

Térogénicité de l'acide 13-cis rétinolique sur les ébauches mandibulo-otiques de l'embryon de souris: approche histologique et histochimique

S. LOURYAN, R. GLINEUR, S. TAINMONT, P. VAN DAM

Université Libre de Bruxelles, Faculté de Médecine.

Laboratoire d'anatomie et embryologie humaines (Prof. J. Milaire), rue aux Laines 97, 1000 Bruxelles (Belgique).

RÉSUMÉ

L'administration orale de 400 mg/kg d'acide 13-cis rétinolique à des souris gestantes à 9 jours de gestation est responsable d'importantes malformations de la sphère oto-maxillo-faciale. Le premier signe consiste en une augmentation de la densité des nécroses observées dans la partie dorsale des deux premiers arcs à 9.5 jours. Ceux-ci se caractérisent ultérieurement par une hypoplasie relative par rapport aux témoins et les ébauches présquelettiques y apparaissent avec retard. Le cartilage de Meckel apparaît d'emblée trop arciforme et médialement situé. Les blastèmes pré-ossiculaires et prémandibulaires subissent une importante distorsion spatiale et leurs déformations, bien observables à 16 et 17 jours, permettent de discuter certains aspects de la morphogenèse précoce normale de ces éléments.

MOTS-CLÉS:

Souris, arcs branchiaux, embryon, acide rétinolique.

SUMMARY

Oral administration of 400 mg/kg of 13-cis retinoic acid to 9 day pregnant mice gives rise to important maxillo-facial malformations. The first manifestation of teratogenic effect is an increase of density of cell death arising in the dorsal part of the first two branchial arches at day 9.5. These two arches become hypoplastic at days 10 and 11, and the preskelettical anlagen appear too late in comparison to control embryos. Meckel's cartilage is too curvilinear and medially situated. Pre-ossicular and pre-mandibular blastemata develop with spatial distortions which are well analyzable at days 16 and 17. They give some arguments to discuss several features of normal early development of this area.

KEY WORDS:

Mouse, branchial arches, embryo, retinoic acid.

I. INTRODUCTION

Les effets tératogènes des rétinoïdes dans l'espèce humaine ont fait l'objet de multiples descriptions cliniques (Benke, 1984, De La Cruz *et al.*, 1984, Hall, 1984, Lott *et al.*, 1984, Stern *et al.*, 1984, Lammer *et al.*, 1984, Rosa *et al.*, 1986). L'exposition maternelle aux dérivés de l'acide rétinolique et de la vitamine A peut entraîner l'apparition d'un syndrome complexe

susceptible d'associer des malformations céphaliques caractérisées par une micrognathie, des anomalies otiques et cérébrales et d'éventuelles fentes palatines à des atteintes cardiaques, uro-génitales et thymiques. L'attention a été attirée vers ce type de malformation à la faveur de l'utilisation d'onguents à visée dermatologique (Accutane) contenant de l'acide rétinolique.

Chez l'embryon de rat, Poswillo (1973, 1975, 1988) a pu obtenir, par exposition de la mère gestante à la vitamine A un syndrome malformatif céphalique évoquant par son aspect la dysostose mandibulo-faciale ou syndrome de Treacher Collins ou de Franceschetti-Klein. Des observations similaires ont été faites par Webster *et al.* (1985), et par Yasuda *et al.* (1986, 1987). Sulik *et al.* (1987) ont étudié en détail l'effet de l'administration maternelle d'acide 13-cis-rétinoïque chez la souris et ont obtenu une phénocopie de la dysostose mandibulo-faciale par l'administration de l'agent tératogène au 9^e jour de la gestation.

Si d'assez nombreuses études ont été consacrées à l'analyse *in vitro* de l'effet de l'acide rétinoïque, notamment sur les cellules dérivées des crêtes neurales céphaliques génératrices des ébauches squelettiques du viscérocône (Webster *et al.*, 1986, Davis *et al.*, 1990) et à l'étude de la répartition des récepteurs et de la protéine porteuse de l'acide rétinoïque chez l'embryon (Vaessen *et al.*, 1989, Dencker *et al.*, 1990, Ruberte *et al.*, 1990, Vaessen *et al.*, 1990), peu de travaux ont décrit de manière séquentielle les modalités morphologiques et histochimiques du développement pathologique des ébauches maxillo-faciales soumises à l'effet de l'administration maternelle d'acide rétinoïque.

Le travail que nous avons entrepris répond à un double objectif. D'une part, les observations que nous avons recueillies nous paraissent de nature à éclairer quelques points relatifs au développement normal des ébauches. D'autre part, la compréhension de certains mécanismes propres au développement perturbé des ébauches maxillo-faciales permet de mieux comprendre la pathogénie de semblables malformations dans l'espèce humaine et de mieux adapter l'approche thérapeutique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souris utilisées dans le cadre de cette étude appartiennent à la race C 57 BL. Le jour de la découverte du bouchon matinal étant considéré comme jour 0, les femelles ont subi à 9 jours de gestation une administration orale unique d'acide 13-cis rétinoïque (Sigma) à la dose de 400 mg/kg en solution dans l'huile de sésame, la suspension étant homogénéisée par ultra-sons et agitation par vortex. Les embryons âgés de 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 et 17 jours ont été prélevés dans le liquide physiologique de Locke, fixés dans le solution de Serra (Ethenol 95°: 6 vol.,

formol: 3 vol., acide acétique: 1 vol.), déshydratés et inclus dans le paraplast. Des coupes de 10 μ , après réhydratation, ont été colorées soit par le mélange pyronine-vert de méthyle selon Unna-Brachet, soit par le bleu de toluidine à pH 3.8. Ces deux colorations histochimiques sont destinées respectivement à apprécier le contenu en ARN des noyaux (ce qui permet, chez les jeunes embryons, de repérer les cellules dérivées des crêtes neurales céphaliques (Milaire, 1959)) et à analyser la métachromasie due aux dépôts de glycosaminoglycans de la matrice extracellulaire cartilagineuse. Quelques embryons de 9,5 et 10 jours ont été soumis à la coloration supravitale au bleu de Nil (Louryan, 1990) afin d'apprécier la répartition *in toto* des sites de nécrose. Des embryons de 17 jours ont en outre subi la coloration *in toto* au bleu-alcian et sulfate d'alizarine afin d'observer macroscopiquement les ébauches cartilagineuses et osseuses (Louryan, 1986). Les résultats obtenus par les diverses techniques utilisées ont été rapportés à des observations réalisées chez les embryons témoins de même stade morphologique ou chronologique.

RÉSULTATS

A l'examen *in toto*, et à tous les stades à partir de 12 jours, on observe une position anormalement basse de l'ébauche du pavillon de l'oreille. Les stades âgés (à partir de 15 jours) font apparaître une brièveté de l'ébauche mandibulaire, tandis que certains embryons de 17 jours exhibent une évidente exophthalmie (Fig. 5). Une réduction des dimensions longitudinales et transversales de la tête par rapport à la longueur totale de l'embryon s'observe également. L'examen *in toto* d'embryons de 17 jours colorés par le bleu alcian et le sulfate d'alizarine permet d'objectiver une nette hypoplasie de la partie proximale de l'ébauche dermique de la mandibule, associée à des anomalies de sévérité variable affectant les osselets de l'oreille moyenne. Parmi celles qui sont accessibles *in toto*, nous mentionnerons des anomalies de forme et de taille des os tympanal et gonial (apophyse antérieure du marteau), un aspect grêle et étiré du manche du marteau, une hypoplasie variable de l'enclume et des anomalies importantes et fréquentes du cartilage de Reichert, parfois absent. Dans certains cas, des nodules d'ossification anormaux sont observés au sein d'ébauches cartilagineuses qui ne sont pas destinées à s'ossifier, comme le cartilage de Meckel. La capsule otique est située très bas, pratiquement dans la région cervicale, à l'instar du pavillon auriculaire.

L'examen sur coupes sériées confirme l'absence quasi constante de la branche montante de la mandibule et du condyle (Fig. 6 et 8). Dans une même portée de 5 embryons de 17 jours, nous avons obtenu 4 embryons chez qui la mandibule se réduisait à deux bourgeons vestigiaux symétriques; ces embryons étant par ailleurs anoures. Le cartilage de Meckel présente dans de nombreux cas un aspect anormalement arciforme (Fig. 3 et 5), avec une composante transversale enserrant le pharynx (Fig. 6). Chez des embryons de 17 jours, une ébauche mandibulaire membraneuse entoure un cartilage de Meckel arqué, tandis que des ébauches ossiculaires informes et dysplasiques se sont développées au sein de cette ébauche mandibulaire, à l'exception du manche du marteau (Fig. 10) qui, indépendamment des autres rudiments d'osselets, peut se souder à l'ébauche dermique de l'aile ptérygoïdienne interne. Ces embryons se sont avérés en outre atteints d'une exophtalmie majeure secondaire à un hypodéveloppement des cadres orbitaires (Fig. 5). Dans la majorité des cas, la partie proximale de la mandibule s'avère absente, les ébauches des muscles masticateurs s'insérant soit sur le cartilage de Meckel soit sur une ébauche mandibulaire indifférenciée et non ossifiée (Fig. 6 et 8). Outre son aspect arciforme, le cartilage de Meckel présente de manière générale une situation trop basse et trop médiale, si bien qu'il peut entrer en contact avec le ganglion de Gasser et le déformer (Fig. 4). Il entre également parfois en contact avec l'ébauche de l'aile externe de l'apophyse ptérygoïde, le basisphénoïde ou la capsule nasale. Dans ce dernier cas, l'ébauche mandibulaire s'est avérée extrêmement hypoplasique. Un trajet aberrant du muscle ptérygoïdien latéral a été également observé, tirant son origine d'un cartilage de Meckel en continuité avec l'ébauche ptérygoïdienne, il s'insérait sur la partie proximale de ce même cartilage, en l'absence d'ébauche condylienne. Souvent, une lame d'os dermique quasi continue recouvre la quasi totalité de l'ébauche crânienne, y compris la zone mandibulaire présomptive. Des îlots aberrants d'ossification (Fig. 9) et de chondrification apparaissent au sein de l'ébauche faciale. Une fente palatine complète ou postérieure s'observe constamment (Fig. 7); les germes dentaires apparaissent anormaux, d'aspect polylobé (Fig. 9). L'étrier est tantôt absent et tantôt ébauché, éventuellement d'aspect columellaire. Il peut être présent en face d'une «fenêtre» non chondrifiée de la capsule otique mais dépourvue de platine. Il peut garder un contact avec le cartilage de Reichert. Le manche du marteau conserve quant à lui remarquablement ses rapports avec le récessus tubo-tympanique, même

lorsque celui-ci présente un aspect anormal (Fig. 10). L'ébauche manubriale peut ainsi perdre tout contact avec le reste de la chaîne des osselets ou présenter un contact cellulaire lâche avec le cartilage de Reichert. L'enclume est majoritairement fort altérée, souvent d'aspect fragmenté.

Il arrive que les ébauches osseuses et cartilagineuses présentent un aspect qualitativement normal mais que le tissu qui les entoure présente un aspect quantitativement réduit. L'analyse d'embryons âgés de 15 à 17 jours ne démontre pas de retard majeur d'ossification ni de chondrification, même si les ébauches sont très désorganisées. En revanche, l'examen d'embryons plus jeunes (11 à 14 jours) permet d'objectiver un important retard de développement. Aucune condensation presquelettique ni aucune métachromasie ne s'observent à 11 et à 12 jours. A 13 jours, une ébauche de cartilage de Meckel arciforme dont la métachromasie est négligeable par rapport aux témoins de même stade (Louryan, 1988) et un rudiment de manche du marteau accolé au récessus tubo-tympanique deviennent repérables. L'emplacement présomptif des autres ébauches d'osselets se caractérise par une condensation d'aspect irrégulier. Les ébauches ossiculaires s'individualisent entre 13 et 14 jours, ce qui témoigne d'un retard important, et la dysmorphose qui les caractérise devient alors apparente. L'ossification mandibulaire devient perceptible vers 15.5 jours.

L'observation de jeunes embryons traités de 9.5 jours (environ 27 ± 2 somites) ayant subi un toto la coloration supra-vitale au bleu de Nil révèle une extension en topographie et en intensité des foyers de nécrose observés à l'état normal dans la partie proximale des deux premiers arcs à ce stade (Sulik *et al.*, 1987, Louryan, 1990). Par rapport aux embryons témoins, les sites de nécrose présentent davantage de grains par unité de volume et se caractérisent par une extension plus grande dans le sens proximo-distal. Les coupes colorées par le mélange pyronine-vert de méthyle permettent de compléter ces observations. De très nombreux macrophages occupent la partie proximale des deux premiers arcs branchiaux (Fig. 2).

Ils se localisent clairement au sein de la coulée de cellules dérivées des crêtes neurales s'étirant depuis le tube cérébral jusque dans les arcs viscéraux, et repérables par leur intense pyroninophilie.

A cet égard, de nombreuses cellules nécrotiques s'observent dans la composante proximale de la coulée, non loin de l'ébauche correspondante (nerfs V et VII). Nous avons décrit par ailleurs le pattern des nécroses morphogènes présentes au même stade chez des embryons non traités (Fig. 1) et avons

décrit leurs rapports privilégiés avec la limite ventrale des deux ganglions. Chez les embryons traités de 10 jours, le pattern des nécroses se caractérise par rapport aux témoins par la persistance de discrètes zones nécrotiques anormales dans la partie proximale

des deux premiers arcs, alors qu'à ce stade les nécroses morphogènes sont plus distales. De nombreux macrophages s'observent à 11 jours dans les deux arcs correspondants; ils dépassent en nombre ce qui s'observe chez les témoins.

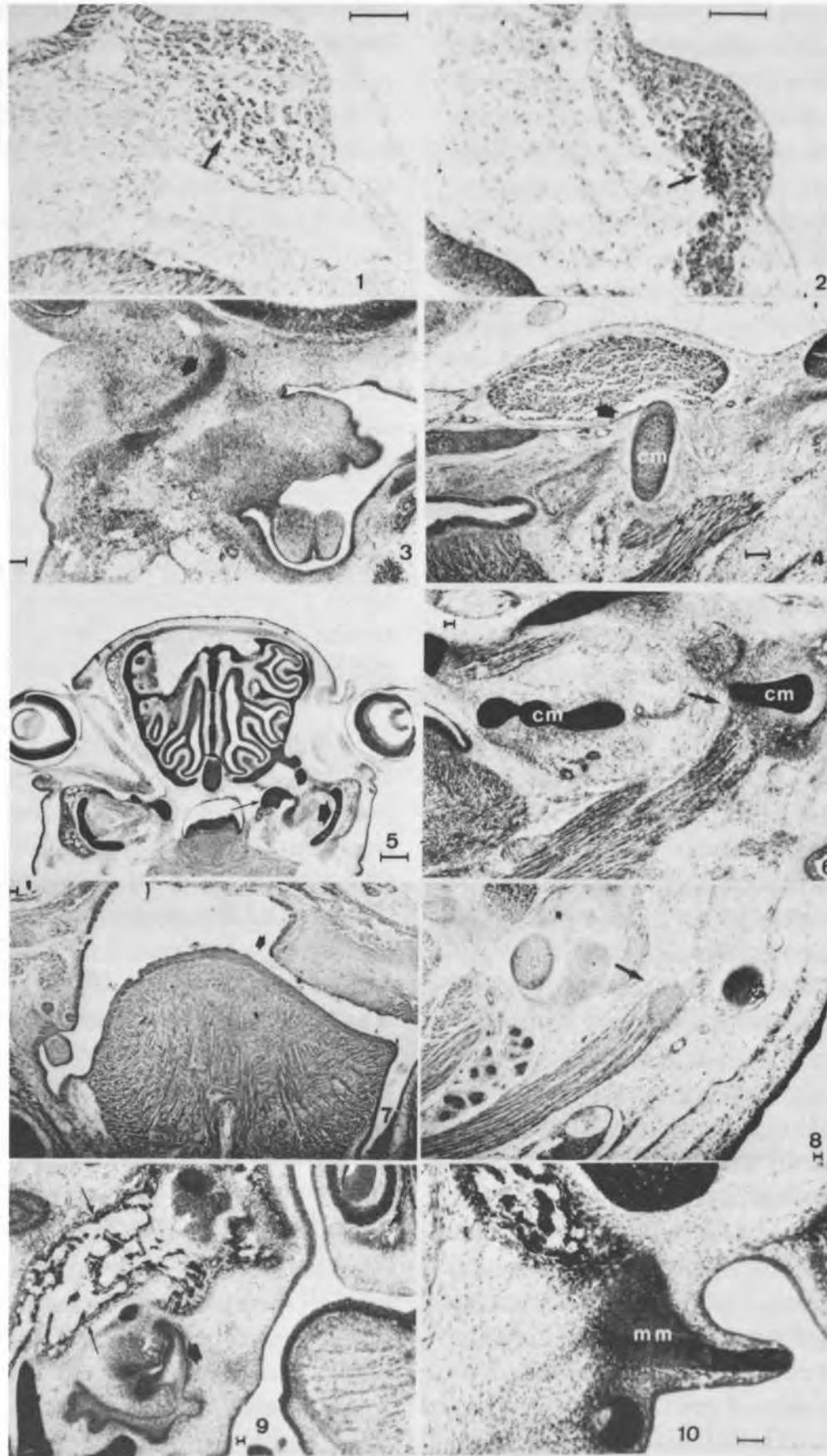


Fig. 1: Démonstration des sites de nécroses morphogènes (flèche) dans la coulée des cellules dérivées des crêtes neurales céphaliques dans le premier arc branchial chez un embryon normal de 9.5 jours (Unna-Brachet, coupe frontale).

Fig. 1: Demonstration of areas of physiological cell death (arrow) in neural crest cells invading the first branchial arch in a normal 9.5-day embryo (Unna-Brachet, frontal section).

Fig. 2: Même région chez un embryon de même stade traité à l'acide rétinoïque: majoration des nécroses (flèche).

Fig. 2: Same area in a same stage experimental embryo: increase of cell death (arrow).

Fig. 3: Embryon traité de 13 jours: l'ébauche du cartilage de Meckel est anormalement arqué (flèche) (bleu de toluidine, coupe frontale).

Fig. 3: Experimental 13-day embryo: Meckel's cartilage anlage is curvilinear (arrow) (toluidin blue, frontal section).

Fig. 4: Embryon traité de 16 jours: le cartilage de Meckel rentre en contact avec le ganglion de Gasser (bleu de toluidine, coupe frontale).

Fig. 4: Experimental 16-day embryo: contact between Meckel's cartilage and trigeminal ganglio (toluidin blue, frontal section).

Fig. 5: Embryon traité de 17 jours: exophtalmie sévère. Le cartilage de Meckel (grosse flèche) se poursuit par un prolongement médial (petite flèche) (bleu de toluidine, coupe frontale).

Fig. 5: Experimental 17-day embryo: severe exophtalmia. Meckel's cartilage (big arrow) is continuous with its medial extension (arrow) (toluidin blue, frontal section).

Fig. 6: Embryon traité de 17 jours: le muscle mylo-hyoïdien s'insère sur une condensation mésenchymateuse circonscrivant le cartilage de Meckel (flèche) (bleu de toluidine, coupe frontale).

Fig. 6: Experimental 17-day embryo: mylo-hyoïd muscle attachment is visible on a mesenchymal condensation around Meckel's cartilage (arrow) (toluidin blue, frontal section).

Fig. 7: Embryon traité de 17 jours: large fente palatine. La flèche désigne l'ébauche de crête palatine hypoplasique (bleu de toluidine, coupe frontale).

Fig. 7: Experimental 17-day embryo: cleft palate. Arrow indicates hypoplastic palatal shelve (toluidin blue, frontal section).

Fig. 8: Embryon traité de 17 jours: aucune ossification autour d'un cartilage de Meckel hypoplasique (flèche) (bleu de toluidine, coupe frontale).

Fig. 8: Experimental 17-day embryo: lack of ossification around a hypoplastic Meckel's cartilage (arrow) (toluidin blue, frontal section).

Fig. 9: Embryon traité de 17 jours: germe dentaire anormal (grosse flèche) et ossification exubérante dans la partie interne de l'ébauche maxillaire (flèche) (bleu de toluidine, coupe frontale).

Fig. 9: Experimental 17-day embryo: abnormal dental germ (big arrow) and abnormal ossification area in the medial part of maxillar anlage (arrow) (toluidin blue, frontal section).

Fig. 10: Embryon traité de 17 jours: l'ébauche du manche du marteau est isolée et partiellement soudée à l'ébauche ptérygoïdienne (bleu de toluidine, coupe frontale).

Fig. 10: Experimental 17-day embryo: the anlage of the manubrium mallei is isolated and partially fused to the pterygoid bone (toluidin blue, frontal section).

cm: cartilage de Meckel (Meckel's cartilage)
mm: manche du marteau (manubrium mallei)

Echelle: 100 μ (Fig. 5: 0.5 mm)
Bar: 100 μ (Fig. 5: 0.5 mm)

DISCUSSION

Les constatations morphologiques qui ressortent de ce travail sont en accord avec les données recueillies par Poswillo (1973, 1975), Yasuda *et al.* (1986, 1987) et Sulik *et al.* (1987). Transposées à l'espèce humaine, elles évoquent l'aspect rencontré dans la dysostose mandibulo-faciale et l'effet de l'administration maternelle de vitamine A. L'atteinte mandibulaire apparaît intéressante en ce qu'elle concerne surtout la portion proximale de cette ébauche. Cette région se caractérise par la présence d'un blastème cartilagineux secondaire, indépendant du cartilage de Meckel, et qui est destiné à former la partie supérieure de la branche montante et le condyle. Le développement de cette ébauche est relativement tardif chez la souris (Alasha et Louryan, 1990) et nous ne l'avons observée chez les embryons traités que chez ceux qui présentaient un aspect qualitativement normal de cette région. L'absence de cartilage condylien va de pair avec un aspect fortement anormal du cartilage de Meckel et de ses dérivés et avec une disposition aberrante des muscles régionaux comme le ptérygoïdien latéral, laquelle apparaît secondaire à l'anomalie affectant les ébauches squelettiques. Les présentes constatations vont cependant au-delà de ce qui est habituellement constaté dans les cas de dysostose mandibulo-faciale ou d'exposition aux dérivés de l'acide rétinoïque dans l'espèce humaine: tout porte en effet à croire qu'un appareil manducateur aussi gravement dysmorphique (présentant notamment une couche d'os dermique en continuité avec celle du reste du crâne) ne saurait de façon satisfaisante assurer un fonctionnement normal. L'aplasie condylienne est toutefois une constatation habituelle dans les hypoplasies des dérivés du premier arc branchial en clinique humaine. Il en va de même des sévères dysplasies de l'oreille moyenne et de l'oreille externe, incluant les oreilles bas implantées et la dysmorphose de la chaîne des osselets. Les anomalies affectant celle-ci nous paraissent intéressantes en ce qu'elles sont de nature à éclairer quelques points relatifs au mécanisme de leur développement normal. L'indépendance relative du manche du marteau, qui apparaît souvent « isolé » chez les embryons exposés, est en accord avec les données ontogénétiques qui situent son ébauche entre les cartilages des deux premiers arcs branchiaux, et également entre le premier sillon et la première poche branchiale (Louryan, 1986, 1988). Il présente normalement un rapport étroit avec le cartilage de Reichert qui, nous l'avons vu, peut présenter chez les embryons anormaux un contact tissulaire persistant avec l'ébauche manubriale.

La différenciation de la platine stapédienne dépend quant à elle d'un contact secondairement établi entre l'ébauche de l'étrier et la capsule otique en voie de développement (Jaskoll, 1980, Louryan, 1986, 1988). La situation anormale de la capsule otique dans la région cervicale chez les embryons traités peut en partie répondre de l'anomalie souvent rencontrée consistant en une ébauche stapédienne sans contact avec le rudiment de l'oreille interne. L'absence d'arche de l'étrier, associée à la non visualisation de l'artère stapédienne, évoque l'aspect rencontré en culture *in vitro*, où la vascularisation est interrompue (Louryan, 1991).

Chez le jeune embryon, l'observation de zones étendues de nécrose dans la portion proximale des deux premiers arcs, et le long de la coulée cellulaire reliant cette zone au tube cérébral plaide en faveur d'une atteinte élective des cellules dérivées des crêtes neurales céphaliques, hypothèse déjà soulevée par Sulik *et al.* (1987). Tout porte à croire qu'à ce front précoce de nécroses répond l'hypoplasie relative des deux arcs ultérieurement observée, ainsi que l'aspect et la topographie aberrants des dérivés cartilagineux branchiaux, internes et arciformes. A cet égard, les observations relatives à l'abondance des récepteurs ou de la protéine porteuse de l'acide rétinoïque dans la population cellulaire dérivée des crêtes neurales céphaliques (Vaessen *et al.*, 1989, 1990) apparaissent d'un vif intérêt: une explication de l'atteinte élective de ce groupe cellulaire dans l'embryopathie aux rétinoïdes pourrait y résider.

Une éventuelle étiologie de la dysostose mandibulo-faciale, affection autosomique dominante à expressivité variable, pourrait être trouvée dans un trouble intrinsèque de ce type de récepteurs et l'incapacité des cellules des crêtes neurales céphaliques participant à l'édification du squelette facial à faire face à un taux non excessif de rétinoïdes, substances qui, dans des conditions normales, ont été considérées comme constituant un agent morphogène et régulateur (Paulsen *et al.*, 1988).

En conclusion, les observations recueillies à la faveur de ce travail nous paraissent donc de nature à éclairer deux aspects complémentaires relatifs aux « syndromes des deux premiers arcs » observés en clinique: la séquence précise des événements relevés chez les embryons dont la mère a été exposée à l'acide rétinoïque permet d'approcher le mécanisme de la dysmorphogenèse, et la nature de l'agression observée dans les heures qui suivent l'administration d'acide rétinoïque chez des souris gestantes s'avère constituer un modèle indispensable à la compréhension de certai-

nes entités malformatives frappant l'espèce humaine et nécessitant une prise en charge chirurgicale précise et tenant compte des particularités liées au développement et à la croissance du massif facial des jeunes sujets atteints.

L'étude séquentielle du développement anormal induit permet de mieux cerner la pathogénie des syndromes humains, à condition de bien connaître les limites du modèle utilisé, et tout particulièrement ce qui le sépare de la pathologie humaine.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient chaleureusement Messieurs A. Demeire et M. Verheyden pour l'aide apportée à la réalisation des illustrations.

RÉFÉRENCES

- Alasha, J., Louryan, S. — Aspects histochimiques du développement de la mandibule et de l'articulation temporo-maxillaire chez l'embryon de souris. *Bull. group int. Rec. Sci. Stomatol. et Odontol.*, 35: 32, 1990.
- Benke, P.J. — The isotretinoin teratogen syndrome. *JAMA*, 251: 3267-3269, 1984.
- Davis, W.L., Crawford, L.A., Cooper, O.J., Farmer, G.R., Thomas, D., Freeman, B.L. — Generation of radical oxygen species by neural crest cells treated *in vitro* with isotretinoin and 4-oxo-isotretinoin. *J. Craniof. gen. devel. biol.*, 10: 295-310, 1990.
- De La Cruz, E., Sun, S., Vanguanichyakorn, K., Desposito, F. — Multiple congenital malformations associated with maternal isotretinoin therapy. *Pediatrics*, 74: 428-430, 1984.
- Dencker, L., Annerwall, E., Busch, C., Eriksson, U. — Localization of specific retinoid-binding sites and expression of cellular retinoic-acid-binding protein (CRABP) in the early embryo. *Development*, 110: 343-352, 1990.
- Hall, J.G. — Vitamin A: a newly recognized human teratogen. Harbinger of things to come. *J. Pediatr.*, 105: 583-584, 1984.
- Jaskoll, T.F. — Morphogenesis and teratogenesis in the middle ear in animals. Birth defects: original article series, vol. XVI, nr. 7: 9-28, 1980.
- Lammer, E.J., Chen, D.T., Hoar, R.M., Agnish, N.D., Benke, P.J., Braun, J.T., Curry, C.J., Fernhoff, P.M., Grix, A.W., Lott, I.T., Richard, J.M., Sun, S.C. — Retinoic acid embryopathy. *N. Engl. J. Med.*, 313: 837-841, 1985.
- Lott, I.T., Bocian, M., Pribram, H.W., Leitner, M. — Fetal hydrocephalus and ear anomalies associated with maternal use of isotretinoin. *J. Pediatr.*, 105: 597-600, 1984.
- Louryan, S. — Morphogenèse des osselets de l'oreille moyenne chez l'embryon de souris. I. Aspects morphologiques. *Arch. Biol. (Bruxelles)*, 97: 317-337, 1986.
- Louryan, S. — Morphogenèse des osselets de l'oreille moyenne chez l'embryon de souris. II. Etude de la chondrogenèse. *Arch. Biol. (Bruxelles)*, 99: 453-463, 1988.
- Louryan, S. — Do physiological cell death play a role in neuritic growth into the first two branchial arches of mouse embryo? *Eur. Arch. Biol.*, 101: 191-196, 1990.
- Louryan, S. — In vitro development of mouse middle ear ossicles: a preliminary report. Accepted pour publication in *Eur. Arch. Biol.*, 1991.
- Milaire, J. — Prédifférenciation cytochimique de diverses ébauches céphaliques chez l'embryon de souris. *Arch. Biol. (Liège)*, 78: 1-144, 1959.
- Paulsen, D.F., Langille, R.M., Dress, V., Solursh, M. — Selective stimulation of in vitro limb-bud chondrogenesis. *Differentiation*, 39: 123-130, 1988.
- Poswillo, D. — The pathogenesis of the first and second branchial arch syndrome. *Oral surg. Oral med. Oral pathol.*, 35: 302-328, 1973.
- Poswillo, D. — The pathogenesis of the Treacher Collins syndrome (mandibulofacial dysostosis). *Brit. J. Oral surg.*, 13: 1-6, 1975.
- Poswillo, D. — The aetiology and pathogenesis of craniofacial deformity. *Development*, 103: suppl. 207-212, 1988.
- Rosa, F.W., Wilk, A.C., Kesley, F.O. — Teratogen uptake: vitamin A congeners. *Teratol.*, 33: 355-364, 1986.
- Ruberte, E., Dolle, P., Krust, A., Zelent, A., Morriss-Kay, G., Chambon, P. — Specific spatial and temporal distribution of retinoic receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis. *Development*, 108: 213-222, 1990.
- Stern, R.S., Rosa, F., Baum, C. — Isotretinoin and pregnancy. *Acad. dermatol.*, 10: 851-854, 1984.
- Sulik, K.K., Johnston, M.C., Smiley, S.J., Speight, H.S., Jarvis, B.E. — Mandibulofacial dysostosis (Treacher Collins syndrome): a new proposal for its pathogenesis. *Am. J. Med. Gen.*, 27: 359-372, 1987.
- Vaessen, M.J., Kootwijk, E., Mummery, C., Hilkens, J., Bootsma, D., Geurts Van Kessel, A. — Preferential expression of cellular retinoic acid binding protein in a subpopulation of neural cells in the developing mouse embryo. *Differentiation*, 40: 99-105, 1989.
- Vaessen, M.J., Carel Meijers, J.A., Bootsma, D., Geurts Van Kessel, A. — The cellular retinoic-acid binding protein is expressed in tissues associated with retinoic-acid induced malformations. *Development*, 116: 371-378, 1990.
- Webster, W.S., Johnston, M.C., Lammer, E.J., Sulik, K.S. — Isotretinoin embryopathy and the cranial neural crest: an in vivo and in vitro study. *J. Craniof. gen. devel. biol.*, 6: 211-222, 1986.
- Yasuda, Y., Okdamoto, M., Konishi, H., Matsuo, T., Kishara, T., Tanimura, T. — Developmental anomalies induced by all-trans retinoic acid in fetal mice. I. Macroscopic findings. *Teratol.*, 34: 37-39, 1986.
- Yasuda, Y., Konishi, H., Kihara, T., Tanimura, T. — Developmental anomalies induced by all-trans retinoic in fetal mice. II. Induction of abnormal neuroepithelium. *Teratol.*, 35: 355-366, 1987.