

Crête neurale et évolution des vertébrés

Nicole M. Le Douarin¹ et Sophie Creuzet²

¹ Collège de France, 3 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

² Institut de Neurobiologie, CNRS, avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

Auteur correspondant : Nicole M. Le Douarin, nicole.ledouarin@academie-sciences.fr

Reçu le 22 mars 2011

Résumé – La crête neurale (CN) est une structure transitoire et pluripotente de l'embryon des vertébrés. Elle se forme à partir des bords latéraux de la plaque neurale lors de la fermeture du tube neural. Les cellules qui la composent migrent et sont à l'origine de structures et de types cellulaires très divers : le système nerveux périphérique, des cellules endocrines, les mélanocytes et autres cellules pigmentaires ainsi que des dérivés mésenchymateux (tissu conjonctif, cartilagineux et osseux). Ces derniers se forment à partir de la CN entière chez les vertébrés inférieurs, mais sont fournis exclusivement par la CN céphalique (CNC) chez les vertébrés supérieurs (amniotes). Les vertébrés font avec les *protocordés* (*céphalocordés* et *urocordés*) partie du groupe des *cordés*. La CN n'existe que chez les vertébrés et peut donc être considérée comme une innovation qui, au cours de l'évolution, a marqué le passage des protocordés aux vertébrés. Les travaux réalisés dans notre laboratoire ont porté sur l'embryon d'oiseau. Grâce à la construction de chimères entre embryons de deux espèces différentes, le poulet et la caille, nous avons pu étudier les dérivés de la CN le long du névraxe et les voies de migration que les cellules de la CN suivent pour atteindre le site d'arrêt où elles se différencient. Nous avons montré que la CNC est à l'origine de la plus grande partie de la tête (squelette et tissu conjonctif). Ces notions ont amené à considérer que la CN a joué un rôle essentiel dans le processus de céphalisation qui caractérise le phylum des vertébrés. Des recherches récentes viennent renforcer cette notion en montrant que la CNC joue aussi un rôle important dans la neurogenèse cérébrale en régulant la production de facteurs de croissance, notamment de Fgf8, par les centres organisateurs secondaires des vésicules encéphaliques.

Mots clés : Amphioxus / chimères caille-poulet / squelettogenèse faciale / Fgf8 / organisateurs secondaires de l'encéphale

Abstract – Neural crest and Vertebrate evolution.

The neural crest (NC) is a remarkable structure of the Vertebrate embryo, which forms from the lateral borders of the neural plate (designated as neural folds) during neural tube closure. As soon as the NC is formed, its constitutive cells detach and migrate away from the neural primordium along definite pathways and at precise periods of time according to a rostro-caudal progression. The NC cells aggregate in definite places in the developing embryo, where they differentiate into a large variety of cell types including the neurons and glial cells of the peripheral nervous system, the pigment cells dispersed throughout the body and endocrine cells such as the adrenal medulla and the calcitonin producing cells. At the cephalic level only, in higher Vertebrates (but along the whole neural axis in Fishes and Amphibians), the NC is also at the origin of mesenchymal cells differentiating into connective tissue chondrogenic and osteogenic cells. Vertebrates belong to the larger group of Cordates which includes also the Protocordates (Cephalocordates and the Urocordates). All Cordates are characterized by the same body plan with a dorsal neural tube and a notochord which, in Vertebrates, exists only at embryonic stages. The main difference between Protocordates and Vertebrates is

the very rudimentary development of cephalic structures in the former. As a result, the process of cephalization is one of the most obvious characteristics of Vertebrates. It was accompanied by the apparition of the NC which can therefore be considered as an *innovation* of Vertebrates during evolution. The application of a cell marking technique which consists in constructing chimeric embryos between two species of birds, the quail and the chicken, has led to show that the vertebrate head is mainly formed by cells originating from the NC, meaning that this structure was an important asset in Vertebrate evolution. Recent studies, described in this article, have strengthened this view by showing that the NC does not only provide the cells that build up the facial skeleton and most of the skull but plays a major role in early brain neurogenesis. It was shown that the cephalic NC cells produce signaling molecules able to regulate the activity of the two *secondary organizing centers* previously identified in the developing brain: the anterior neural ridge and the midbrain-hindbrain junction, which secrete Fgf8, a potent stimulator of early brain neurogenesis.

Key words: Amphioxus / quail-chicken chimeras / facial skeletogenesis / Fgf8 / secondary brain organizers

Abréviations :

ANR : *Anterior Neural Ridge*

CN : Crête Neurale

FSNC : *Facial Skeletogenic Neural Crest*

MHC : *Midbrain Hindbrain Junction*

Les vertébrés appartiennent au groupe des cordés qui comprend aussi les protocordés (céphalocordés et urocordés). On considère généralement qu'ils dérivent d'un ancêtre proche du céphalocordé actuel, l'amphioxus. L'amphioxus, ou lancelet, est un animal marin vermiforme de 5 à 6 cm, vivant dans les zones sableuses et dont le plan d'organisation corporel est semblable à celui d'un vertébré. Il est en effet doté d'un tube nerveux dorsal et, en position ventrale par rapport à celui-ci, d'une notocorde, axe rigide qui, comme chez l'embryon des vertébrés, sous-tend le tube nerveux. Ventralement par rapport à la notocorde, l'amphioxus possède un tube digestif dont la partie rostrale comporte des fentes branchiales comme chez les poissons. De part et d'autre du corps, sont disposées des masses musculaires métamériques dérivant, comme chez les vertébrés, de somites mésodermiques. Des différences importantes existent cependant entre l'amphioxus et les vertébrés. Le premier a une extrémité céphalique réduite et une vésicule encéphalique rudimentaire. Il est, de plus, dépourvu de structures squelettiques.

La transition entre céphalocordés et vertébrés a été particulièrement marquée par le développement de l'encéphale et des organes des sens qui lui sont associés (vision, odorat, audition), et par l'apparition de structures squelettiques. Ces transformations ont été accompagnées par un changement de style de vie : l'amphioxus (et probablement aussi l'ancêtre des vertébrés qui lui ressemblait) se nourrit par filtration des particules organiques présentes dans l'eau

de mer alors que les vertébrés deviennent prédateurs et ont besoin pour cela d'organes des sens et de centres nerveux associatifs. Il en a résulté un accroissement considérable du volume et de la complexité des vésicules encéphaliques chez les vertébrés. Ce processus de *céphalisation* s'est accentué au cours de l'évolution de ce groupe pour atteindre son degré le plus élevé chez les primates et chez l'Homme où il est lié à l'acquisition des fonctions cognitives qui le caractérisent.

Le passage des protocordés aux vertébrés a été aussi marqué par l'apparition au cours du développement, d'une nouvelle structure, la crête neurale (CN), qui se forme à partir des bords latéraux de la plaque neurale dont le devenir est de former les vésicules encéphaliques et la moelle épinière. Les cellules de la CN ont la propriété de se détacher de l'ébauche neurale primitive lorsque celle-ci forme le tube neural. Elles migrent dans l'embryon et s'arrêtent dans des sites où elles se différencient en types cellulaires et structures très variés qui incluent les ganglions, nerfs et plexus du système nerveux entérique et périphérique, les ganglions sensoriels, les mélanocytes, des cellules endocrines (la glande adrénomédullaire, les cellules à calcitonine, le corps carotidien) et au niveau céphalique, des tissus conjonctifs et squelettiques.

La CN, absente chez les protocordés, apparaît donc comme une innovation des vertébrés. Elle a la double caractéristique d'être pluripotente et transitoire. Elle disparaît en effet en tant que telle en produisant des cellules remarquablement invasives qui colonisent pratiquement tous les tissus de l'organisme.

Ces notions reposent sur de nombreux travaux réalisés dans un premier temps chez les vertébrés inférieurs tels que les poissons et les amphibiens, qui ont fait l'objet d'une monographie de Sven Hörstadius,

parue en 1950. Jusqu'à la fin des années 1960, peu de recherches avaient été réalisées sur la CN chez les vertébrés supérieurs, faute de disposer d'une méthode qui permette de « marquer » les cellules migrantes dans l'embryon. Une technique mise au point en 1969 a permis de réaliser de telles investigations chez les amniotes et particulièrement chez l'embryon d'oiseau. Elle repose sur la construction de chimères entre deux espèces d'oiseaux, la caille et le poulet, dont il est possible de distinguer les cellules grâce à la structure particulière du noyau des cellules de caille (Le Douarin, 1969).

Les recherches réalisées sur l'embryon d'oiseau ont fourni des résultats qui ont été rapportés dans deux ouvrages (Le Douarin, 1982 ; Le Douarin & Kalcheim, 1999) et qui peuvent être étendus, dans leurs grandes lignes, aux mammifères. Des expériences, qui ont porté sur la souris, basées sur le marquage génétique des cellules de l'ébauche neurale primitive appartenant à la CN les ont confirmés.

Dans cet article nous allons montrer comment les travaux d'embryologie que nous avons réalisés ont amené à considérer que l'apparition de la crête neurale dans le phylum des cordés a joué un rôle essentiel dans le processus de céphalisation qui a caractérisé l'évolution des vertébrés.

Contribution de la crête neurale au squelette crânien

La capacité de la CN de fournir des cellules de type mésenchymateux qui se différencient en tissu conjonctif, cartilagineux et osseux, dans la région céphalique a été suggérée dans des travaux anciens tels que ceux de Julia Platt en 1893 (Platt, 1893). Cette chercheuse avait, en effet, découvert la participation de cellules migrantes d'origine dorsale aux arcs branchiaux chez le triton *Necturus*.

Les recherches poursuivies sur l'embryon de poulet par Malcolm Johnston (Johnston, 1966 ; Johnston *et al.*, 1974) et, dans notre laboratoire par Christiane Le Lièvre (Le Lièvre, 1974, 1976, 1978 ; Le Lièvre & Le Douarin, 1975) puis par Gérard Couly (Couly *et al.*, 1993), ont montré que la plus grande partie du squelette crânien est formée par des cellules issues de la CN. Seule la région occipitale, le basi-sphénoïde et la capsule otique (en partie) sont d'origine mésodermique. La totalité du squelette facial ainsi que le frontal et le pariétal sont donc d'origine ectodermique *via* la crête neurale, de même que l'os hyoïde (figure 1).

Des études précises concernant l'origine des cellules entrant dans la construction de chacune des pièces squelettiques ont été réalisées dans notre laboratoire et dans celui d'Andrew Lumsden à Londres

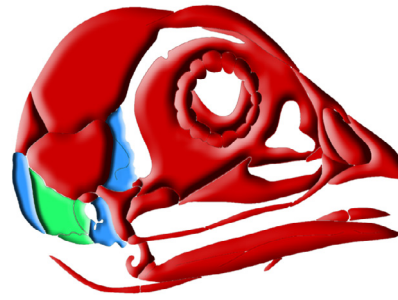


Fig. 1. Contribution respective du mésoderme somitique (en vert), paraxial (en bleu) et de la CN (en rouge) à la formation du squelette crânio-facial. Alors que la participation du mésoderme est confinée à la base du crâne, le mésenchyme dérivé de la CN forme la majeure partie de la voûte crânienne (frontal, squamosal, pariétal), les mâchoires supérieure et inférieure, ainsi que l'os hyoïde.

en 1996 (Couly *et al.*, 1996 ; Köntges & Lumsden, 1996). Elles ont permis de montrer que deux domaines peuvent être distingués dans la CN céphalique : l'un rostral, s'étendant du niveau du diencéphale d'où émerge l'épiphyse jusqu'au troisième rhombomère (r3), est à l'origine du squelette facial et crânial ; pour cette raison, cette région de la CN céphalique est appelée *FSNC* pour (*Facial Skeletogenic Neural Crest*) ; l'autre caudal, (de r3 à r8 inclus), correspond à l'origine de l'os hyoïde (en partie) et à la contribution de la CN au cœur et aux vaisseaux (aussi appelée « *crête cardiaque* »). Le rhombomère 3 correspond à une zone intermédiaire dont les cellules de CN (peu abondantes) participent au premier et au second arcs branchiaux (Couly *et al.*, 1998).

Un aspect essentiel de cette division des territoires de la CN qui participent à la construction de la tête en deux domaines distincts réside dans le fait que, contrairement aux structures troncales et à celles appartenant au cerveau postérieur (rhombencéphale), l'extrémité céphalique du corps où se développent les vésicules cérébrales antérieure et moyenne (pro- et mésencéphale) n'exprime pas les gènes *Hox* qui jouent un rôle majeur dans l'organisation structurale du reste du corps (figure 2). La tête des vertébrés est donc une zone dont le développement n'implique pas l'activité des gènes de la famille *Hox*. De plus, elle s'est développée essentiellement à partir du feuillet ectodermique. La contribution du mésoderme aux structures céphaliques des vertébrés est essentiellement constituée par l'endothélium vasculaire qui permet la formation des vaisseaux sanguins nécessaires à la nutrition et à l'oxygénation de cette nouvelle structure (voir Eichmann *et al.*, 1997) et aux muscles striés de la face.

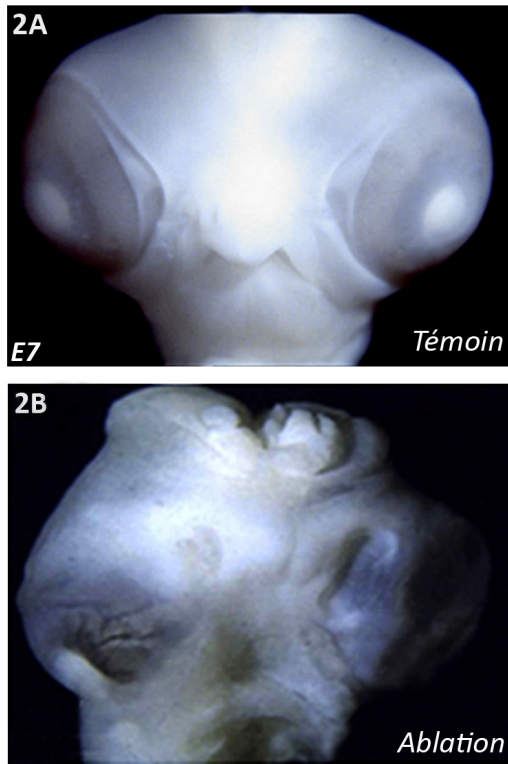


Fig. 2. Morphologie externe à 7 jours de développement, d'embryons (A) témoin et (B) privé chirurgicalement de FSNC. L'absence de CN entraîne l'agénésie des processus faciaux, des déficits oculaires sévères et s'accompagne d'une anencéphalie étendue. (Le Douarin *et al.*, 2004; reproduit avec la permission de *Development*).

L'hypothèse de la « Nouvelle Tête »

L'importance de la CN dans la construction de la tête des vertébrés, révélée par ces recherches en embryologie, a été à l'origine de l'hypothèse présentée par Gans et Northcutt dans un article paru dans la revue *Science* en 1983 intitulé « *Neural crest and the origin of vertebrates. A new head* » (Gans & Northcutt, 1983).

Ces auteurs y défendent l'idée que l'apparition de la crête neurale, chez l'embryon des premiers vertébrés, a constitué un pas évolutif décisif, car cette structure a joué un rôle clé dans la formation de ce qu'ils appellent « *une nouvelle tête* » qui se serait ajoutée au plan d'organisation préexistant des protocordés. Cette nouvelle tête a été le siège du développement d'un cerveau associé à des organes sensoriels (absents chez les protocordés) et d'un organe de prédation, la mâchoire, dont le squelette est entièrement dérivé de l'ébauche neurale elle-même.

L'hypothèse de Gans et Northcutt selon laquelle la CN, innovation des vertébrés, a joué un rôle majeur dans leur remarquable succès évolutif, *via* le pro-

cessus de céphalisation, a été renforcée par des travaux récents de notre laboratoire montrant le rôle de cette structure comme centre de régulation de la neurogenèse cérébrale.

La crête neurale « centre régulateur » de la neurogenèse cérébrale

Les expériences de Spemann et Mangold, réalisées en 1924, avaient montré le rôle majeur joué par une région bien délimitée de la gastrula d'amphibien, *laèvre dorsale du blastopore*, dans le développement de l'embryon. Transplantée sur la face ventrale du germe, elle pouvait induire un second axe embryonnaire contenant un tube neural et une notocorde, faisant de l'embryon greffé un être double, un siamois où deux « individus » étaient unis par un ventre commun.

Hans Spemann donna à cette région le nom de « *centre organisateur* » responsable de ce qu'il a appelé l'induction primaire, celle qui conduit à la formation du système nerveux central, à partir duquel tout s'organise ensuite, par une série d'inductions « secondaires » se produisant en chaîne.

Dans les années 1980–1990, des recherches sur le développement de l'encéphale ont révélé qu'à des stades plus tardifs que ceux étudiés par Spemann, deux régions de l'ébauche neurale jouent également un rôle « organisateur » car elles conditionnent la poursuite du développement des territoires avoisinants. Il s'agit de la jonction entre le cerveau moyen et le cerveau postérieur (*Midbrain-Hindbrain Junction – MHJ*) d'une part et du bourrelet neural antérieur (ou ANR pour *Anterior Neural Ridge*) d'autre part.

Ces régions du *primordium* neural exercent leur activité morphogénétique par l'intermédiaire du Fgf8, un facteur de signalisation qui intervient dans de nombreux systèmes de développement (voir Le Douarin, 1993 pour une revue et les références).

Les expériences que nous allons décrire ci-dessous montrent que la crête neurale céphalique joue un rôle très important dans le système des régulations qui s'exercent sur l'ébauche neurale en modulant la production de Fgf8 par ces deux structures.

Une des observations qui ont été à l'origine de cette partie du travail a été le fait que la partie la plus rostrale de la CN (correspondant aux cellules à partir desquelles se construisent les structures faciales) n'exprime aucun des gènes *Hox* qui sont essentiels pour l'organisation du reste du corps.

Afin de voir si cette caractéristique joue un rôle important dans l'évolution de la CN céphalique, nous avons procédé à l'ablation de cette région à un stade précédant l'émigration des cellules et nous l'avons ou non remplacée par la région plus caudale de la CN dont les cellules expriment le gène *Hoxa2*. Dans l'un

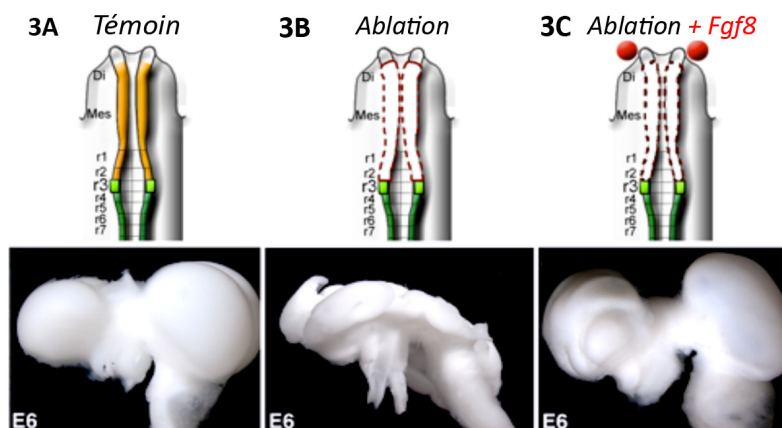


Fig. 3. La migration des cellules de la CN permet la fermeture du tube neural céphalique. (A) Chez un embryon témoin à 6 jours de développement, le cerveau pré-otique se subdivise en télencéphale, thalamus et toit optique. (B) Chez un embryon qui a été soumis à l'ablation de la FSNC au stade de la neurulation, le neuroépithélium du cerveau reste ouvert et aucune vésicule céphalique ne se développe. (C) L'implantation de billes imprégnées de protéine recombinante Fgf8 (en rouge), chez des embryons opérés, permet de restaurer la fermeture du tube neural et la croissance des vésicules céphaliques, en provoquant la migration rostrale des cellules de la CN depuis les limites du territoire excisé. (Creuzet *et al.*, 2006; Copyright 2006 *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA).

et l'autre de ces cas, les bourgeons faciaux ne se sont pas développés et les structures faciales ne se sont pas formées (figure 2). Il était donc clair que les cellules de la CN *Hox*-positives ne peuvent se substituer aux cellules rostrales *Hox*-négatives pour construire le squelette et les autres structures céphaliques dépendant de la CN antérieure (Creuzet *et al.*, 2002).

Une autre expérience a confirmé l'incompatibilité entre l'expression des gènes *Hox* et la formation des structures faciales. Elle a consisté à forcer l'expression du gène *Hoxa2* dans la CN rostrale avant le début de la migration de ses cellules. Dans ce cas, le phénotype des embryons était le même que dans l'expérience précédente. Dans les deux cas, les embryons non seulement n'avaient pas de face, mais ils présentaient aussi des anomalies sévères du prosencéphale et du mésencéphale dont les régions latérales et dorsales ne se développaient pas, ce qui aboutissait à une forme d'anencéphalie (figure 2). Un examen des embryons à 2,5 jours d'incubation (E2,5) montrait que les deux centres organisateurs encéphaliques (ANR et MHJ) étaient réduits et présentaient un déficit important en transcrits de Fgf8.

Dans le but de voir si les anomalies observées au niveau du cerveau pouvaient être dues à l'insuffisance de production de Fgf8 par l'ANR et la MHJ, nous avons apporté aux embryons, sur lesquels la FSNC avait été excisée, du Fgf8 exogène sous la forme de billes de Sphadex imprégnées par du Fgf8 recombinant.

Cet apport transitoire de Fgf8 est suffisant pour qu'un développement presque normal de la face et du cerveau s'accomplisse, à condition que la crête neurale

correspondant au rhombomère 3 ait été laissée *in situ*. En effet, sous l'influence du Fgf8 exogène, les cellules de la CN de r3, qui n'expriment pas le gène *Hoxa2*, se multiplient abondamment, colonisent les bourgeons faciaux et sont à l'origine du squelette facial qui se forme chez ces embryons, dans lesquels l'encéphale se développe normalement (figure 3; Creuzet *et al.*, 2006).

En l'absence des cellules de CN de r3 (*i.e.* après ablation de ce rhombomère), le phénotype des embryons dont on a enlevé la FSNC, n'est pas amélioré par l'addition d'une source exogène de Fgf8. Les cellules de la CN de r4, qui expriment le gène *Hoxa2*, sont en effet incapables, dans ce cas, de coloniser la région céphalique antérieure et de se substituer aux cellules *Hox*-négatives qui ont été excisées (Creuzet *et al.*, 2004).

L'étape suivante de ces recherches a consisté à rechercher par quel mécanisme moléculaire les cellules de la crête neurale rostrale modulent la production de Fgf8 par l'ANR et MHJ.

Production de molécules de signalisation à activité anti-Bmp par la CN rostrale (FSCN)

Deux sources principales de Bmps ont été identifiées dans la région rostrale de l'embryon aux stades de la céphalogenèse. L'une, active dans l'embryon précoce à E1,5–2, est située dans la plaque précordale et produit du Bmp7; l'autre, située dans le neuroépithélium préencéphalique et l'ectoderme correspondant, produit du Bmp4. Elle est particulièrement active à partir

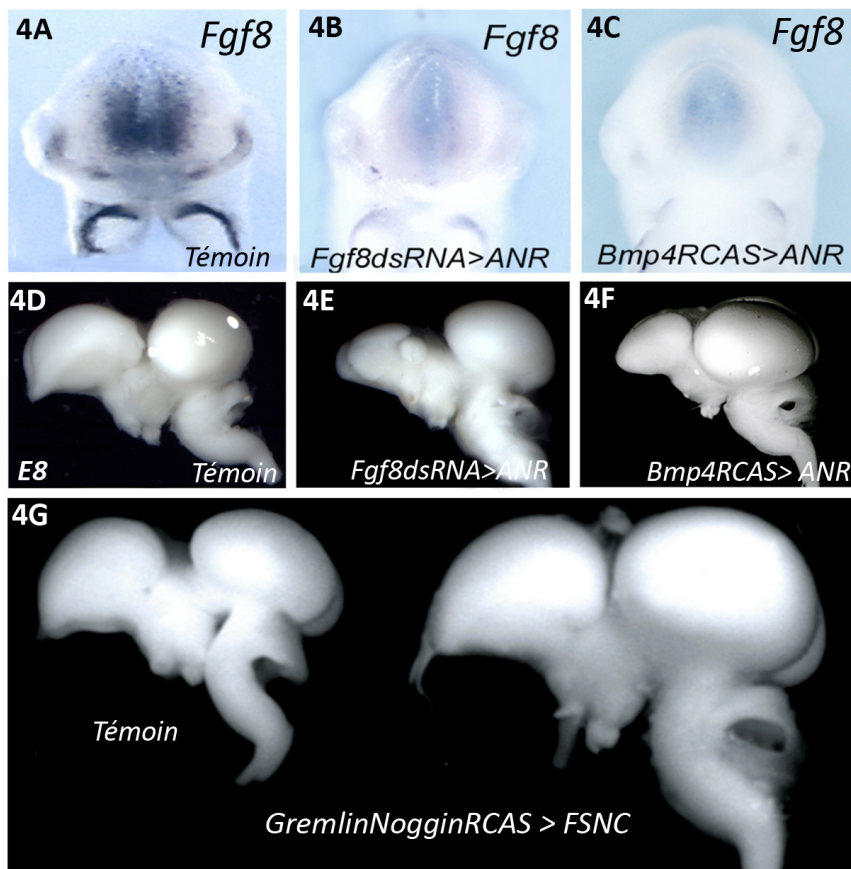


Fig. 4. Contrôle de l'activité du Fgf8 dans l'ANR par la FSNC. (A) Chez un embryon témoin à 2 jours de développement, l'ANR exprime fortement le morphogène Fgf8. L'extinction de l'activité du morphogène peut être induite soit par (B) l'interférence ARN ciblant directement l'expression de Fgf8, soit (C) en augmentant l'expression du signal antagoniste, Bmp4. En comparaison du développement cérébral normal à 6 jours (D), ces deux conditions expérimentales conduisent à une atrophie du télencéphale (E, F). À l'inverse, une production accrue des molécules *Gremlin* et *Noggin*, qui s'opposent à l'action de *Bmp4*, dans les cellules de la FSNC, entraîne le développement hypertrophique des vésicules céphaliques. (Creuzet, 2009; Copyright 2009 *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA).

de E2 (Crossley *et al.*, 2001). Les Bmps sont connus pour exercer une régulation négative de la production de Fgf8 dans cette région (Okhubo *et al.*, 2001; Aoto *et al.*, 2002). De plus, les facteurs exprimés dans l'organisateur de Spemann, *Chordin* et *Noggin* ont été reconnus comme intervenant dans le développement du cerveau antérieur chez la souris (Bachiller *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2002). Enfin, la CN encéphalique a été montrée comme étant la source des facteurs dorsalisants *Gremlin* et *Noggin* (Bardot *et al.*, 2001; Tzabor *et al.*, 2003) qui sont des antagonistes des Bmps.

L'expérience réalisée dans notre laboratoire (Creuzet, 2009) a donc consisté à moduler la production de Fgf8 dans les centres organisateurs céphaliques (ANR et MHJ) de diverses manières puis à observer les répercussions de ces interventions sur le développement du cerveau pré-otique.

Dans un premier temps, la production de Fgf8 a été fortement diminuée par électroporation d'ARN interférant pour cette molécule (Fgf8-dsRNA) dans l'ARN (figure 4A–C). Le même résultat peut être obtenu en induisant l'expression de Bmp4 directement dans cette structure par l'introduction de constructions rétrovirales contenant le c-DNA de Bmp4 (RCAS-Bmp4). Dans les deux cas, on observe une réduction importante du développement du pro-encéphale (figure 4D–F).

La démarche inverse a consisté à augmenter par transgénèse la production de *Gremlin* et *Noggin* dans la CN céphalique. On observe dans ce cas une augmentation considérable et globale du volume du cerveau des animaux traités (figure 4G) (Creuzet, 2009).

On voit ainsi que la crête neurale céphalique est capable de réguler la production du Bmp4 dans la

région céphalique. La quantité de Bmp4 produit règle la production de Fgf8 par les organisateurs secondaires de l'encéphale et, en conséquence, le volume des structures cérébrales latérales et dorsales du cerveau antérieur et moyen.

Fgf8 exerce à son tour un effet trophique et prolifératif sur les cellules de la crête neurale céphalique. Ainsi, est créé un système de signalisation dont l'équilibre est responsable du niveau de croissance des structures cérébrales.

Conclusion

La conclusion générale de cette étude, qui s'est étendue sur quatre décennies, est que la CN, une structure éphémère en tant que telle, a joué un rôle majeur dans l'évolution des vertébrés en permettant le développement considérable de leur cerveau.

La CN est aussi à l'origine de la face qui, du point de vue embryologique peut, de ce fait, être considérée comme une émanation de l'ébauche neurale antérieure génératrice du cerveau lui-même. La CN a donc joué un rôle essentiel dans le développement des fonctions d'adaptation et de cognition qui sont à l'origine du succès évolutif remarquable des vertébrés et se sont particulièrement développées dans l'espèce humaine.

Références

- Anderson R.M., Lawrence A.R., Stottmann R.W., Bachiller D., Klingensmith J., *Chordin* and *Noggin* promote organizing centers of forebrain development in the mouse. *Development*, 2002, 129, 4975–4987.
- Aoto K., Nishimura T., Eto K., Motoyama J., Mouse GLI3 regulates Fgf8 expression and apoptosis in the developing neural tube, face and limb bud. *Dev Biol*, 2002, 251, 320–332.
- Bachiller D., Klingensmith J., Kemp C., Belo J.A., Anderson R.M., May S.R., McMahon J.A., McMahon A.P., Harland R.M., Rossant J., De Robertis, E.M. The organizer factors chordin and noggin are required for mouse forebrain development. *Nature*, 2000, 403, 658–661.
- Bardot B., Lecoin L., Huillard E., Calothy G., Marx M., Expression pattern of the *drm/gremlin* gene during chicken embryonic development. *Mech Dev*, 2001, 101, 263–265.
- Couly G., Coltey P., Le Douarin N.M., The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development*, 1993, 117, 409–429.
- Couly G., Grapin-Botton A., Coltey P., Le Douarin N.M., The regeneration of the cephalic neural crest, a problem revisited: the regenerating cells originate from the contralateral or from the anterior and posterior neural fold. *Development*, 1996, 122, 3393–3407.
- Couly G., Grapin-Botton A., Coltey P., Ruhin B., Le Douarin N.M., Determination of the identity of the derivatives of the cephalic neural crest: incompatibility between *Hox* gene expression and lower jaw development. *Development*, 1998, 125, 3445–3459.
- Creuzet S., Regulation of pre-otic brain development by the cephalic neural crest. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106, 15774–15779.
- Creuzet S., Couly G., Vincent C., Le Douarin N.M., Negative effect of *Hox* gene expression on the development of neural crest derived facial skeleton. *Development*, 2002, 129, 4301–4313.
- Creuzet S., Schuler B., Couly G., Le Douarin N.M., Reciprocal relationships between *Fgf8* and neural crest cells in development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101, 4843–4847.
- Creuzet S., Martinez S., Le Douarin N.M., The cephalic neural crest exerts a critical effect on forebrain and midbrain development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103, 14033–14038.
- Crossley P.H., Martinez S., Ohkubo Y., Rubinstein J.L., Coordinate expression of *Fgf8*, *Otx2*, *Bmp4*, and *Shh* in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience*, 2001, 108, 183–206.
- Eichmann A., Corbel C., Nataf V., Vaigot P., Bréant C., Le Douarin N.M., Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94, 5141–5146.
- Gans C., Northcutt R.G., Neural crest and the origin of vertebrates. A new head. *Science*, 1983, 220, 268–274.
- Johnston M.C., An autoradiographic study of the migration and fate of cranial neural crest cells in the chick embryo. *Anat Rec*, 1966, 156, 143–156.
- Johnston M.C., Bhakdinaronk A., Reid Y.C., An expanded role of the neural crest in oral and pharyngeal development. In "Oral Sensation and Perception Development in the Fetus and Infant", J.F. Bosma (Ed.), US Government Printing Service: Washington, DC, 1974, pp. 37–52.
- Köntges G., Lumsden A., Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development*, 1996, 122, 3229–3242.
- Le Douarin N., Particularités du noyau interphasique chez la Caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*). Utilisation de ces particularités comme « marquage biologique » dans des recherches sur les interactions tissulaires et les migrations cellulaires au cours de l'ontogénèse. *Bull Biol Fr Belg*, 1969, 103, 435–452.

- Le Douarin N.M., *The Neural Crest*, 1982, Cambridge University Press, Cambridge.
- Le Douarin N.M., Embryonic neural chimeras in the study of brain development. *Trends Neurosci*, 1993, 16, 64–72.
- Le Douarin N.M., Kalcheim C., *The Neural Crest*, 2nd edition, 1999, Cambridge University Press, Cambridge.
- Le Douarin N.M., Creuzet S., Couly G., Dupin E., Neural crest cell plasticity and its limits. *Development*, 2004, 131, 4637–4650.
- Le Lièvre C., Rôle des cellules méséctodermiques issues des crêtes neurales céphaliques dans la formation des arcs branchiaux et du squelette viscéral. *J Embryol Exp Morph*, 1974, 31, 453–477.
- Le Lièvre C., Contribution des crêtes neurales à la genèse des structures céphaliques et cervicales chez les oiseaux. Doctorat d'État, 1976, Université de Nantes.
- Le Lièvre C., Participation of neural crest-derived cells in the genesis of the skull in birds. *J Embryol Exp Morph*, 1978, 47, 17–37.
- Le Lièvre C., Le Douarin N., Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morph*, 1975, 34, 125–154.
- Okhubo Y., Chiang C., Rubenstein J.L., Coordinate regulation and synergic action of BMP4, SHH and FGF in the rostral prosencephalon regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience*, 2001, 111, 1–17.
- Platt J., Ectodermic origin of the cartilage of the head. *Anat Anz*, 1893, 8, 506–509.
- Tzabor E., Kempf H., Mootosamy R.C., Poon A.C., Abzhanov A., Tabin C.J., Dietrich S., Lassar A.B., Antagonists of Wnt and BMP signaling promote the formation of vertebrate head muscle. *Genes Dev*, 2003, 17, 3087–3099.