Bull Group Int Rech Sci Stomatol et Odontol - Vol 37 n° 3-4, 1994

Etude *in toto* de l'activité cholinestérase dans le viscérocrâne de l'embryon de souris

M. QUETSTROEY, S. LOURYAN, C. COUTELIER

Laboratoire d'Anatomie et Embryologie Humaines, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles.

RÉSUMÉ

L'analyse *in toto* de l'activité cholinestérase dans l'extrémité céphalique d'embryons de souris de 9 à 14 jours permet de définir 4 stades. Le stade 1 correspond à la présence d'une activité dans les cellules dérivées des crêtes neurales céphaliques. Le stade 2 se caractérise par une activité dans la partie proximale des deux premiers arcs branchiaux et dans les blastèmes oculomoteurs. Le stade 3 voit l'activité décroître et intéresser la zone de fusion de certains bourgeons faciaux. Le stade 4 correspond à une activité répartie dans les ébauches nerveuses et musculaires. L'activité cholinestérase s'avère donc variable dans le temps et concerne diverses populations cellulaires en voie de différenciation.

MOTS CLÉS:

Embryon, souris, muscles, nerfs, cholinestérase.

SUMMARY

***In toto* analysis of cholinesterase activity in the cephalic extremity of 9- to 14-day old mouse embryo permits to define four different stages. Stage 1 corresponds to activity in the cephalic neural crest-derived cells. Stage 2 is characterized by activity in the proximal part of both first branchial arches and in the oculomotor blastemata. Stage 3 corresponds to a decrease of the activity, which appears in the area of fusion of several facial processes. Stage 4 corresponds to activity in nervous and muscular blastemata. Cholinesterase activity is thus chronologically varying and implies several differentiating cell populations.**

KEY WORDS:

Embryo, mouse, muscles, nerves, cholinesterase.

INTRODUCTION

L'activité cholinestérase, présente dans le système nerveux et les jonctions neuromusculaires des vertébrés adultes (Gerebtzoff, 1953), se manifeste également dans les tissus embryonnaires. Chez le poulet, elle apparaît dans les cellules dérivées des crêtes neurales, dans l'épiblaste, ainsi que dans les cellules mésenchymateuses du bourgeon de membre desti-

nées à former les futurs chondroblastes (Drews et Drews, 1972, 1973). Elle est également présente dans les myoblastes en voie de différenciation. Elle caractérise aussi les ébauches prémusculaires et musculaires des bourgeons de membres des embryons de souris (Bogusch, 1981).

La rareté des informations disponibles sur l'ontogenèse des muscles du viscérocrâne des mammifères nous a suggéré l'étude *in toto* des sites d'activité cholinestérase au sein de l'extrémité céphalique de jeunes embryons de souris âgés de 9 à 14 jours.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des embryons de souris de la race NMRI ont été prélevés après sacrifice de la mère gestante par dislocation cervicale. L'étude a porté sur des embryons prélevés du 9e au 14e jour de gestation, le jour correspondant à la découverte du bouchon matinal étant considéré comme jour 0. Nous nous sommes inspirés de la méthode de révélation de l'activité cholinestérase décrite par Bogusch (1981).

Les têtes ont été fixées à froid pendant 2 à 4 heures dans un tampon phosphate 0.1 M à pH 7.2, contenant 4% de paraformaldéhyde. Elles ont été transférées, après lavage au PBS, dans une solution de Hanks contenant 1% de trypsine, dans laquelle les pièces sont demeurées 2 à 4 heures en fonction de leur taille, le milieu étant remplacé toutes les heures. L'arrêt de la trypsinisation s'opère dans une nouvelle solution de Hanks contenant 5% de sérum fœtal bovin. Après lavage dans un tampon phosphate 0.1 M à pH 7.2, les têtes sont immergées dans une solution d'incubation à base d'iodure d'acétylthiocholine préparée selon Karnovsky et Roots (1964).

L'incubation a duré 2 à 4 heures, dans l'étuve à 37°, la solution étant régulièrement agitée avec douceur et remplacée toutes les heures. La coloration, obtenue grâce à la présence de sulfate de cuivre, est contrôlée périodiquement sous stéréomicroscope. Lorsque la coloration est suffisante, les pièces sont lavées dans le tampon phosphate et éclaircies dans des bains de glycérine à concentration croissante. Après dissection (en général, une section sagittale de la tête), les pièces sont montées dans une lame creuse recouverte d'un couvre-objet, observées au microscope et éventuellement photographiées.

RÉSULTATS

Chez les embryons de 9 jours, la coloration se répartit dans une zone assez vaste s'étendant du tube cérébral à la partie proximale des deux premiers arcs branchiaux (Fig. 1).
Cette zone se restreint chez les embryons de 10 jours, où elle se limite à la partie proximale des deux arcs, ainsi que dans une zone péri-oculaire où apparaissent habituellement les blastèmes des muscles oculomoteurs (Fig. 2).

L'activité est minimale chez l'embryon de 11 jours, où elle est confinée à la région oculomotrice, ainsi que dans la zone de fusion du bourgeon maxillaire avec les bourgeons nasofrontaux (Fig. 3).

A 12 jours, une coloration apparaît dans les ébauches des nerfs crâniens, notamment dans le nerf oculomoteur, dont on observe la continuité avec les ébauches musculaires correspondantes, demeurées positives (Fig. 4).

L'activité cholinestérase dans les ébauches nerveuses périphériques s'intensifie aux stades suivants (13 et 14 jours) (Fig. 5 et 6), où on voit les ganglions de Gasser (nerf trijumeau) et géniculé (nerf facial) devenir positifs.

A 14 jours, l'activité devient visible dans les ébauches musculaires masticatrices (Fig. 7), tandis que l'implantation des vibrisses est positive dès le stade de 12 jours.

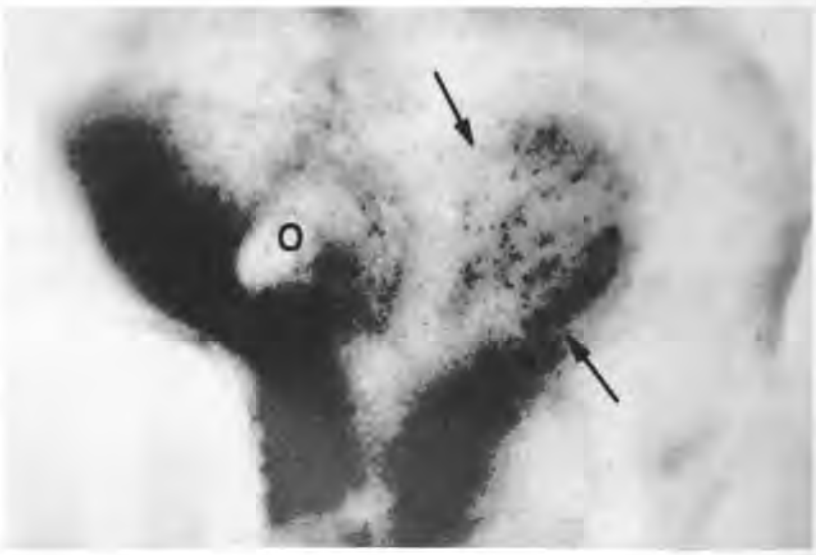

Fig. 1: embryon de 9 jours, vue sagittale (×12.5). L'activité cholinestérase est visible dans une zone assez large (flèches) correspondant à la région occupée par les cellules dérivées des crêtes neurales céphaliques. O: œil.
Fig. 1: 9-day old embryo, sagittal view (×12.5). Cholinesterase activity is visible in a large area (arrows) corresponding to cephalic neural crest cells zone. O: eye.

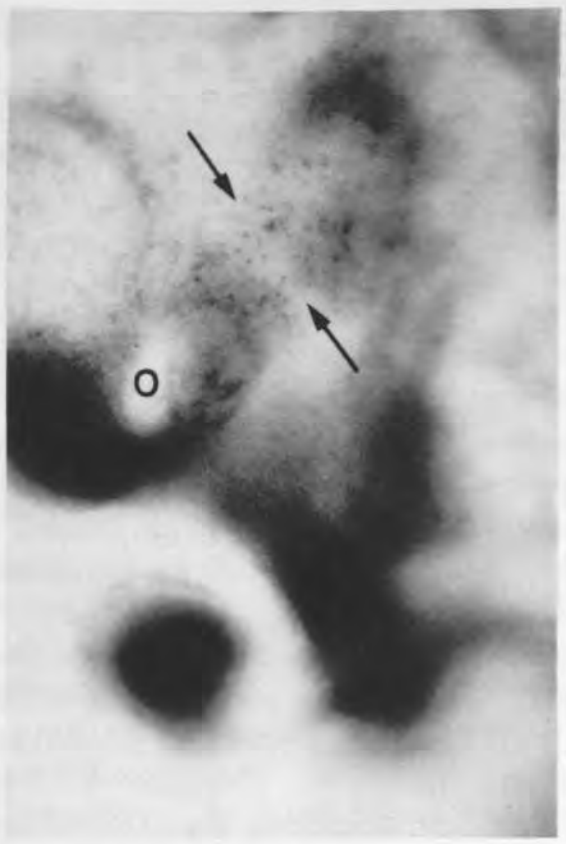

Fig. 2: embryon de 10 jours, vue sagittale (×12.5). Démonstration d'une activité dans le blastème prémusculaire oculomoteur (flèches).
Fig. 2: 10-day old embryo, sagittal view (×12.5). Demonstration of activity in the oculomotor premuscular blastemata (arrows).

Fig. 3: embryon de 11 jours, vue sagittale (×12.5). Activité péri-oculaire limitée (tête de flèches) et apparition d'une activité transitoire (flèche) dans la zone de fusion du bourgeon mandibulaire (M) avec les bourgeons nasofrontaux.
Fig. 3: 11-day old embryo, sagittal view (×12.5). Restricted peri-ocular activity (arrowheads), and transient activity (arrow) in the area of fusion of the maxillary process (M) with the naso-frontal processes.

Fig. 4: embryon de 12 jours, vue sagittale (×12.5). L'activité est présente dans le blastéme oculomoteur (tête de flèches) ainsi que dans l'ébauche du nerf oculomoteur (flèches).
Fig. 4: 12-day old embryo, sagittal view (×12.5). Activity is present in the oculomotor blastema (arrowheads) as well as in the oculomotor nerve primordium (arrows).

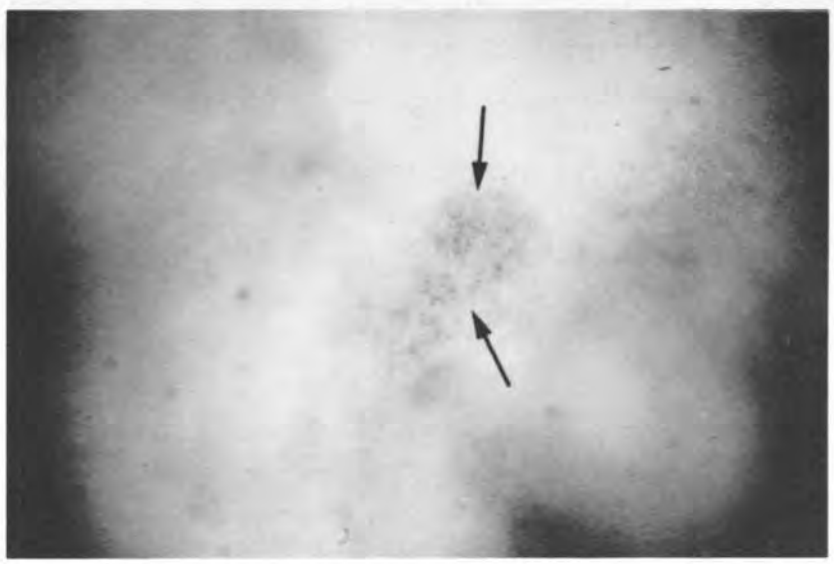

Fig. 5: embryon de 13 jours, vue sagittale (×12.5). Démonstration d'une zone d'activité cholinestérase dans l'ébauche du ganglion géniculé (flèches).
Fig. 5: 13-day old embryo, sagittal view (×12.5). Demonstration of cholinesterase activity in the primordium of geniculate ganglion (arrows).

Fig. 6: embryon de 14 jours, vue sagittale (×12.5). Démonstration d'une zone d'activité dans le ganglion de Gasser (flèches).
Fig. 6: 14-day old embryo, sagittal view (×12.5). Demonstration of activity in the trigeminal ganglion (arrows).

Fig. 7: embryon de 14 jours, vue sagittale (×12.5). Apparition d'une activité cholinestérase dans la masse des muscles masticateurs infra-mandibulaires (flèches).
Fig. 7: 14-day old embryo, sagittal view (×12.5). Activity has appeared in the infra-mandibulary masticatory muscles (arrows).

DISCUSSION

Le pattern de l'activité cholinestérase tel qu'il apparaît au stade de 9 jours suggère que l'activité est présente dans les cellules dérivées des crêtes neurales céphaliques et s'étire du tube cérébral aux arcs branchiaux. En effet, on est frappé par la ressemblance de la fig. 1 avec les images *in toto* obtenues par marquage *exo-utero* des cellules des crêtes neurales au DiL (Serbedzija *et al.*, 1992). Cette hypothèse est en outre confortée par les observations de Drews et Drews (1972) qui, chez le poulet, ont observé sur coupes histologiques une activité cholinestérase dans les cellules dérivées des crêtes neurales.

La variation chronologique des sites d'activité permet de définir quatre «stades», qui, par ailleurs, se caractérisent par l'existence de zones de recouvrement. Le premier stade est celui où l'activité s'observe dans la zone occupée par les cellules dérivées des crêtes neurales (9 jours). La limitation de l'activité à la partie proximale des deux arcs et au pourtour de l'ébauche optique (10 jours) définit le deuxième stade, qui pourrait traduire la prédifférenciation locale de certaines populations cellulaires à préciser par une analyse histologique. A 11 jours (stade 3), l'activité caractérise transitoirement la zone de fusion de certains bourgeons faciaux, et pourrait traduire l'existence de remaniements biochimiques au sein des cellules impliquées dans le processus de fusion. Le stade 4 est caractérisé par l'apparition d'une activité dans les ébauches nerveuses périphériques et dans les blastèmes prémusculaires, et s'étend à partir du 12e jour. Les données recueillies par la technique que nous avons mise en œuvre ne nous permettent malheureusement pas d'apporter des données nouvelles sur les modalités morphologiques de développement des muscles masticateurs, puisque ceux-ci ne deviennent positifs et identifiables qu'au stade de 14 jours, alors même que leurs ébauches sont déjà en place (Louryan, 1990).

Il ne fait aucun doute qu'il est nécessaire de poursuivre cette étude préliminaire par une approche histologique sur coupes, afin de mieux identifier les populations cellulaires impliquées dans la réaction catalysée par la cholinestérase endogène. En particulier, il nous paraît utile de comparer les zones d'activité cholinestérase aux sites d'activité phosphatase alcaline dont il a été démontré qu'ils caractérisent très précocement les populations prémusculaires oculomotrices (Milaire, 1959) et branchiales (Louryan, 1990).

REMERCIEMENTS

Nous remercions chaleureusement Mme J. Biermans pour son aide technique.

RÉFÉRENCES

Bogusch, G. — The *in situ* staining of muscles during development with the cholinesterase technique. *Stain technology, 56:* 181-184, 1981.

Drews U., Drews U. — Cholinesterase in der Extremitätenentwicklung des Hühnchens. I. Die Phasen der Cholinesterase-Aktivität in der jungen Knospe und bei der Abgrenzung von Knorpel- und Muskelanlagen. *Wilhelm Roux'Arch., 169:* 70-86, 1972.

Drews U., Drews U. — Cholinesterase in der Extremitätenentwicklung des Hühnchent. II. Fermentaktivität und Bewegungsverhalten der präsumptiven Knorpelzellen *in vitro. Wilhelm Roux'Arch., 173:* 208-227, 1973.

Gerebtzoff, M.A. — Recherches histochimiques sur les acétylcholine et choline estérases. *Acta anat., 19:* 366-373, 1953.

Karnovsky, M.J., Roots, L. — A «direct coloring» thiocholine method for cholinesterase. *J. Histochem. Cytochem., 12:* 219-221, 1964.

Louryan, S. Morphogenèse des ébauches musculaires branchiales chez l'embryon de souris: corrélation avec les observations recueillies chez le poulet, chez *Mabuia megalura (Lacertilia: scincidae)* et chez *Scyllium canicula (Chondrichtyes: selachii). Eur. Arch. Biol., 101:* 65-75, 1990.

Milaire, J. — Prédifférenciation cytochimique de diverses ébauches céphaliques chez l'embryon de souris. *Arch. Biol., 70:* 587-730, 1959.

Serbedzija, G.N., Bronner-Fraser, M., Fraser, S.E. — Vital dye analysis of cranial neural crest migration in the mouse embryo. *Development, 116:* 297-307, 1992.

Corresponding author:
Prof. S. Louryan,
Laboratoire d'Anatomie et Embryologie Humaines,
Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles,
route de Lennik 808 (c.p. 619), 1070 Bruxelles, Belgique.