAILLY, D. (1984). Specification of feather and scale patterns. In *Pattern Formation*. (Ed. G.M. Malacinski and S.V. Bryant). Macmillan Pub. Comp. New York, London. pp. 581-601.
- 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., PRIN, F., KANZLER, B. and VIALLET, J. P. (1998). Variation of cutaneous appendages: Regional specification and cross-species signals. In *Molecular basis of Epithelial appendage morphogenesis* Vol. 1 (Ed. C.M. Chuong), R. G. Landes Company, Georgetown, Texas, USA pp. 45-56.
- DHOUAILLY, D., OLIVERA-MARTINEZ, I., FLINIAUX, I., MISSIER, S., VIALLET, J.P. and THÉLU, J. (2004). Skin field formation: morphogenetic events. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 85-91.
- FLINIAUX, I., VIALLET, J. P. and DHOUAILLY, D. (2004). Ventral vs. dorsal chick dermal progenitor specification. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 103-106.
- GOETINCK, P. F. and ABBOT, 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.
- HE, X., SEMENOV, M., TAMAI, K. and ZENG, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: Arrows point the way. *Development* 131: 1663-1677
- JIANG, TX., JUNG, HS., 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 hormones. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 117-136.
- JUNG, H. S., FRANCIS-WERST, P. H., WIDELITZ, R. B., JIANG, T. X., TING-BERRETH, S. A., TICKLE, C., WOLPERT, L. and CHUONG, C. M., 1998. Local inhibitory action of BMP's and their relationships with activators in feather formation: implications for periodic patterning. *Dev. Biol.* 196: 11-23.
- MAUGER, A. (1972). The role of somitic mesoderm in the development of dorsal plumage in chick embryos. I. Origin, regulative capacity and determination of the plumage-forming mesoderm. *J Embryol Exp Morphol* 28: 313-41.
- 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.
- NORAMLY, S. and MORGAN, B. A. (1998). BMP's mediate lateral inhibition at successive stage in the feather tract development. *Development*. 125: 3775-3787.
- NORAMLY, S., FREMAN, A. and MORGAN, B. A. (1999). Beta-catenin signaling can initiate feather bud development. *Development*. 126: 3509-3521.
- NOVEL, G. (1973). Feather pattern stability and reorganization in cultured skin. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 30: 605-633.
- 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., THELU, J., TEILLET, M. A. and DHOUAILLY, D. (2001). Dorsal dermis development depends on signal from the dorsal neural tube, which can be substituted by Wnt-1. *Mech Dev* 100: 233-44.
- 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: 4763-72.
- OLIVERA-MARTINEZ, I., THELU, J. and DHOUAILLY D. (2004). Molecular mechanisms controlling dorsal dermis generation from the somatic dermomyotome. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 93-101.
- 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.
- PISPA, J. and THESLEFF, I. (2003). Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev. Biol.* 262: 195-205.
- PRIN, F. and DHOUAILLY, D. (2004). How and when the regional competence of chick epidermis is established: feather vs. scutate and reticulate scales, a problem en route to a solution. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 137-148.
- PRIN, F., LOGAN, C., D'SOUZA, D., ENSINI, M. and DHOUAILLY, D. (2004). Dorsal versus ventral scales and the dorsoventral patterning of chick foot epidermis. *Dev. Dyn.* 229: 564-78.
- SEMENOV, M. K., TAMAI, B. K., BROTT, M., KUHL, S., SOKOL, S. and HE, X. (2001). Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt co-receptor LRP6. *Curr. Biol.* 11: 951-961.

- SENGEL, P. and ABBOTT, U. K. (1963). *In vitro* studies with the scaleless mutant: interaction during feather and scale differentiation. *J. Hered.* 54: 254-262.
- SENGEL, P. and RUSAOUEN, M. (1968). Aspects histologiques de la différenciation précoces des ébauches plumaires chez le poulet. *C. R. Acad. Sci.* 266: 795-797.
- SENGEL, P., DHOUAILLY, D. and KIENY, M. (1969). Aptitude of the skin constituents of the mid-ventral apterium of the chicken for forming feathers. *Dev. Biol.* 19: 436-46.
- SENGEL, P. (1976). Morphogenesis of the skin. In *Developmental and Cell Biology*, (Eds. Abercrombie, M., Neweth, D.R. and Torrey, J.G.). Vol. 1. Cambridge University Press, Cambridge, MA, pp. 1-277.
- SIMPSON, P. (1997). Notch signaling in development. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 4: 297-304.
- SONG, H. K. and SAWYER, R. H. (1996). Dorsal dermis of the scaleless (sc/sc) embryo directs normal feather pattern formation until day 8 of development. *Dev. Dyn.* 205: 82-91.
- SONG, H. K., WANG, Y. and COETINCK, P. F. (1996). fibroblast growth factor 2 can replace ectodermal signaling for feather development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10246-10249.
- TING-BERRETH, S. A. and CHUONG, C. M. (1996). Sonic Hedgehog in feather morphogenesis: induction of mesenchymal condensation and association with cell death. *Dev. Dyn.* 207: 157-170.
- VIALLET, J. P., PRIN, F., OLIVERA-MARTINEZ, I., HIRSINGER, E., POURQUIÉ, O. and DHOUAILLY, D. (1998). Chick Delta-I 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: 131-53.
- WATANABE Y., DUPREZ D., MONSORO-BURQ A. H., VINCENT C. and LE DOUARIN N. M. (1998). Two domains in vertebral development: antagonistic regulation by SHH and BMP4 proteins. *Development.* 125: 2631-9.
- WIDELITZ, R. B., JIANG, T., NOVEEN, A., CHEN, C. J. and CHUONG, C. M. (1996). FGF induces new feather buds form developing avian skin. *J. Inv. Derm.* 107: 797-803.
- WIDELITZ, R. B., JIANG, T. X., LU, J. and CHUONG, C. M. (2000). beta-catenin in epithelial morphogenesis: conversion of part of avian foot scales into feather buds with a mutated beta-catenin. *Dev. Biol.* 219: 98-114.
- WU, P., HOU, L., PLIKUS, M., HUGHES, M., SCEHNET, J., SUKSAWEANG, S., WIDELITZ, R. B., JIANG, T.X. and CHUONG, C.M. (2004). *Evo-Devo* of amniote integuments and appendages. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 248-267.
- YU, M., WU, P., WIDELITZ, R. B. and CHUONG, C. M. (2002). The morphogenesis of feathers. *Nature.* 420: 308-12.
- YU, M., UUE, Z., WU, P., CHUONG, C.M. (2004). The developmental biology of feather follicles. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 181-191.

*Revue II*

## II. Revue n°2

### What is the biological basis of pattern formation of skin lesions?

C.M. Chuong, D. Dhouailly, S. Gilmore, L. Forest, W.B. Shelley, K.S. Stenn, P. Maini, F. Michon, S. Parimoo, S. Cadau, J. Demongeot, Y. Zheng, R. Paus and R. Happle

Experimental Dermatology (2006) 15: 547-564

#### Abstract

Pattern recognition is at the heart of clinical dermatology and dermatopathology. Yet, while every practitioner of the art of dermatological diagnosis recognizes the supreme value of diagnostic cues provided by defined patterns of ‘efflorescences’, few contemplate on the biological basis of pattern formation in and of skin lesions. Vice versa, developmental and theoretical biologists, who would be best prepared to study skin lesion patterns, are lamentably slow to discover this field as a uniquely instructive testing ground for probing theoretical concepts on pattern generation in the human system. As a result, we have at best scraped the surface of understanding the biological basis of pattern formation of skin lesions, and widely open questions dominate over definitive answer. As a symmetry-breaking force, pattern formation represents one of the most fundamental principles that nature enlists for system organization. Thus, the peculiar and often characteristic arrangements that skin lesions display provide a unique opportunity to reflect upon – and to experimentally dissect – the powerful organizing principles at the crossroads of developmental, skin and theoretical biology, genetics, and clinical dermatology that underlie these – increasingly less enigmatic – phenomena. The current ‘Controversies’ feature offers a range of different perspectives on how pattern formation of skin lesions can be approached. With this, we hope to encourage more systematic interdisciplinary research efforts geared at unraveling the many unsolved, yet utterly fascinating mysteries of dermatological pattern formation. In short: never a dull pattern!

## Controversies in Experimental Dermatology

Section Editor: Ralf Paus, Lübeck

# What is the biological basis of pattern formation of skin lesions?

Chuong CM, Dhouailly D, Gilmore S, Forest L, Shelley WB, Stenn KS, Maini P, Michon F, Parimoo S, Cadau S, Demongeot J, Zheng Y, Paus R, Happle R. What is the biological basis of pattern formation of skin lesions?  
Exp Dermatol 2006; 15: 547–564. © The Authors 2006. Journal compilation © 2006 Blackwell Munksgaard.

C. M. Chuong, D. Dhouailly, S. Gilmore, L. Forest, W. B. Shelley, K. S. Stenn, P. Maini, F. Michon, S. Parimoo, S. Cadau, J. Demongeot, Y. Zheng, R. Paus and R. Happle

**Abstract:** Pattern recognition is at the heart of clinical dermatology and dermatopathology. Yet, while every practitioner of the art of dermatological diagnosis recognizes the supreme value of diagnostic cues provided by defined patterns of 'efflorescences', few contemplate on the biological basis of pattern formation in and of skin lesions. Vice versa, developmental and theoretical biologists, who would be best prepared to study skin lesion patterns, are lamentably slow to discover this field as a uniquely instructive testing ground for probing theoretical concepts on pattern generation in the human system. As a result, we have at best scraped the surface of understanding the biological basis of pattern formation of skin lesions, and widely open questions dominate over definitive answer. As a symmetry-breaking force, pattern formation represents one of the most fundamental principles that nature enlists for system organization. Thus, the peculiar and often characteristic arrangements that skin lesions display provide a unique opportunity to reflect upon – and to experimentally dissect – the powerful organizing principles at the crossroads of developmental, skin and theoretical biology, genetics, and clinical dermatology that underlie these – increasingly less enigmatic – phenomena. The current 'Controversies' feature offers a range of different perspectives on how pattern formation of skin lesions can be approached. With this, we hope to encourage more systematic interdisciplinary research efforts geared at unraveling the many unsolved, yet utterly fascinating mysteries of dermatological pattern formation. In short: never a dull pattern!

### Prelude 1: Tracing skin patterns

Pattern recognition is the quintessential skill of a dermatologist. His ability to recognize the target lesions of erythema multiforme, the Wickham's striae of lichen planus and the geometric picture of factitial dermatitis affords him an advantageous position in therapy. Furthermore, the pattern of fingerprints provides a means of identifying every single one of the 6 000 000 000 people on our planet. It even distinguishes between identical twins. In addition, the distinctive palmar lines have spawned the thousands of spurious predictions of palmistry.

Some patterns are indicative of ageing, such as wrinkles and the similar ridging of the fingernail plate. Onychogryphosis and pincer nail also reflect ageing keratin synthesis. The shoreline nail pattern and Beau's lines hark back to prior illness. Leukonychia is the sign of prior local injury to the nascent nail plate. The cutaneous horn stands as a dramatic sculpture of sun damage.

We first learn to recognize the distinctive branching Christmas tree pattern of pityriasis rosea, with its heraldic mother patch. Similar symmetrical branching patterns are

seen at times with seborrheic keratoses. The peripheral nerve routes are revealed by the patterns of pain and blisters in herpes zoster.

More patterns arise from the disease. These range from the rare, tinea imbricata to the common alopecia areata and the fish scaling of ichthyosis. Moreover, genetic determinants account for a singular lot of common as well as rare patterns. Think of the common horizontal versus the V-shaped anterior hairline. Think of curled versus straight hair and then consider the rare genetic uncombable hair. No one can fail to recognize the patterned hair loss of age.

Among the rare congenital and gene responsible cutaneous patterns, we see linear markings at embryonic closure lines such as linea pigmentosa. We see the grooves of nasal lines, branchial fissures and preauricular sinuses.

The most remarkable and often inapparent patterns are those resulting from the fact that we may inherit two distinct embryonic skins. This mosaicism accounts for the lines of Blaschko. These are V- or S-shaped lines of the embryonic juncture of the twin skins. They account for





Figure 1. Peacock feather.

the localization of epidermal naevi as well as the distribution of a variety of skin diseases.

It is these genetically distinct skins that swirl, but do not mix, on the coating of the embryos. The most vivid result is seen in *incontinentia pigmenti*. Such mosaicism was first recognized by Mary Lyons, hence the descriptor, *lyonization*.

Many of the skin patterns require special techniques for their sighting. Thus, to see the pattern of sweat pores, one requires surface staining with *o*-phthalaldehyde. Magnification brings out the tiny patterns of the scabietic burrows. Others are without recognition because of our

## Prelude 2: Pattern formation in skin diseases – thoughts and predictions

It is axiomatic to state that normal skin is highly patterned and its disorders reflect that patterning (1). No two regions of skin are identical excepting the conservation of bilateral symmetry. The heterogeneity of skin ecology, its patterning, is based on unique gross and cellular make-up, which in turn reflects the heterogeneity in molecular constitution, molecular expression and molecular interaction.

The sharp and easily recognizable patterns of skin disease reflect the underlying differences in regional skin. Morphologically, this is seen, for example, in *acne vulgaris* of the sebaceous follicle in the seborrheic areas and androgenic alopecia of the hormone-sensitive hair follicles on the scalp. Disease pattern, however, is based on the pathology or aberrations of constituent regional molecules, induced by multiple aetiologies: genetic, immunological, physical, chemical, infectious, etc. Studies of molecular mechanisms of skin disease have revealed many examples of molecular aberrations, which are responsible for the disease.

A good example of heterotopic distribution of members of a gene family is amongst the keratins (2). Genetic mutations in specific keratins generate disorders unique to specific histological regions, for example, mutation of K6a expressed in palmar/plantar skin (*pachynychia congenital*),

failure to understand their hieroglyphic nature. We must await a Champollion to reveal them. Confocal microscopy, scanning electron microscopy, skin resistance measurements and sweat prints are a few of the tools available for enlarging our atlas of skin patterns. Magnification of our patient's skin as well as of our imagination will reveal new exciting patterns.

And recall that patterning of the skin extends three dimensionally to the cross-sections of the histopathologist. I was taught that a diagnosis could be made by simply viewing a slide under low power to recognize diagnostic patterns.

Human skin has evolved into a bland, uniform, largely hairless covering. It has little of the dramatic coloring of animals, butterfly wings or peacock feathers. This has led to skin envy on the part of many humans, and in turn to the exquisite colorful skin patterns drawn by tattoo artists.

The essential reference for understanding patterns is *The Self Made Tapestry: Pattern Formation in Nature*, by Phillip Ball, Oxford University Press, 1999. In that work, you will learn how an activator-inhibitor system accounts for the pelt pattern of the giraffe, and with your computer you can explore the recent finding that the eye pattern of a peacock feather comes from the diffraction of light by precision arrays of microscopic photonic crystals (Fig. 1).

Enjoy the poetry of your patients' many patterns, for they are all unique!

Walter B. Shelley  
Medical University of Ohio  
Toledo, OH 43614  
USA

E-mail: [wshelley@meduohio.edu](mailto:wshelley@meduohio.edu)

of K4 and K13 in mucosal skin (white sponge naevus), of K5 and K14 in truncal skin (*epidermolysis bullosa simplex*), of K1 and K10 in interfollicular skin (*epidermolytic hyperkeratosis*) and of hHb6 keratin in the hair shaft (*monilethrix*). Mutations in members of collagen and associated gene families give rise to distinct cutaneous clinical presentations (e.g. 3). Amongst autoimmune disorders, aberrant antibodies to specific epidermal desmogleins give rise to either superficial or deep pemphigus depending on the specific desmoglein attacked (4). The specific location of the immunosuppressive molecule CD200 to the follicular bulge could explain the preservation of that structure in alopecia areata (5). Even in infectious diseases, the distribution of infection appears to depend on some specific regional molecular characteristic. Recently, it was found that the papilloma virus preferentially infects hair follicle stem cells (6,7); indeed, this association could explain the discrete lesion generated by this infection.

In our view, we would predict that when the disease pattern is not typical, the molecular basis for that disorder is also not typical. In the latter case, the agent may differ molecularly, such as a mutant variety of an infectious agent, or the resident skin may differ such as a genetic polymorphism of a structural or regulatory molecule. The prediction would extend to the idea that the therapeutic approach may have to be modified to meet the situation – pharmacogenomics.



In summary, it is our opinion that dermatological diseases are highly patterned because the molecular make-up of skin is also highly patterned: pattern reflects function, function reflects morphology, morphology reflects molecular structure and disease reflects molecular perturbation – caused by manifold and sundry aetiologies. By understanding molecular structure, molecular networks, molecular properties and the control of molecular expression, we will understand the disease and its therapies. What generates cutaneous patterning and controls it? Ah, but that is the question...! (e.g. 8–13).

K. Stenn, S. Parimoo and Y. Zheng  
Aderans Research Institute  
Philadelphia, PA  
USA  
E-mail: kstenn@aderansresearch.com

## References

1. Fitzpatrick T B et al. The structure of skin lesions and fundamentals of diagnosis. In: Freedberg I M et al.,

- eds. *Dermatology in General Medicine*, 5th edn. New York: McGraw-Hill, 1999: 13–41.
2. Rugg E L, Leigh I M. *Am J Med Genet* 2004; 131C (1): 4–11.
3. Mao J-R, Bristow J. *J Clin Invest* 2001; 107: 1063–1069.
4. Payne A S et al. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 536–543.
5. Ohyama M et al. *J Clin Invest* 2006; 116: 249–260.
6. Schmitt A et al. *J Virol* 1996; 70: 1912–1922.
7. Schenkel J et al. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 893–898.
8. Augulewitsch A. *Naturwissenschaften* 2003; 90: 193–211.
9. Komuves L G et al. *Dev Dyn* 2003; 227: 192–202.
10. Chang Ch et al. *Mech Dev* 2004; 121: 157–171.
11. Guo N et al. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 9173–9174.
12. Happle R. *Arch Dermatol* 1993; 129: 1460–1470.
13. Paller A. *J Clin Invest* 2004; 114: 1467–1474.

## Viewpoint 1

The skin is like a living canvas. As this canvas covers the surface of an individual, changes that lead to non-random patterns are likely to catch people's attention, triggering fascination or revulsion, astounding the experts and providing invaluable diagnostic clues to the dermatologist. Patterns on the skin can be due to physiological, pathological or artifactual causes. Distinct regions, skin appendages, skin ridges, cutaneous nerves, blood vessels, etc. contribute to skin pattern in a manner that is either visible to the naked eye or only apparent under the microscope. When skin lesions develop, they either follow obvious anatomical differences or follow 'hidden' patterns based on genetic/developmental mechanisms that were laid down earlier and that were not obvious in the adult. Then, time adds another dimension to skin patterns through temporal cyclic regeneration of some skin appendages. It is upon this dynamic landscape of the skin that skin lesions often develop, distribute, arrange themselves and change in striking patterns that have been meticulously recorded and commented on since the earliest days of modern clinical dermatology.

And yet, the key question – 'why do all these visible patterns of (and even within) skin lesions form?' – remains one of the least investigated and most neglected among the central problems of dermatology. [Note that this question should not be confused with *histopathological* pattern formation, which is observed when these skin lesions are examined under the microscope (e.g. 1); *histopathological* pattern formation is *not* covered here.]

Perhaps, the most promising way to reduce the enduring controversies over what really causes skin lesion patterning is to explore the biological basis of these patterns. This exercise may greatly improve our understanding of the pathogenesis of a given skin disorder and allow unique insights into the general basis of pattern formation in biology as well. To this end, we propose several defined categories of biological mechanisms that produce skin patterns and that also serve as the basis for patterned skin

lesions (Table 1). In the following, we attempt to define and briefly survey these categories, as an aid to future, systematic research into the biological basis of skin lesion patterns.

### Categories of skin patterns

#### 1. Lineage-based genetic mosaicism

The basis for this pattern is that some cells are changed genetically or epigenetically during development. The abnormal functions of these cells then manifest themselves in the skin. The reason they are not distributed randomly is because these inactivation events occur very early during development and are transmitted to the progeny of these early precursor cells. In their migratory paths into the skin, the defects become outwardly visible. The changes can be transmitted through cell division because they involve somatic mutations in DNA or are mediated by epigenetic mechanisms such as X chromosome inactivation, DNA methylation, etc. (see Viewpoint 2). There are several striking examples in which lesions are limited to the left or right side of the body, regional segments, checker board patterns or linear distributions, which have been analysed so ingeniously by Rudolf Happle (2–4 and Viewpoint 2).

The patterns become macroscopically discernible if these progenies are distributed in a particular fashion. The most striking example in the epidermal lineage is the Blaschko lines (5). A recent case of linearly distributed acne turns out to be due to a somatic mutation in the fibroblast growth factor (FGF) receptor in one epidermal cell lineage (6). The mechanism leading to the Blaschko lines is fundamental and not limited to humans. When early chicken embryo epidermal cells (embryonic day 2) were labelled along the dorsal midline with replication defective virus expressing beta-galactosidase, their progenies showed multiple parallel blue lines radiating from the midline across

Table 1. Categories of patterned skin lesions

Category	Manifestation	Mechanism
1. Genetic mosaicism, lineage based	Blaschko lines, segments, checkerboard patterns	Somatic mutations, epigenetic changes
2. Region-specific patterns	Regional specificity: types of skin and appendages, arrangement of appendage elements in a region	Based on developmental processes, stochastic events (reaction–diffusion)
3. Interactions with melanocytes	Melanocyte distribution pattern, vitiligo	Pigmentation
4. Anatomically or physiologically based	Acne vulgaris fungi in nails, flea in hairs, atopic eczema, hypertrophic scar, keloid, pressure sore	Particular structures, local moisture, local chemistry, physical tension, pressure
5. Hair cycle based	Alopecia, cyclic alopecia, transversing hair waves	Regulation of hair cycle phases
6. Modulation by hormones	Sexual dimorphism, androgenic alopecia	Different responses to sex hormones
7. Interactions with environment	UV dermatitis, liverdo reticularis, summer/winter coats of some animals	Sun exposure, cold exposure, seasonal changes
8. Artificial	Tattoo, breast implantation, liposuction, alteration of body contour	Culture based, message display, cosmetic surgery, iatrogenic

the dorsal skin of late chicken embryos resembling Christmas tree branches (7).

## 2. Region-specific patterns

Regional specificity implies that different skin regions such as the scalp, beards, eyebrows, facial region, lips, palms, nails, mammary glands, sweat glands, etc. have different characteristics. Epidermal precursors are initially multipotent and competent to form all these different structures. During development, special domains of dermis begin sending specific messages to the epidermis. Through a series of epithelial–mesenchymal interactions, these different skin domains with special structures and functions gradually emerge. The integument diversifies to endow different functions to different parts of the human skin. When a molecule fundamental to these processes is mutated, multiple epithelial organs may be affected as seen in ectodermal dysplasia (8). When lesions are specific to certain regions, they form specific patterns. For example, inherited structural defects of hair and nails evidently are limited to where these types of skin appendages are present.

How these dermal specificities and epidermal competence are set up in development is still under investigation. A model based on a skin Hox code was proposed, suggesting that different combinations of Hox gene expression may be the basis of skin regional specificity, and may set up the subsequent differences in diffusible morphogens and adhesion molecules (9). Indeed, there are spatiotemporally defined, specific HOX expression patterns in human skin (10) and the Hox expression patterns of dermal cells derived from different topological skin regions are different (11). Most interestingly, the characteristics of these different skin regions have been shown to ‘intraconvert’, i.e. respecification to an ectopic fate from the original characteristics through pathological process or experimental manipulation.

For example, the engrailed pathway was shown to be involved in defining the mesenchymal characteristics of the ventral versus the dorsal paw (12). Tbx4 and Tbx5 are shown to be involved in defining the identity of the chicken leg versus wing and hence scale or feather forming dermis (13). Epidermal cells can trans-differentiate and convert hairs into glands or scales to feathers under the influence of retinoic acid or by ectopic expression of specific molecules such as beta-catenin (14–16). A recently engineered K14–noggin transgenic mouse shows that sweat glands are trans-

formed to hairs (17), while noggin overexpression under the neuron-specific enolase promoter can convert outer root sheath keratinocytes into sebocytes (18). An adult cornea can also be diverted to form pilosebaceous units when they are confronted with embryonic hair forming dermis (19). These observations imply that the establishment of specific regions is based on a balance of molecular signalling networks. Understanding the regulation of skin regional specificity has the potential to enable the manipulation of epidermal stem cell fate for medical applications.

Another interesting aspect is the arrangement of individual appendage elements within the region. During skin development, hair primordia are laid out in sequential order and their arrangement and orientation reflect a propagating global wave of skin appendage formation. Loss of frizzled 6 in transgenic mice leads to the formation of multiple whirls (20), suggesting the involvement of the wnt pathway in this process. In humans, the whirls of scalp hairs are most apparent [reviewed in Ref. (21)], yet the formation of hair whirls is not entirely under genetic control. A pair of homozygotic twins was shown to have one and two whirls, respectively (22). Likewise, fingerprints of homozygotic twins are similar but non-identical (23). Therefore, stochastic events involving physico-chemical interactions such as reaction–diffusion are likely to be involved [reviewed in Ref. (24) and references therein]. Knowing how these morphogenetic processes work is not only important for understanding the biological basis of skin lesion patterns, but also for individual identification and engineering of the skin.

## 3. Pattern formation by interactions with melanocytes

The patterns observed in categories 1 and 2 involve only epidermal and dermal cells. As development proceeds, the presumptive skin continues to build its complexity by interacting with other tissues, such as nerves and blood vessels. One most apparent interaction is the immigration of melanocytes. Melanoblasts from the neural crest migrate into the presumptive skin and may form dramatic visible patterns as seen in zebra stripes and leopard spots. In humans, individuals also have skin regions with different levels of pigmentation (8). For example, the palm is of lighter colour than the dorsal part of the hand. This is

because there are fewer melanocytes in the palm, while the reverse is true for skin in the anogenital region and the nipple. Recent work suggests that the high DKK (a wnt pathway antagonist) level secreted by palm fibroblasts may contribute to the establishment of this pattern (25). In piebaldism, the white tufts of frontal and eyebrow hairs result from a mutation in the stem cell factor receptor, KIT, with the subsequent absence of melanocytes in a defined skin region (8). While the biochemical basis of this lesion is now clear, how such a sharply demarcated region is defined or how melanocytes enter or avoid a particular region in human skin is still totally unknown.

#### 4. Anatomically or physiologically based patterns

Because sensory skin nerves innervate a defined dermatome, some lesions may be manifested along this domain when this nerve is preferentially affected. For example, herpes varicella-zoster virus spreads along sensory nerve fibres, and patient's skin lesions follow a strikingly segmental, zonal distribution (26). Likewise, Lesions can be distributed along the blood supply delivered by the peripheral skin blood vessels. Venous and arterial ulcers as well as vascular malformations are patterned by the underlying blood vessel pathology. In diabetes, the skin ulcers occur more in the distal end of the lower extremities because of poor blood supply to reach these skin regions. And infectious agents that selectively target specific skin appendages (e.g. *Demodex folliculorum* mites, lice: hair follicle) will evidently cause skin lesion patterns explained by the distribution of these skin appendages in a given skin territory.

Along the same lines, different regions of human skin show different, developmentally determined characteristics, which translate into different skin lesion patterns, based on the different physiological and anatomical properties of each region. For example, in seborrheic dermatitis, the follicular distribution pattern of hyperkeratotic or inflammatory skin lesions is determined by the distribution of pilosebaceous units and the microflora that colonize them. Atopic eczema tends to favour particularly moist flexural skin. *Candida* and dermatophyte infections preferentially target intertriginous skin. Regions with high physical pressure tend to develop wounding or ulcers or display pressure urticaria, especially in conditions of stasis and a relative lack of oxygenation. During wound healing, hypertrophic scars tend to develop more frequently in anatomical areas, exhibiting higher skin tension (27). Prevention or treatment of patterned skin lesions may be achieved by changing or respecting these local characteristics (e.g. by adapting surgical procedures so as to reduce tension and thereby the amount of scar tissue formation in a given skin region).

#### 5. Hair cycle-based patterns

A special subcategory of 'Anatomically or physiologically based patterns', which for practical purposes we treat here as a separate pattern-forming mechanism, relates to the cycling transformation of hair follicles between phases of growth (anagen), regression (catagen), hair shaft shedding (exogen) and relative rest (telogen) (28,29). The differentiation products of these skin appendages (hair shafts) can disappear and reappear temporally. If club hairs are retained in the follicular canal, the macroscopic appearance will remain largely unchanged. If hair filaments are dis-

lodged while new hairs have not grown back, instead, bald regions form. The classical clinical example for this is alopecia areata, an autoimmune disorder whose pattern is hair cycle based in a dual sense: the inflammatory cell infiltrate in alopecia areata exclusively attacks hair follicles that are in their active growth stage (anagen), and then alters their normal cycling behaviour by prematurely catapulting them into catagen, along with – sometimes dramatic – wave-patterned hair shaft shedding (8,30).

If hairs fall out at a rather specific time point of the hair cycle, followed by later regrowth, this can produce a moving wave of bald and hairy regions. This is not only seen in alopecia areata, but, e.g. also in the premature and precise shedding of hair shafts in *Foxn1* and *Msx2* null mice (31,32). In humans, hair follicles cycle independently ('mosaic' hair follicle cycling) so that the dramatic wave patterns typically seen in mice (33) are quite unusual. In any case, the pattern-forming mechanism here is that certain skin structures have been developmentally programmed to undergo cyclic transformations (29), which can produce patterned skin lesions in later life.

#### 6. Hormonally based patterns

Upon puberty, skin appendages in specific regions are transformed when sex hormone pathways, estrogens and androgens are activated. Sex steroids not only prominently affect hair follicles, but also the hypertrophy/atrophy status of sebaceous glands or the melanogenic activity of epidermal melanocytes, giving rise to hormonally based patterns of skin lesions, as seen, e.g. in acne, androgenetic alopecia and hirsutism. Different sexual dimorphism characteristics are endowed in mammals including humans (34). A dramatic example of this is also seen in birds, namely in the different feathering between roosters and hens (35). In human beard, axilla and genital regions, hair follicles are transformed from the vellus to the terminal hair. With increasing age, the reverse tends to occur, leading to androgenic alopecia, while vellus hairs can be transformed into unwanted terminal hairs (e.g. on the upper lip and lower legs) when properly stimulated by androgens, leading to hirsutism. Here, terminal hairs in the frontal and parietal scalp are affected but not those in the occipital region. As a result, the hairline recedes gradually on a patient's foreheads.

The long unclear molecular question as to why scalp and occipital hairs have different responses to sex hormones is becoming increasingly understood because hair follicles of a defined skin region seem to be developmentally programmed to respond with strikingly distinct changes in gene and protein expression, namely of key hair growth-modulatory agents, to stimulation with androgens or estrogens (29,36,37). Thus, hormonally based skin lesion patterns are also results of region-specific developmental programming.

#### 7. Environmentally based patterns

Skin patterns can also result from interactions with the environment, particularly in terms of light and temperature. For example, chronic sun exposure of human skin leads to the characteristic signs of actinic skin damage, with the UV light-induced patterns corresponding to unclothed skin regions. Cold exposure triggers the reticular patterns of livedo reticularis and livedo racemosa and causes blood and/or blood vessel-based pathology to become clinically apparent in defined vascular territories (e.g. in

Raynaud syndrome and cryoglobulinemia) (8,26,38). In nature, changes in the length of the light period that are translated into changes in the plasma melatonin and prolactin level can trigger animals to change to a longer/shorter or whiter/darker coat so as to improve their chances for survival during a given season (39). Now that we know that human and rodent skin and hair follicles are even extrapituitary sites of melatonin synthesis (40–42), one wonders to which extent environmental cues (such as the length of the light period) can also affect seasonal changes in the quality, quantity and distribution of patterned skin lesions.

### 8. Artificial

In this category, we can liberally group culture-based patterns of skin 'lesions', such as tattoos, breast implants, hair transplants, abdominal liposuction, etc. These artificial patterns are meant to alter the body contour and display body messages to a defined social environment. Of course, some diseases can arise secondarily from these procedures and then also present as skin patterns (e.g. allergic eczema against henna allergens arising in a tattoo).

A true understanding of abnormal conditions is bred by a genuine understanding of what is normal. Here we have surveyed possible biological and other mechanisms that underlie patterns of skin lesions. Through this exercise, we also hope to get closer to explaining the many – still mysterious – patterns of reoccurring skin lesions (often even *in loco!*) that characterize many chronic inflammatory skin diseases such as psoriasis, lichen planus, dermatomyositis, lupus erythematosus and Reiter's disease (8,30). None of these patterns can as yet be convincingly classified into one of the above categories for which reasonable biological explanations are available. Also, once we have been able to explain the remaining mysteries of pattern formation in and of skin lesions, chances are that we will also have come much closer to clarifying the pathogenesis of these dermatoses. This will confirm the classical insight that pattern formation is at the very basis of life and its many states of dysfunction (43,44). Viewed from this perspective, the skin and its lesional patterns become far more than a living canvas, and turn into a window to an as yet undiscovered world of biology and pathology.

### Acknowledgements

We thank Violet Shen, Randall B. Wideltz, Tailan Tuan and Maksim Plikus for input. CMC is supported by grants from NIAMS of NIH, USA. RP is supported by grants from BMBF and DFG, Germany.

Cheng-Ming Chuong  
Department of Pathology  
Keck School of Medicine  
University of Southern California  
Los Angeles, CA  
USA  
E-mail: chuong@pathfinder.usc.edu  
Ralf Paus  
Department of Dermatology  
University Hospital Schleswig-Holstein  
University of Lübeck  
Lübeck  
Germany  
E-mail: ralf.paus@uk-sh.de

### References

1. Ackerman A B et al. *Histologic Diagnosis of Inflammatory Skin Diseases: An Algorithmic Method Based on Pattern Analysis*, 2nd edn. Baltimore, MD: Wilkins & Wilkins, 1997.
2. Happle R. *Arch Dermatol* 1993; 120: 1460–1470.
3. Happle R. *Semin Dermatol* 1995; 14: 111–121.
4. Happle R. *Hautarzt* 2004; 55: 964–968.
5. Jackson R. *Br J Dermatol* 1976; 95: 349–360.
6. Munro C S, Wilkie A O. *Lancet* 1998; 352: 704–705.
7. Chuong C-M et al. *Cell Biol Biochem* 1998; 76: 1069–1077.
8. Bologna J et al., eds. *Dermatology*. London: Mosby, 2003.
9. Chuong C-M. *BioEssays* 1993; 15: 513–521.
10. Stelnicki E J et al. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 110–115.
11. Chang H Y et al. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 12877–12882.
12. Loomis C A et al. *Nature* 1996; 382: 360–363.
13. Rodriguez-Esteban C et al. *Nature* 1999; 398: 814–818.
14. Robinson M E et al. *Experientia* 1990; 46: 513–517.
15. Dhouailly D et al. *J Embryol Exp Morphol* 1980; 58: 63–78.
16. Wideltz R B et al. *Dev Biol* 2000; 219: 98–114.
17. Plikus M et al. *Am J Pathol* 2004; 164: 1099–1114.
18. Guha U et al. *Am J Pathol* 2004; 165: 729–740.
19. Pearton D J et al. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 197–201.
20. Guo N et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 9277–9281.
21. Plikus M, Chuong C-M. *J Invest Dermatol* 2004; 122: VII–IX.
22. Paine M L et al. *Hair J Invest Dermatol* 2004; 122: 1057–1058.
23. Jain A K et al. *Pattern Recognit* 2002; 35: 2653–2663.
24. Jiang T-X et al. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 117–136.
25. Yamaguchi Y et al. *J Cell Biol* 2004; 165: 275–285.
26. Kasper K L et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 16th edn. New York: McGraw-Hill, 2004.
27. Tredget E E et al. *Surg Clin North Am* 1997; 77: 701–730.
28. Paus R, Cotsarelis G. *N Engl J Med* 1999; 341: 491–497.
29. Paus R, Foitzik K. *Differentiation* 2004; 72: 489–511.
30. Stenn KS, Paus R. *Controls of hair follicle cycling. Physiol Rev* 2001; 81: 449–494.
31. Militzer K. *Cells Tissues Organs* 2001; 168: 285–294.
32. Ma L et al. *Development* 2003; 130: 379–389.
33. Suzuki N et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 9680–9685.
34. Wheeler M D. *Phys Endocrinol Metab Clin North Am* 1991; 20: 1–14.
35. Mayer J A et al. *Differentiation* 2004; 72: 474–488.
36. Inui S et al. *FASEB J* 2002; 16: 1967–1969.
37. Conrad F et al. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2005; 10: 243–246.
38. Sterry W, Paus R. *Checkliste Dermatologie*, 5th edn. Stuttgart: Thieme, 2005.
39. Rose J et al. *Gen Comp Endocrinol* 1987; 65: 212–215.
40. Slominski A et al. *FASEB J* 2002; 16: 896–898.
41. Slominski A et al. *J Cell Physiol* 2003; 196: 144–153.
42. Kobayashi H et al. *FASEB J* 2005; 19: 1710–1712.
43. Sengel P. *Morphogenesis of Skin*. Cambridge: Cambridge University Press, 1976: 218–251.
44. Ball P. *The Self-made Tapestry: Pattern Formation in Nature*. Oxford: Oxford University Press, 1999.

## Viewpoint 2

During my entire professional life, I was interested in pattern formation of cutaneous mosaicism. Some of my concepts and hypotheses have been confirmed in the meantime, some turned out to be wrong, whereas others are still waiting to be challenged at the molecular level.

Here I would like to discuss some concepts and doctrines that are still controversial, and to describe perspectives regarding further research in this field.

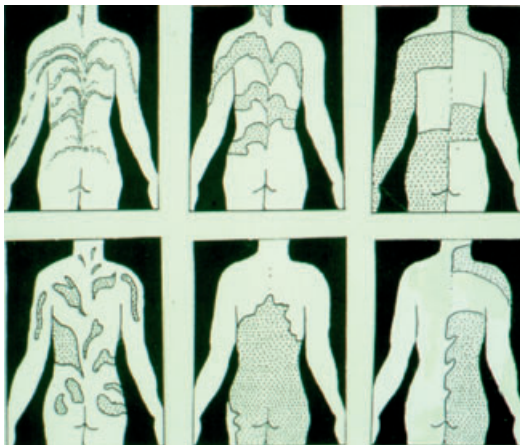
### *The lines of Blaschko, a well-established pattern*

The concept that Blaschko's lines (Fig. 1) visualize the dorsoventral outgrowth of a mutant cell clone (Fig. 2) was advanced, in German language with English summaries, during the years 1977/1978 (1,2). Today this view is generally accepted. I still take pride in the fact, however, that my first paper written in English on this subject, entitled 'Genetic mechanisms which may explain the pattern of Blaschko's lines', was rejected in 1977 by the British Journal of Dermatology. One of the reviewers thought that my ideas were too hypothetical and far-fetched. At that time, I was so demoralized that I did not submit my paper to another journal. But 8 years later essential parts of the manuscript were published, with only minimal updating, in *Human Genetics* (3), and the article still turned out to be taken as novel.

Presently, mosaicism has been proven at the cellular level in many disorders following Blaschko's lines (4). From animal experiments, we can conclude that the concept of dorsoventral proliferation of two different cell clones holds true (5,6), although a direct proof in human skin does not exist and is unlikely to be feasible.

### *Genomic versus epigenetic mosaicism*

Two major categories of mosaicism can be distinguished (4). The pattern of Blaschko's lines may reflect genomic



*Figure 1.* Archetypical patterns of mosaicism in human skin. Type 1a: lines of Blaschko, narrow bands; type 1b: lines of Blaschko, broad bands; type 2: checkerboard pattern; type 3: phylloid pattern; type 4: patchy pattern without midline separation; type 5: lateralization.



*Figure 2.* Proposed explanation of the fountain-like pattern of Blaschko's lines on the back. The transversal proliferation of precursor cells starts from the primitive streak and interferes with the longitudinal growth and increasing flexion of the embryo.

mosaicism that is usually caused by a postzygotic mutation, but occasionally may also originate from a prezygotic event in the form of gametic half-chromatid mutation (7). Or, it may reflect epigenetic mosaicism that would be either X-linked or autosomal.

### *Lyonization: X-linked retrotransposons and the lines of Blaschko*

Functional X-chromosome mosaicism (lyonization) explains the systematized linear patterns as observed in incontinentia pigmenti, Goltz syndrome, Conradi-Hünermann-Happle syndrome, Partington syndrome and various other X-linked genodermatoses (4,7). These linear skin disorders most likely reflect the action of retrotransposons (4).

As far as we know today, experimental evidence indicates that both X-linked and autosomal epigenetic mosaicism is caused by the action of retrotransposons (8). On the X chromosome, a significant accumulation of LINE-1 retrotransposons was found in the region of the X-inactivation centre at Xq13 (8), and this finding most likely reflects a functional significance (9).

### *Heritable autosomal mosaicism: the role of retrotransposons*

Retrotransposons are particles of retroviral origin. They are interspersed in large numbers in the genome of plants and animals (10). Some retrotransposons are able to silence or activate the expression of a neighbouring gene by methylation or demethylation. At an early developmental stage, the action of such 'metastable epialleles' may result in heritable – but non-Mendelian – traits characterized by a variegated coat pattern reminiscent of the lines of Blaschko. Examples are the mouse mutant viable yellow agouti (11,12) and the brindled trait in dogs (13).

In human medicine, cases of autosomal pigmentary mosaicism visualizing the lines of Blaschko may show, by way of exception, a familial aggregation (14,15). In the past, this was difficult to explain. It seems conceivable that the

action of a retrotransposon may account for such familial cases (13).

In the near future, research on retrotransposons will almost certainly play a major role in the elucidation of the genetic basis of mosaic phenotypes visualizing the lines of Blaschko, but also of other disorders including skin cancer.

### *Heritable autosomal mosaicism: parandominance and the lines of Blaschko*

An alternative explanation of the familial occurrence of autosomal mosaic traits is the concept of parandominant transmission (16). Heterozygous individuals are usually healthy. Only if allelic loss would occur at an early developmental stage and gave rise to a homozygous cell clone, the disorder would become manifest as a mosaic.

This concept has been proposed to explain familial cases of sebaceous naevus (17) as well as of other mosaic phenotypes such as Klippel–Trenaunay syndrome (18). Molecular proof is so far lacking.

### *Are Blaschko's lines of ectodermal origin?*

Some authors are convinced that the pattern of Blaschko's lines is exclusively of ectodermal origin (19). Celia Moss has advanced the hypothesis that epidermal cells follow Blaschko's lines, but fibroblasts may not (20).

I hesitate to believe this. For example, the lesions of focal dermal hypoplasia clearly follow Blaschko's lines, and they are definitely of mesodermal origin. Other examples suggesting the possibility of a mesodermal origin of Blaschko's lines are linear atrophoderma of Moulin (21) and linear progressive fibromatosis (22).

To reconcile her ectodermal theory with such mesodermal disorders, Moss (20) has offered the auxiliary hypothesis that the dermal deficiency may be secondary to epidermal pathology. I think that this is a less likely explanation of mesodermal defects along Blaschko's lines. Future research may show which view is correct.

### *Facial lines of Blaschko are intersecting*

Another problem arose when we studied the arrangement of Blaschko's lines on the head and neck (23). We documented a definite crossing of lines, sometimes even at an angle of 90° (Fig. 3). Does this mean that the direction of embryonic movements is highly variable on the head? Or do particular disorders give rise to particular patterns? I feel that the second explanation is less likely, but the question has so far not been settled.

### *Lateralization: a unique pattern of lyonization*

Congenital hemidysplasia with ichthyosiform naevus and limb defects (CHILD) syndrome F is caused by mutations in NSDHL localized at Xq28 (24,25). NSDHL controls the production of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, an enzyme involved in cholesterol metabolism. In typical cases, the CHILD naevus shows a unilateral, diffuse involvement with a clear-cut midline demarcation (Fig. 4) (26). This lateralization has to be categorized as a pattern of lyonization which is, however, strikingly gross. I have hypothesized that the origin of a clone of organizer cells coincides and interferes with the event of X-inactivation

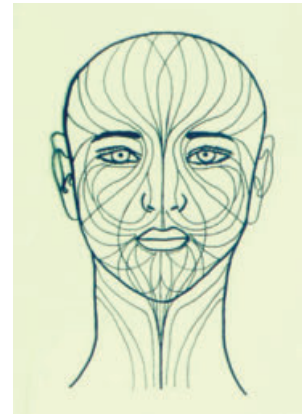


Figure 3. Facial lines of Blaschko showing definite crossing (23).



Figure 4. Lateralization pattern of CHILD syndrome.

(7,27). Another explanation would be a defective function of the sonic hedgehog pathway in which NSDHL is involved, resulting in a disturbed left–right asymmetry (28).

However this may be, the lateralization pattern of CHILD syndrome apparently heralds a gene that plays a pivotal role in pattern formation at an early developmental stage.

### *The checkerboard pattern*

The human pigmentary system appears to be particularly divergent with regard to mosaic patterns (Fig. 1). A flag-like arrangement with a strict midline separation has been observed in cases of chimaerism (29). Clinical examples visualizing a mosaic checkerboard pattern are speckled lentiginous naevus and Becker's naevus (4,30).

### *The phylloid pattern: a new subject of dermatological research*

The phylloid pattern is characterized by multiple leaf-like or oblong macules reminiscent of the floral ornaments of art nouveau style (Fig. 5) (30). The recognition of this new pattern of cutaneous mosaicism resulted, within a



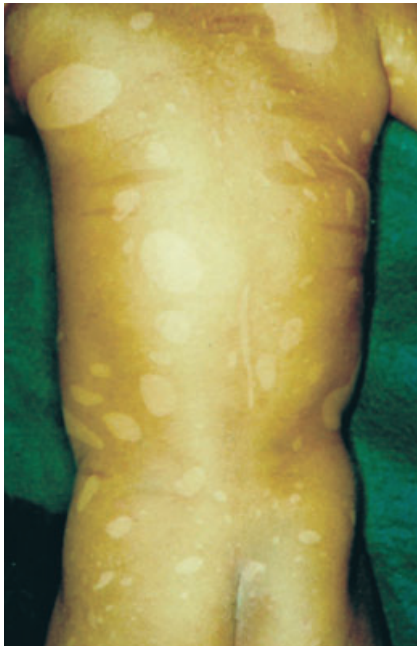


Figure 5. Phylloid hypomelanosis.

short period of time, in the delineation of a novel neurocutaneous syndrome in the form of phylloid hypomelanosis (31). This disorder is caused by mosaic trisomy 13 (32).

It is so far unknown which mechanism may cause this peculiar pattern, and why phylloid hypomelanosis is so closely related to numerical anomalies of chromosome 13.

#### *Patchy pattern without midline separation*

Large congenital melanocytic naevi usually occur sporadically. Because we never observe a corresponding disorder that involves the entire integument, I have proposed the concept of a lethal mutation surviving by mosaicism (33). Molecular evidence supporting this concept is so far not available, but can be expected for the near future.

In 2004, Mehraein (34) reported, in a case of ring chromosome 7, somatic mosaicism showing significant gain of chromosome 7 within a highly proliferating melanocytic congenital naevus. Admittedly, however, this skin lesion was not a giant melanocytic naevus.

#### *What is a naevus?*

In 1995 I proposed a new definition of the word naevus (35): 'Nevi are visible, circumscribed, long-lasting lesions of the skin or the neighboring mucosa, reflecting mosaicism. With the exception of melanocytic nevi, they do not show neoplastic growth. They never show malignant neoplasia.' My essential point was to postulate genetic mosaicism.

This paper aroused many excited discussions, especially in the French literature (36), because French dermatologists had decided, some years ago, to create an exclusively French definition of the term naevus (37). For example, I had difficulties to decide whether I should be amused or not by a commentary of Drs Delescluse and Broeckx from

Brussels (38) who wrote in 1995: 'The Francophones had proposed that the European currency should be named ECU, the Germans didn't accept it, and our ECU shall now bear the name EURO. With regard to dermatology, we should not bow to the new German suggestion, and keep our French terminology.' Fortunately, this bizarre story has come to a good end. Some years later, at a cocktail reception of an AAD meeting, Dr Delescluse took my arm and said: 'Your definition of naevus was right! Let's have a photograph together.' And so we did. In the meantime, the concept of mosaicism has been confirmed in many different types of naevi (4).

I must admit, however, that in the last sentence of my definition, I have expressed myself unclear. My statement that naevi 'never show malignant neoplasia' was misunderstood by some critics (39). Of course, naevi can undergo malignant degeneration, but the resulting malignant tumors are no longer naevi. For instance, a malignant melanoma originating from a melanocytic naevus cannot be categorized as a naevus.

If we accept the concept that all naevi by definition represent mosaics, we have to acknowledge that the salmon patch, a vascular macule that is found in about half of neonates and only in particular midline areas such as the nuchal or glabellar region, is certainly not a true naevus, but should rather be categorized as a nevus lesion. I think that this is acceptable. Otherwise, we had to create, as suggested by some critics (40), a neologism to denote the naevi fulfilling the definition as described above (35), and this would be preposterous.

#### *Zosteriform naevi do not exist*

The arrangement of naevi according to Blaschko's lines or to the checkerboard pattern is sometimes described as 'zosteriform' (41,42). It should be borne in mind, however, that this designation is incorrect (43). So far, I could not find in the literature any naevus being truly zosteriform, i.e. showing a dermatomal arrangement similar to that of herpes zoster.

#### *'Naevus unius lateris' is an irrelevant term*

Even in our times, the outdated name 'naevus unius lateris' is still used by some authors (44,45). From a genetic point of view, it does not matter whether a naevus is unilateral or bilateral in a given case. Even the CHILD naevus, the hallmark of CHILD syndrome, rather often shows, in addition to lateralization, a mild contralateral involvement (26). In other words, a 'naevus unius lateris' does not exist. This term reveals the absence of genetic thinking and is entirely useless.

#### *Naevus flammeus is an indispensable term*

According to a presently prevailing doctrine, facial naevi flammei do no longer exist because they are now called 'capillary malformations' (46-48). Dermatologists who are using this fashionable term should realize that there is no specific nosological entity to be called 'capillary malformation'.

In other words, naevus flammeus is a specific disorder reflecting mosaicism, whereas 'capillary malformation' has a rather broad meaning that includes naevus flammeus, naevus anemicus, the non-mosaic vascular lesions of Rendu-Osler disease and various other skin lesions.



Figure 6. The arrangement of facial telangiectatic nevi is often at variance with the dogma of trigeminal branches.

### Hypothesis: naevus flammeus is not dermatomal

With regard to the so-called trigeminal distribution of facial naevi flammei, we are still living in medieval times. When examining photographs of such vascular lesions (Fig. 6), I wonder why the strange belief of a causal relationship to the ophthalmic, maxillary and mandibular branches of the trigeminal nerve has been taken as a dogma since more than 100 years. Most of the presently available textbooks say that the vascular naevi of Sturge-Weber syndrome are visualizing the branches of the trigeminal nerve (46,48).

I seriously doubt that this is correct. Fortunately, I am not entirely alone with my scepticism. Many years ago Alexander (49) has voiced similar doubts. Perhaps, the arrangement of naevi flammei corresponds to a checkerboard pattern (4). This problem should be investigated by the application of modern techniques of examination to determine which view is correct.

### Conclusion

Cutaneous mosaicism continues to be a fascinating field of research. Besides the problems of pattern formation as treated in this debate, there are other mosaic phenomena waiting for further elucidation such as revertant mosaicism in autosomal recessive skin diseases (50), type 2 segmental manifestation of autosomal dominant skin disorders (51,52) or didymosis (twin spotting) (53).

With regard to pattern formation in mosaic skin disorders, the role of retrotransposons will hopefully be explored soon by a new generation of investigators devoted to experimental dermatology.

Rudolf Happle  
 Department of Dermatology  
 Philipp University of Marburg  
 Deutschhausstrasse 9  
 35033 Marburg  
 Germany  
 E-mail: happle@med.uni-marburg.de

### References

- Happle R. *Z Hautkr* 1977; 52: 935–944.
- Happle R. *Hautarzt* 1978; 29: 357–363.
- Happle R. *Hum Genet* 1985; 70: 200–206.
- Happle R. *J Dermatol* 2002; 29: 681–692.
- Cattanach B M et al. *Genet Res* 1972; 19: 213–228.
- Jaenisch R. *Nature* 1985; 318: 181–183.
- Happle R. *Arch Dermatol* 1993; 129: 1460–1470.
- Bailey J A et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 6634–6639.
- Lyon M F. *Cytogenet Cell Genet* 1998; 80: 133–137.
- Rakyan V K et al. *Biochem J* 2001; 356: 1–10.
- Rakyan V K et al. *Trends Genet* 2002; 18: 348–351.
- Whitelaw E, Martin D I K. *Nat Genet* 2001; 27: 361–365.
- Happle R. *Dermatology* 2002; 204: 4–7.
- Horn D et al. *Am J Med Genet* 2002; 112: 65–69.
- Martín Gutiérrez F J et al. *Mosaicismo pigmentario en dos hermanos de distinto sexo. 14th Meeting of the Grupo Español de Dermatología Pediátrica, Santiago de Compostela, 24–25 January 2003.*
- Happle R. *Eur J Dermatol* 1992; 2: 39–40.
- Happle R, König A. *Br J Dermatol* 1999; 141: 377.
- Happle R. *Br J Dermatol* 1993; 128: 465–466.
- Moss C et al. *J Med Genet* 1993; 30: 752–755.
- Moss C. *Am J Med Genet* 1999; 85: 330–333.
- Danarti R et al. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49: 492–498.
- Stevanovic D. *Ann Dermatol Venereol* 1977; 104: 141–146.
- Happle R, Assim A. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44: 612–615.
- König A et al. *Am J Med Genet* 2000; 90: 339–346.
- Bornholdt D et al. *J Med Genet* 2005; 42: e17.
- Happle R et al. *Dermatology* 1995; 191: 210–216.
- Happle R. *Curr Probl Dermatol* 1987; 17: 5–18.
- Grzeschik K H. *Int J Dev Biol* 2002; 46: 983–991.
- Fitzgerald P H et al. *Clin Genet* 1979; 15: 89–96.
- Happle R. *Eur J Dermatol* 1993; 3: 170–174.
- Happle R. *Hautarzt* 2001; 52: 3–5.
- Happle R. *Eur J Dermatol* 2000; 10: 511–512.
- Happle R. *J Am Acad Dermatol* 1987; 16: 899–906.
- Mehraein Y. *Am J Med Genet* 2004; 131A: 179–185.
- Happle R. *Dermatology* 1995; 191: 1–5.
- Grosshans E. *Ann Dermatol Venereol* 1996; 123: 525.
- Editorial. *Ann Dermatol Venereol* 1994; 121: 207–225.
- Delescluse J, Broeckx W. *Ann Dermatol Venereol* 1996; 123: 527.
- Souissi R. *Ann Dermatol Venereol* 1996; 123: 525.
- Guillaume J C. *Ann Dermatol Venereol* 1996; 123: 525.
- Demetree J W et al. *Arch Dermatol* 1979; 115: 875–877.
- Altman D A, Banse L. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27: 106–108.



43. Happle R. *Acta Derm Venereol* 1998; 78: 300.
44. Gibbs R C. *Arch Dermatol* 1969; 100: 643–644.
45. Bhattacharya S N et al. *J Dermatol* 1998; 25: 682–684.
46. Enjolras O, Mulliken J B. Vascular malformations. In: Harper J et al., eds. *Textbook of Pediatric Dermatology*. Oxford: Blackwell Science, 2000: 975–996.
47. Mathes E F D et al. *Arch Dermatol* 2004; 140: 979–983.
48. Grevelink S V, Mulliken J B. Vascular anomalies and tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: Freedberg I M, Eisen A Z, Wolff K, Austen K F, Goldsmith L A, Katz S I, eds. *Dermatology in General Medicine*, 6th edn. New York: McGraw-Hill, 2003: 1002–1019.
49. Alexander G L. Sturge–Weber syndrome. In: Vinken P J, Bruyn G W, eds. *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 14. New York: American Elsevier, 1972: 223–240.
50. Jonkman M F. *Am J Med Genet* 1999; 85: 361–364.
51. Happle R. *Arch Dermatol* 1997; 133: 1505–1509.
52. Poblete-Gutiérrez P et al. *J Clin Invest* 2004; 114: 1467–1474.
53. Happle R. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41: 143–161.

## Viewpoint 3

Pattern formation in nature is best thought of as a process of *symmetry breaking*. That is, an initially homogeneous system becomes spatially, and sometimes temporally, inhomogeneous. Examples include the wind-dependent generation of sand dunes, the abrupt appearance of hexagonal convection cells in a thin layer of oil heated from below and a remarkable phenomenon known as the *Belusov–Zhabotinsky reaction* where a chemical reaction in a shallow dish can spontaneously form a chemical concentration pattern (1). These latter patterns can be *stationary*, manifest as unchanging spots or stripes, or *wave like*, in which a chemical concentration profile can propagate, producing macroscopically visible expanding concentric circles or spirals.

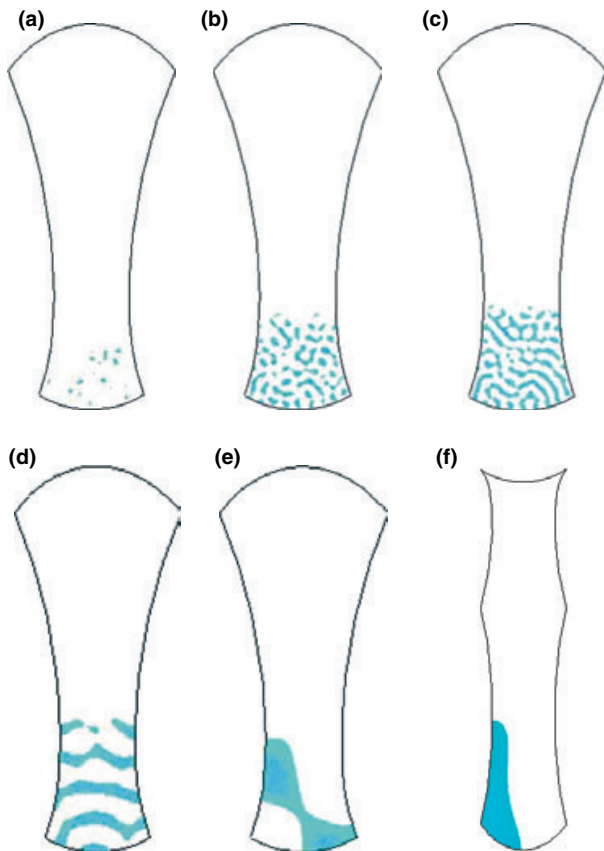
In biology, although symmetry breaking is ubiquitous, understanding the mechanisms involved has met with limited success. Embryogenesis is a paradigm of pattern formation in nature and is still poorly understood. What makes the heart localize to the left and the liver to the right? In development the heart does not remain a mid-line structure; nature makes a choice between left and right and the axial symmetry is broken. The correct outcome is not always guaranteed – witness dextrocardia – but there are extremely robust mechanisms in place to ensure such anomalies are rare. In some cases, symmetry breaking may not occur where it should; an example is the uniformly pigmented zebra, or it may occur where it should not; an example from human dermatology is the unilateral ichthyosiform eruption found in the CHILD naevus (2).

What can be learnt from the study of pattern formation in relatively simple physical systems, such as the Belusov–Zhabotinsky reaction, and how can such knowledge increase understanding of the more complex processes occurring in biology? First, inanimate systems can undergo a process of *self-organization* provided they exchange energy and/or matter with their environment (3). Second, biological systems may exploit physical constraints, such as surface tension, to generate structure without the need for an explicit genetic message (4). Finally, the analogies between inanimate pattern formation and biological pattern formation offer the tantalizing prospect that the latter may be approached and understood in a quantitative manner. Indeed, Alan Turing, the British mathematician, wrote down a series of *reaction–diffusion* equations in 1952 under the title ‘The chemical basis of morphogenesis’ that show how chemicals that

react and diffuse can form spontaneous patterns in solution (5). This is perhaps the simplest mathematical model that can exhibit self-organization. As such, it should not be interpreted in a literal sense, rather it should be considered a paradigm model. Other models for self-organization have been proposed based on different biological hypotheses, but, intriguingly, many of these models make similar predictions, suggesting possible developmental constraints which are independent of the exact details of the biological processes involved (6). It is reaction–diffusion theory that will be used here to explain symmetry breaking in dermatology.

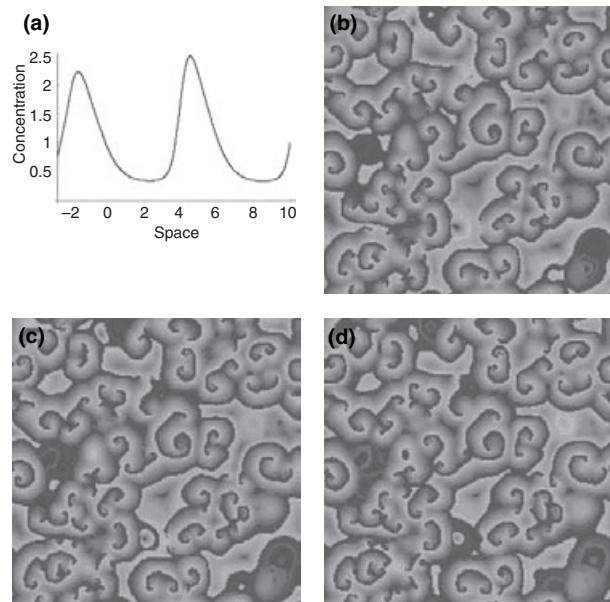
Consider naevoid patterns. How do the patterns arise? The answer remains unresolved despite many attempts at an explanation. Most authors have suggested that the patterns are due to the clonal outgrowth of abnormal cell lines during embryogenesis. For example, the morphology of quadrant naevi has been considered the result of a postzygotic mutation such that the destination of abnormal clones reflects the patterning (7). Similar arguments have been applied to bathing trunk naevi. Likewise, the lines of Blaschko have usually been attributed to clonal outgrowths of clones of cells either from the primitive streak (8) or from the neural crest (9). Yet there is evidence that suggests these explanations are inadequate. Lineage studies on embryonic mice show that early postzygotic mutated cell clones become widely dispersed throughout the body; they do not remain localized (10). In humans, evidence supporting these results is provided by studying the McCune–Albright syndrome, a genodermatosis thought to be due to a postzygotic mutation, and human chimaerism. Although both conditions exhibit large patches of uniformly brown skin over a background of normal skin, it has been shown that fine-grained mosaicism is present *throughout* the skin in the former (11), and present *throughout all* tissues studied in the latter (12). Patterns following the lines of Blaschko are occasionally observed in the McCune–Albright syndrome, but are more commonly seen in X-linked conditions where there is a random inactivation, termed *lyonization*, of one of the X chromosomes in each cell early in embryogenesis. In contrast to the previous example, it has been demonstrated that *clonality* may exist in tissue specimens of lesions following the lines of Blaschko (9,13) despite the expectation that fine-grained mosaicism secondary to lyonization should be present. The issue is confounded by a lack of data. It is

not known whether lesional tissue from *all* naevi following the lines of Blaschko is clonal. It is also unclear in some naevi as to which cell types are involved, so the relevant cell type may have been overlooked. Some authors have suggested the lines of Blaschko may represent the paths of migrating melanocytes (14,15), but this is unlikely. Mintz's allophenic mice (mosaic for black or white coat colour where the relevant genes are expressed by melanocytes) do not exhibit patterns that look like the lines of Blaschko in humans (16). In addition, it is difficult (although not impossible) to see how a gene expressed by a melanocyte could cause, for example, the blistering and hyperkeratosis seen in *incontinentia pigmenti*.



**Figure 1.** The spontaneous generation of chemical concentration patterns over the dorsum of the early human embryo. Here the evolution of the 'Brusselator' (22), a simple chemical scheme involving six distinct compounds, is modelled using two coupled non-linear partial differential equations and solved using a finite element scheme over the domain as shown. This domain is a representation of the shape of the ectodermal surface of the day 25 tri-laminar embryo (a)–(e) and the day 24 embryo (f). The bottom quarter of the surface of the day 25 embryo is the region associated with the developing thoracic somites. In (a)–(c), the temporal evolution of pattern is shown culminating in a pattern resembling the narrow-banded lines of Blaschko. Images (d), (e) and (f) represent, in the order of decreasing complexity, the broad banded lines of Blaschko, quadrant naevi and the unilateral CHILD naevus, respectively.

Here it is suggested that the patterning found in *all* naevi, ranging from the simple to the complex, can be accounted for by assuming that they are secondary to *chemical prepatterns* laid down early in embryogenesis (Fig. 1) (17). A chemical prepattern is a spatially varying chemical concentration gradient that remains fixed. Its generation from uniformity is a striking example of symmetry breaking and in the example shown it is produced by a *reaction–diffusion* process. Given the presence of the prepattern, there are three possible ways in which macroscopic pattern can subsequently develop. First, when the concentration reaches a threshold, spatially dependent gene activation may occur. It is then possible to see how the abnormal clone becomes activated in regions that follow the prepattern. The distribution of the naevus over the skin will be independent of the presence of the abnormal clone, but not of the presence of the activated gene of the abnormal clone. Second, the prepattern may act as a chemo-attractant gradient for the abnormal clone (18). In naevi following the lines of Blaschko abnormal clones may aggregate as they migrate laterally within the surface ectoderm [one ectodermal cell, as it proliferates and migrates laterally cannot be expected to produce a macroscopic band with the exclusion of the normal cell type (19)]. Finally, the chemical prepattern may be the trigger for a spatially dependent selective proliferation of one cell type over another. An interesting consequence of the chemical prepattern hypothesis is that the pattern-forming process itself may be pathological, so that in people unaffected by naevoid skin disease the lines of Blaschko *do not exist*.



**Figure 2.** Modelling erythema gyratum repens. In (a) the one-dimensional solution to a reaction–diffusion scheme is shown (21). This chemical concentration waveform is repeated end-to-end and propagates to the left with a speed of the order 1 cm per day and with a wavelength approximately 1 cm. In (b)–(d), the model shown in (a) is approximated by a cellular automaton simulation known as the *Hodgepodge machine* (21,23). Note the morphology and evolution of the rash is accurately represented; the features include growing arcs, spirals and collision fronts.

Next consider erythema gyratum repens. Here a pattern-forming process must account for the appearance of the rash, including expanding rings and spirals, and collision fronts, as well as its dynamic evolution. Hitherto, the rapid spread of the bands of inflammatory skin across the skin surface (up to 1 cm per day) has defied explanation. Some authors have suggested it is due to diffusion, but a simple calculation shows that the rate of diffusion for even small macromolecules is orders of magnitude too small (17). Once again, consider the chemical prepattern hypothesis as a possible solution to the problem. In contrast to the stationary patterns described above, in this case, the chemical gradient is a *wave* that propagates across the skin surface. Many features of the rash, including its morphology and rapid evolution, emerge naturally as a consequence of this reaction–diffusion mechanism (Fig. 2) (20,21).

Here the concept of symmetry breaking found in dynamical systems theory is applied to pattern formation in some examples of human skin disease. Although as yet unproven, the mathematics show that the mechanisms are physically well founded. Quantitative approaches to the problem of pattern formation in skin disease result in falsifiable predictions and offer the prospect of new and counterintuitive insights into pathogenesis.

Stephen Gilmore  
Department of Medicine (Dermatology)  
University of Melbourne  
Melbourne, Vic.  
Australia  
and  
Centre for Mathematical Biology  
University of Oxford  
Oxford  
UK  
E-mail: [sgilmore@bigpond.com](mailto:sgilmore@bigpond.com)  
Philip Maini  
Centre for Mathematical Biology  
University of Oxford  
Oxford  
UK

## Viewpoint 4

Patterns can be defined by passing from a homogeneous to a heterogeneous state, together with motif repetition and order of appearance. Every organ in the body harbours pattern, the most obvious being observed in skin. Embryonic and postnatal development results in three distinct steps in skin patterning.

### *Skin patterns belong to three main types, determined at three steps of embryonic and postnatal development*

First, humans are vertebrates that harbour a bilateral, dorsoventral and right/left symmetry; they are characterized by a dorsal location of neural tube, and a metamerism resulting from the segmentation of the paraxial mesoderm; all together determined at a very early stage of development. The mesodermal segmentation forms the

## References

- Ouyang Q, Swinney H L. *Nature* 1991; 352: 610.
- Happle R. *Arch Dermatol* 1993; 129: 1460–1470.
- Coveney P, Highfield R. Nature's artistry. In: *Frontiers of Complexity: The Search for Order in a Chaotic World*. London: Faber and Faber, 1996: 150–189.
- Stewart I, Golubitsky M. *Turing's tiger*. In: *Fearful Symmetry: Is God a Geometer?* New York: Viking Penguin, 1992: 149–188.
- Turing A M. *Phil Trans R Soc Lond* 1952; B 237: 37–72.
- Murray J D. *Mathematical Biology*. Berlin: Springer-Verlag, 1989.
- Sterry W, Christophers E. *Arch Dermatol* 1988; 124: 926–929.
- Happle R. *Hum Genet* 1985; 70: 200–206.
- Moss C. *Am J Med Genet* 1999; 85: 330–333.
- Lawson K A et al. *Development* 1991; 113: 891–911.
- Schwindinger W F et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 5152–5156.
- Klinger H P, Schwarzach H G. *Cytogenetics* 1962; 1: 266–290.
- Moss C et al. *J Med Genet* 1993; 30: 752–755.
- Ohashi H et al. *Am J Med Genet* 1992; 43: 716–721.
- Thomas I T et al. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 193–205.
- Mintz B. *Proc Natl Acad Sci* 1967; 58: 344–351.
- Gilmore S J. *Mathematical approaches to pattern formation in dermatology*. MD Thesis. Australia: University of Melbourne, 2005.
- Painter K J et al. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 5549–5554.
- Schmidt G H et al. *Development* 1987; 100: 535–541.
- Moore H J. *Br J Dermatol* 1982; 107: 723.
- Gilmore S J, Landman K A. *J Theor Med* 2005; 6 (1): 57–65.
- Pena B et al. *Phys Rev E* 2003; 68: 056206.
- Gerhardt M, Schuster H. *Physica D* 1989; 36: 209–221.

somites, which give rise not only to the vertebrae, but also to segmented dorsal dermis progenitors, as well as striated muscle progenitors, the latter migrating all over the entire body. Thus, at this first stage, the formation of different cell lineages or clones takes place. Moreover, the neural roots emerging at the intervertebral level also show such a metamerism and their distinct innervating territories are well known from the physicians.

During mid-embryonic stages, the establishment of cutaneous underlying muscles, nerves and blood vessels pattern, as well as the arrival by migration of melanocyte progenitors, occurs. Almost concomitantly, the primarily homogeneous skin becomes heterogeneous, leading to the formation of cutaneous appendage displaying characteristic patterns, like hair follicles, sebaceous, sweat or mammary glands.

Finally, during postnatal life, endogenous hormonal events like sexual hormones or lack of insulin, which

are genetically dependent on conception or can also depend in the second case on alimentary behaviour, as well as environmental events because of radiations, microbiological or wounding injuries might create or let out pre-existing skin patterns.

Such patterns have for a long time attracted the attention of dermatologists not only as they might help them in disease diagnosis, but also by the intriguing fact that they appear to follow some rules and did not simply form by accident. Adult, normal or pathological patterns might reflect or be the consequence of pre-existing patterns established during embryogenesis. During development, molecular signals occur between the mesoderm, or the migrating neural crest and their environment, like the neural tube, as well as between the forming dermis and epidermis. Some patterning events, which appear autonomous, are the results of physical diffusion of molecular signals. Moreover, new adult patterning might be the consequence of adult interactions with underlying muscles or even bones, patterning of which have been established during embryogenesis.

Biological patterning is a highly interesting mathematical topic which implies the understanding of shape creation, periodicity and symmetry breaking. We are convinced that physical and mathematical approaches might help skin pattern understanding. While skin patterns have been studied in some cases, they still deserve new interest as new results have been obtained in developmental biology.

### *(1) Skin macropattern is determined during early embryogenesis and is related to the establishment of body axes and body regions*

Skin macropattern in mammals can be mainly distinguished as head, dorsal/ventral trunk, mammary, plantar and palm regions, all of them being linked to the establishment of anterior–posterior and dorsal–ventral axes, showing a bilateral symmetry. Experiments have been mostly performed in chick and mice embryos. Skin clonal lineages have been analysed in  $\beta$ -galactosidase transgenic mice displaying an abnormal duplication in the LacZ gene, leading to the formation of a non-functional enzyme (1). The rare occurrence of homologous recombination leads to the formation of clones of  $\beta$ -galactosidase expressing cells that in skin forms lines on each side of the mid-dorsal line (Fig. 1a). A late occurrence of such an event can allow us to identify cell lineages occurring from the base of the hair matrix in hair follicle (Fig. 1b).

Likewise, local transgenesis in early chick embryo by means of replication defective virus that expresses  $\beta$ -galactosidase showed blue lines radiating from the midline across the dorsal skin (2). Thus, Blaschko's lines (3,4) may correspond to a clinal expression of a genetically altered clone that forms during early embryogenesis. They may also correspond to the segmented pathways of sensory skin nerves as some lesions such as herpes zoster may be manifested along a nerve domain.

At early embryogenesis stage, the Hox code along the anterior–posterior axis of the trunk, as well as along the proximal–distal axis of the limb, is expressed not only in the mesoderm, but also in the skin progenitors and is responsible for the future skin regional identities (5).

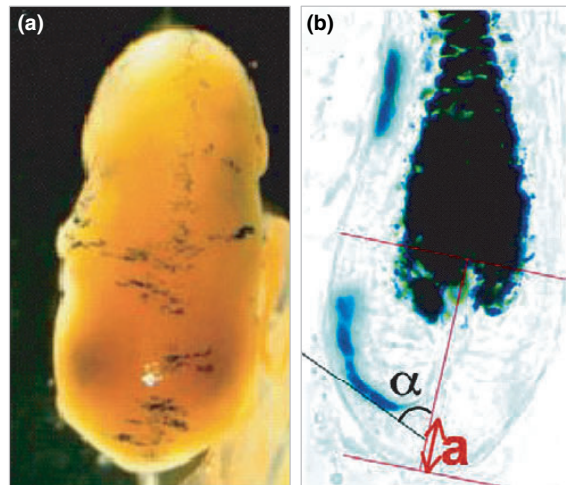


Figure 1. Skin clonal lineages in mouse embryo dorsal skin (a) and hair follicle (b). By courtesy from J. F. Nicolas.

Likewise, homeobox genes exhibit spatial changes in expression during human skin development (6).

The specification of dermal progenitors and their migration in the sub-ectodermal space (7,8) depend on intercellular interactions with their environment, which are mediated mainly by Wnts, Shh and Noggin. Skin field formation, i.e. skin macropattern, also depends on epidermal competence. The complex formation of a feathered skin, which can be triggered even in chick extra-embryonic area (8), results from a basic genetic ectodermal programme. The simplest formation of a scaled skin requires the feather program inhibition, which occurs before 8.5 days of development in the chick hind limb (9). Likewise, the choice between foot dorsal pelage and plantar skin in mice (10) or between foot dorsal scutate and ventral reticulate skin in chick (11) depends on En1 expression in the ectoderm at the limb bud stage. Another related question relies on the pattern of pigmentation of the hand and foot of black people, a pattern that exactly corresponds to the dorsal and ventral regions of the autopode, which are specified at an early stage of limb bud morphogenesis. Why does the migration of neural crest cells giving rise to melanocytes not cross the dorsal/ventral border? In fact, an increased expression of Dickkopf1 by palmar and plantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation (12).

Many dermatological questions that appear to be related to those early embryogenesis events remain unresolved. The giant child naevus may exhibit a clear-cut pattern corresponding with the mid-ventral line (13). The pattern of human male alopecia frequently spares the occipital region. Intriguingly, its dermis originates from the paraxial non-segmented mesoderm, while both the frontal and parietal dermis are issued from the neural crest (14). How might those different origins be related to a dramatic difference in their respective sensibility to testosterone? It should be noted that hair follicles of a region, of which identity is known for a long time to be defined by the dermis (15), are developmentally programmed to respond to hormonal stimulation, as they kept those properties when transplanted (16). Another still unresolved question concerns the pattern of the mammary line. The presence of

abnormal supernumerary nipples in humans always follows the primary line, which has been established at an early stage of development. What exactly is the origin of the mammary dermis? What are the signals responsible for its specification? Moreover, for each skin field the following question arises: what triggers the appearance of the first cutaneous appendage primordium? Most of the time, the first primordia in chick skin are arranged in one first row parallel to the anterior/posterior axis of the trunk or the proximal/distal axis of the limb. Moreover, in the latter case, the first scutate scales appear over the foot bone joints (17). This general rule presents exceptions, characterized by a circular or a whirl appearance of the primordia, from a centre point. This is often observed on the top of the human scalp. Experimentally, the loss of Frizzled 6 (a receptor of a Wnt family signal) leads to the formation of multiple whirls in transgenic mice (18). This is also the case when a supernumerary feather field is induced in the prospective area of the chick mid-ventral apterium (i.e. nude skin) by the graft of a clump of Noggin or Shh producing cells (8).

Finally, all the questions related to the early establishment of skin macropattern may deserve to be studied on a mathematical point of view, which has not yet been the case, in contrast with the skin micropattern.

## (2) *Skin micropattern: Biomathematical explanations of the formation of cutaneous appendage and pigment motifs during mid-embryogenesis*

Cutaneous appendage primordium, composed of a placode and a dermal condensation form during mid-embryogenesis, is a step of development characterized by the transformation of a homogeneous skin into a heterogeneous skin. In chick embryo, the feather micropattern is hexagonal, corresponding to the best filling of space. Once triggered by a Wnt dermal signalling [among others: (19–21)], the placode formation, which requires Eda/Edar signalling (19) and precedes that of the dermal condensation, becomes autonomous (F. Michon, unpublished results). It should be noted that mutations of Eda or Edar genes affect not only the formation of hair follicles, but also of sweat glands and teeth as shown in several ectodermal dysplasia (22). Numerous dermal–epidermal interactive signals comprising diffusible (among others: BMPs, Wnts, Shh) or trans-membrane signals (Notch system) are then involved in primordia maintenance and differentiation [for a review, see Ref. (23)]. Another unresolved question is the patterning of cutaneous nerves and blood vessels: prior to or consequence of the skin micropattern?

Skin micropattern provides a very suitable application of the most known theory of the biomathematics: reaction–diffusion. Some precursors are Kolmogorov and Rashevsky (24,25), but this theory was clearly developed by Alan Turing (26). In this framework, two substances, at least,  $u$  and  $v$  are considered. These substances evolve spatiotemporally according to diffusion and reaction. Substances are represented by their concentration  $u(x,t)$  and  $v(x,t)$  which depend on space (variable  $x$ ) and time (variable  $t$ ). The temporal variation  $\partial u/\partial t$  and  $\partial v/\partial t$  at each point  $x$ , of these concentrations are ruled by a partial differential equation (Eqn 1):

$$\begin{cases} \frac{\partial u}{\partial t} = D_u \Delta u + f(u, v) \\ \frac{\partial v}{\partial t} = D_v \Delta v + g(u, v) \end{cases} \quad (1)$$

In Eqn 1,  $D_u \Delta u$  (resp.  $D_v \Delta v$ ) is the diffusion term for  $u$  (resp.  $v$ ) and  $f(u,v)$  (resp.  $g(u,v)$ ) is the reaction term of  $u$  (resp.  $v$ ), accounting for their kinetics of production, degradation, etc.  $D_u$  and  $D_v$  are the diffusion constants for  $u$  and  $v$ , respectively. Turing has demonstrated the capacity of this system to generate symmetry breaking from an initial homogeneous concentration only perturbed by small random perturbations (typical of a living organism). This system is able, under some conditions notably on diffusion constants and on capacity to amplify small perturbations, to generate stable non-uniform concentration patterns in space. Substances  $u$  and  $v$  are called ‘morphogens’ by Turing because of their supposed ability to generate order and form. This theory is inspired by some concepts of Waddington who insisted on the importance of global factors (epigenetic), called ‘evocators’, in the establishment of form and order in biology (27). Turing formalism was intensely applied to various biological examples. Reference works presenting a wide class of applications of reaction–diffusion in biology are those of Meinhardt and Murray (28–31). Terms were added in some cases in the equations to generalize the original model and for taking chemotactic effects into account. When considering the interaction between a chemical and a cell population, cell movements are preferentially oriented to the high concentration value of the chemical (32). In the case of pure diffusion no privileged direction is determined. If chemotaxis steps in, the cellular flux includes a chemotactic term that depends on the gradient of the guiding substance. The most studied application of reaction–diffusion is far from skin patterning.

With respect to cutaneous appendages patterning, the reaction–diffusion theory relies on the biological existence of various activators and inhibitors of cutaneous appendage formation. This theory has been developed with respect to feather hexagonal pattern by C. M. Chuong laboratory (33,34), and considers BMP2 and follistatin as being, respectively, the leading inhibitor and activator proteins.

However, is this theory, declined with some variations of functions and parameters, able to explain all the different skin micropatterns? How, for example, could the triad pattern of pelage hair follicle be explained? Moreover, how could the wide and intriguing variety of pigmented patterns be explained? The introduction of morphogen kinetics (activators and/or inhibitors) also permits us to obtain spots and stripes and to control the pattern regularity by playing with interactions between morphogens, in particular with their non-linearity of allosteric type (in which we can tune the cooperative and allosteric coefficients) or competitive type (Michaelian or Meinhardt kinetics). It was spectacularly adapted for the generation of stripe (tiger, zebra, etc.) and spot patterns (hexagonal spots of a cheetah, less structured spot pattern of a giraffe). Modelling of spots and stripes uses either a diffusion–reaction system (35) or a non-Turing system like the Potts model (36). In these last models, condensation results from random cell diffusion biased by preferential attachment of cells to extracellular matrix (ECM) and enhanced local cell–cell adhesion. In the reaction–diffusion approach, bifurcation schemes to spatial patterns in two-



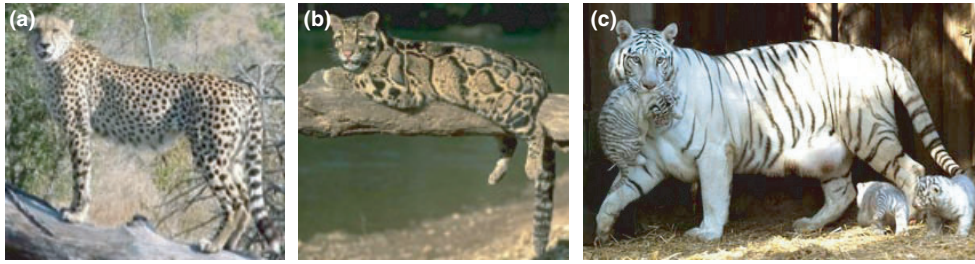


Figure 2. Skin spotting and stripping in the big cats: cheetah (a), nebulosus panther (b) and white tiger (c).

dimensional reaction–diffusion medium are considered (35), showing, for example, that the selection of stripes versus spots depends on the non-linear terms and cannot be discerned from the linearized model. The absence of quadratic terms in the reaction leads to stripes, but in most common models quadratic terms will lead to spot patterns (35). Studies have also shown that the size and the shape of the geometry have a great influence on the solution of the equation. A general trend is that the same equation, with the same parameters can produce different patterns that can then be studied in terms of size: mice and elephants do not have any pattern, angelfish are stripy and cheetahs are spotty. One hypothesis for the difference of pattern between cheetah and tiger, both similar in size, would be the size of the embryo at the stage of formation of the pigmented pattern. This provides an explication of the difference of pattern in one species between its spotty body and its stripy tail. The cheetah has spots on its body and a spotty (at the start) and stripy tail depending on its diameter – but it is not possible for a stripy animal to have a spotted tail (Fig. 2). In cheetahs, a progressive change appears on the tail from spot to stripe as the diameter of the tail decreases (Fig. 2a). When the spots are large, as in the case of the nebulosus panther (Fig. 2b), stripes appear rapidly on the tail. Reversely, according to the trends of equation compartment with size, it is not possible for a stripy animal to have a spotty tail (Fig. 2c). The adequacy of the reaction–diffusion system was also studied in growing organisms (37). For instance, angelfish exhibit observed changes in the number, size and orientation of their stripes while growing. It should be noted that some pigmented patterns do not seem to rely on the reaction–diffusion family, such as some black and white patterns, which just present a global axial symmetry and no micropattern (many examples may be found in birds or cats). In those cases, pattern may only be due to early embryonic movements of groups of melanocyte progenitors from the neural crest and should be related to the first step of patterning during development. Finally, the wide variety in skin micropattern is a challenge to mathematicians and to the reaction–diffusion formalism.

(3) Skin patterns related to adult life

Many adult skin patterns that are linked with various diseases let out pre-existing patterning that has been established during early embryogenesis, in relation with the underlying tissues or organs. However, new patterns may occur during postnatal life, for example ulcers, eschar or wound healing. Those patterns again are related to the skin underlying muscles or bones. Prevention of skin lesions may be achieved by respecting local characteristics. During the past century, guidelines developed by surgeons

have searched for elective opening incisions. Many surgeons prefer Langer’s lines (Fig. 3a) developed by Karl Langer from cadavers in rigor mortis (38,39). These lines correspond roughly to empirical minimal stretch and contraction lines by looking both at the local dermal tension (essentially because of elastic fibres) and at the loco-regional tendon–muscular action. Other surgeons (40) preferred lines oriented perpendicular to the action of the underlying muscles. More recently, Borges (41) described relaxed skin tension lines, which follow furrows formed when the skin is relaxed and are produced by pinching the skin. In Fig. 3b, arrows are oriented along the relaxed skin tension lines. Linear scars following the arrows are minimally noticeable. Their location may vary slightly among individuals. Borges’s and Kraissl’s lines are considered by some surgeons as the better guides for elective incisions of the face and body, respectively. Elastic fibres underlying Langer’s lines are parallel or perpendicular to the epidermis, while they are perpendicular to Kraissl’s and Borges’s lines. Langer’s lines also partly follow Blaschko’s lines (3,4), corresponding to zones of eruption of herpes zoster correlated with dermatomes.

Numerous authors (42,43) have suggested that traumatic or surgical wound healing follows reaction–diffusion models. Applications of the simulation results in such modelling are important in surgery and traumatology. This gives a rational basis to the use of the empirical surgical lines networks mentioned above, helping in particular the surgeon to avoid cheloids, which are observed after either traumatic wounds or surgical openings. For

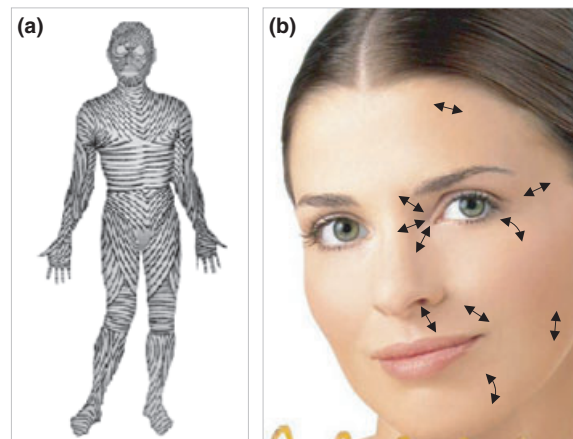


Figure 3. Two cases of empirical surgical lines networks: Langer’s lines (a) and the best surgical opening incisions in the case of face (b).

instance, both aesthetic and functional results of the healing process are highly dependent on the original orientation of the primitive cuts.

The master equations corresponding to the modelling of wound healing are given in the framework of differential systems and can be summarized as follows, where  $n(x,t)$  [resp.  $r(x,t)$ ] is the cell (resp. ECM) density in a spatial point  $x$  at time  $t$  and  $u(x,t)$  [resp.  $\partial u(x,t)/\partial t$ ] is the displacement (resp. the velocity) of the ECM with respect to the fixed  $x$  referential:

1. Cell conservation equation:

$$\underbrace{\frac{\partial n}{\partial t}}_{\text{cell density variation}} + \underbrace{\frac{\partial(n \partial u / \partial t)}{\partial x}}_{\text{convection}} = D \underbrace{\frac{\partial^2 n}{\partial x^2}}_{\text{diffusion}} + \underbrace{Rn(N-n)r}_{\text{proliferation}} - \underbrace{h \frac{\partial(n \partial r / \partial x)}{\partial x}}_{\text{migration (haptotaxis)}}$$

2. ECM conservation equation:

$$\underbrace{\frac{\partial r}{\partial t}}_{\text{ECM density variation}} + \underbrace{\frac{\partial(r \partial u / \partial t)}{\partial x}}_{\text{convection}} = \underbrace{knr}_{\text{biosynthesis}} - \underbrace{k'n(N-n)r}_{\text{degradation}}$$

3. Displacement balance equation:

$$\underbrace{\mu \frac{\partial^3 u}{\partial x^2} \frac{\partial}{\partial t}}_{\text{viscosity}} + \underbrace{E \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}}_{\text{elasticity}} - \underbrace{\beta \frac{\partial^4 u}{\partial x^4}}_{\text{stabilizing effect}} + \underbrace{d \frac{\partial[n(N-n)r]}{\partial x}}_{\text{active cell traction stress}} = \underbrace{\sigma f(u,r)}_{\text{restoring forces}}$$

The signification of the above equations is underlain by simple physical–chemical considerations: the cell and ECM balance equations indicate that the cell or ECM matter created or destroyed in a spatial point  $x$  at time  $t$  has only biological (proliferation, migration, biosynthesis and degradation) or physical (convection and diffusion) origin. The displacement equation synthesizes the balance of the forces exerted on the ECM that are responsible for its displacement. We summarized these different components responsible for the cell and ECM dynamics in Fig. 4. The parameters of the above equations are the cell diffusion coefficient  $D$ , the proliferation rate  $r$ , the haptotaxis coefficient  $h$ , the maximal cell density  $N$ , the secretion rate  $k$ , the catabolism rate  $k'$ , the Young coefficient  $E$ , the Poisson coefficient  $\beta$ , the viscosity coefficient  $\mu$ , the cell traction amplitude  $d$  and the restoring force coefficient  $\sigma$ .

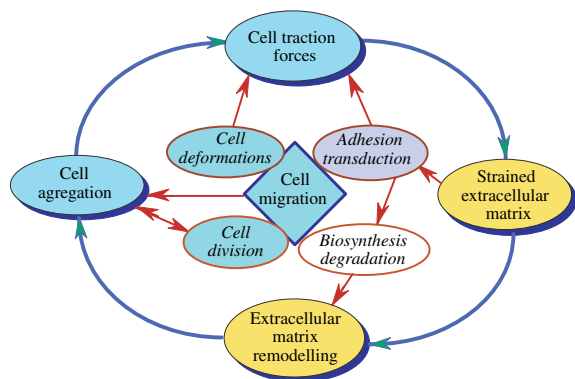


Figure 4. Components of the skin, cell migration and proliferation processes that must be taken into account in wound healing.

Such a general model has to be simplified to simulate lines networks like those described by Langer or Blaschko, keeping only, in the above equations, the diffusion and proliferation terms in the first equation, the biosynthesis and degradation terms in the second equation, and the viscosity, elasticity and cell traction stress terms in the third equation. The main difficulties lie in estimating initial conditions for the variable  $r$ : they have to take into account all viscid–elastic forces related both to dermal and muscular tensions and the present anatomic atlases are only giving data about the general direction of muscle contraction. An interesting challenge, especially for reconstructive surgery, would be now to obtain a precise functional atlas giving the local mean values of the parameters appearing in the simplified model.

In conclusion, the history of the major morphogenetic equations in mathematics has been often pushed by the necessity of explaining complex life’s forms, especially those occurring in the skin wound healing, skin annex development and skin pigmentation patterning.

Loic Forest and Jacques Demongeot  
Laboratoire Techniques de l’Imagerie  
de la Modélisation et de la Cognition  
UMR CNRS 5525  
La Tronche  
France

Frederic Michon, Sébastien Cadau and Danielle Dhouailly  
Equipe Biologie de la Différenciation Epithéliale  
UMR CNRS 5538  
Université Joseph Fourier  
La Tronche  
France  
E-mail: danielle.dhouailly@ujf-grenoble.fr

## References

- Legué E, Nicolas J F. *Development* 2005; 132: 4143–4154.
- Chuong C M et al. *Cell Biol Biochem* 1998; 76: 1069–1077.
- Blaschko J. *Die Nervenverteilung in der Haut in ihrer Beziehung zu den Enkrankungen der Haut. Beilage zu den Verhandlungen der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft VII Congress, Breslau, 1901.*
- James R. *Eur J Orient Med* 1993; 1: 42–46.
- Kanzler B et al. *Dev Dyn* 1997; 210 (3): 274–287.
- Stelnicki E J et al. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 110–115.
- Olivera-Martinez I et al. *Development* 2002; 129: 4763–4772.
- Fliniaux I et al. *Development* 2004; 131 (16): 3955–3966.
- Prin F, Dhouailly D. *Int J Dev Biol* 2004; 48 (2–3): 137–148.
- Loomis C A et al. *Nature* 1996; 382: 360–363.
- Prin F et al. *Dev Dyn* 2004; 229 (3): 564–578.
- Yamaguchi Y et al. *J Cell Biol* 2004; 165: 275–285.
- Happle R. *Semin Dermatol* 1995; 14: 111–121.
- Le Douarin N et al. *Int Rev Cytol* 1992; 138: 269–314.
- Dhouailly D. *Wilhelm Roux’s Arch* 1977; 181: 3–10.
- Paus R, Foitzik K. *Differentiation* 2004; 72: 489–511.
- Dhouailly D et al. *J Embryol Exp Morphol* 1980; 58: 63–78.
- Guo N et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101 (25): 9173–9174.

19. Mikkola M et al. *Mech Dev* 1999; 88: 133–146.
20. Chang C H et al. *Mech Dev* 2004; 121: 151–171.
21. Pearton D J et al. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102 (10): 3714–3719.
22. Bologna J et al., eds. *Dermatology*. London: Mosby, 2003.
23. Olivera-Martinez I et al. *Int J Dev Biol* 2004; 48 (2–3): 107–115.
24. Kolmogorov A N et al. Une investigation de l'équation de la diffusion combinée avec un accroissement de masse et son application à un problème biologique 1937 (Translate from Russian). In: Tikhomirov V M, ed. *Selected Works of A.N. Kolmogorov*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991.
25. Rashevsky N. *Bull Math Biophys* 1940; 2: 15–25.
26. Turing A M. *Phil Trans R Soc B* 1952; 237: 37–72.
27. Waddington C H. *Organisers and Genes*. Cambridge: Cambridge University Press, 1940.
28. Gierer A, Meinhardt H. *Kybernetik* 1972; 12: 30–39.
29. Meinhardt H. *Models of Biological Pattern Formation*. London: Academic Press, 1982: 211.
30. Murray J D. *Mathematical Biology I: An Introduction*, 3rd edn. New York: Springer-Verlag, 2002: 551.
31. Murray J D. *Mathematical Biology II: Spatial Models and Biomedical Application*, 3rd edn. New York: Springer-Verlag, 2003: 811.
32. Painter K J et al. *Bull Math Biol* 2000; 62: 501–552.
33. Chuong C M, ed. *Molecular Basis of Epithelial Appendage Morphogenesis*. Austin, TX: R.G. Landes Company, 1998.
34. Jiang T X et al. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 117–136.
35. Ermentrout B. *Proc R Soc Math Phys Sci* 1991; 434: 413–417.
36. Thüler K. Spatial and temporal distribution of coat patterns of Eurasian Lynx (*Lynx lynx*) in two re-introduced populations in Switzerland. Thesis, 2002 (Kora Bericht 13).
37. Painter K J et al. *Dev Biol* 1999; 96: 5549–5554.
38. Ridge M D, Wright V. *J Invest Dermatol* 1996; 46: 341–346.
39. Wilhelmi B J et al. *Plast Reconstr Surg* 1999; 104: 208–214.
40. Kraissl C J. *Plast Reconstr Surg* 1951; 8: 1–28.
41. Borges A F. *Plast Reconstr Surg* 1984; 73: 44–50.
42. Murray J D. *Mathematical Biology*. Berlin: Springer-Verlag, 1989.
43. Tranquillo R T, Murray J D. *J Theor Biol* 1992; 158: 135–172.



L'apparition au sein d'une peau homogène, composée d'un épiderme et d'un derme dense sous-jacent, des structures primaires des annexes cutanées (placode épidermique et condensation dermique) est un événement complexe tant au niveau des modifications morphologiques que du nombre de molécules impliquées. Tout au long de mes travaux de thèse, j'ai étudié les facteurs moléculaires gouvernant l'organisation cellulaire du derme avant et pendant la mise en place des condensations dermiques.

De part l'utilisation de techniques originales *in vitro*, j'ai identifié les mécanismes moléculaires régissant : l'arrêt de la prolifération cellulaire, événement précédant la formation de la condensation et gouverné par la protéine p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ; la migration cellulaire, indispensable à la mise en place de la condensation et nécessitant l'engagement des Intégrines sur des molécules de Fibronectine contenant l'exon EIIIA ; ainsi que la chémo-attraction médiée par BMP-7 et arrêtée par BMP-2. Enfin, j'ai montré que les facteurs nécessaires à la stabilisation de cette structure, impliquent à la fois les Intégrines et la signalisation Notch.

Grâce à une collaboration avec un mathématicien, nous proposons un modèle mathématique *in silico* intégrant l'ensemble de ces paramètres. Ce modèle rend compte, en reproduisant l'apparition et la distribution des primordia plumaires observées *in vivo*, non seulement de mes propres résultats biologiques, mais explique aussi les résultats ayant conduit depuis 1998 à classer la signalisation BMP comme inhibitrice de la formation plumaire.