



HAL
open science

Would D'Arcy Thompson have predicted a topological control of apoptosis?

Stephen Baghdiguian, Camille Martinand-Mari, Benoit Maury, Vladimir Lorman, Paul Mangeat

► **To cite this version:**

Stephen Baghdiguian, Camille Martinand-Mari, Benoit Maury, Vladimir Lorman, Paul Mangeat. Would D'Arcy Thompson have predicted a topological control of apoptosis?. *Médecine/Sciences*, 2013, 29 (4), pp.411-415. 10.1051/medsci/2013294015 . hal-00819925

HAL Id: hal-00819925

<https://hal.science/hal-00819925>

Submitted on 12 Feb 2019

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.

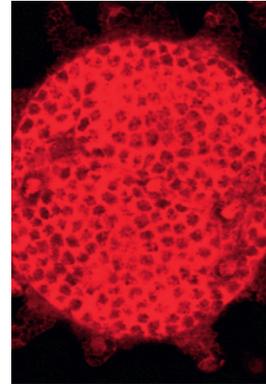
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

► Un des défis majeurs en biologie est de comprendre les lois qui régissent la morphogenèse. L'origine de l'apparition des formes est aujourd'hui généralement considérée comme découlant uniquement de processus moléculaires autonomes plutôt que reposant sur des contraintes physiques et mécaniques comme l'avait suggéré d'Arcy Thompson dès 1917. Dans un organisme modèle, l'œuf de *Ciona intestinalis*, un processus cellulaire, l'apoptose, est sous le contrôle de cellules géométriquement ordonnées au sein de deux monocouches épithéliales étroitement interconnectées (cellules folliculaires) et recouvrant une sphère (ovocyte). Ces observations suggèrent que des formes préexistantes générées par des contraintes physiques participent au contrôle du déterminisme cellulaire. Ainsi, le positionnement « idéal » des cellules folliculaires est exclusivement lié à la géométrie sphérique de l'ovocyte, et l'optimisation de l'apoptose massive observée dans l'épithélium sous-jacent découle directement de ce positionnement. De ces observations est né le concept d'« organisateur apoptotique » : certaines cellules seraient capables de contrôler le destin d'autres cellules, notamment en coordonnant les processus de mort cellulaire programmée. Ce concept pourrait éclairer d'un jour nouveau l'origine des phases d'apoptose massive et coordonnée nécessaires au bon déroulement de l'embryogenèse (cavitation, interdigitation). Il pourrait également être appliqué à certaines stratégies thérapeutiques anticancéreuses. ◀

La morphogenèse est l'ensemble des processus par lesquels se reconstituent, à chaque génération, les caractères morphologiques (la forme) des êtres vivants. La fascination qui s'y attache est aussi vieille que notre besoin de comprendre la nature. Dans cette tenta-

D'Arcy Thompson aurait-il prédit un contrôle topologique de l'apoptose ?

Stephen Baghdigian¹, Camille Martinand-Mari¹, Benoit Maury², Vladimir Lorman³, Paul Mangeat⁴



tive de compréhension, l'ouvrage *On growth and form* de d'Arcy Thompson représente une étape clé dans la prise en compte des lois de la physique comme une cause à la morphogenèse [1]. Malgré l'élégance de ces travaux [2], leur caractère non falsifiable

(pour reprendre la terminologie de Karl Popper) et les progrès spectaculaires de la génétique moléculaire ont orienté la biologie vers le paradigme du « tout génétique », négligeant ainsi toute approche géométrique du problème de la morphogenèse. Dans les chapitres sept et huit de son ouvrage, d'Arcy Thompson aborde le problème de la forme des tissus et des agrégats cellulaires sous l'angle de l'empilement optimum. De ce point de vue, la forme polygonale adoptée par les cellules épithéliales remplace la topologie au cœur du problème de la morphogenèse. Ce type de forme illustre parfaitement l'idée essentielle de d'Arcy Thompson, qui est qu'une certaine compréhension des processus morphogénétiques est possible sans avoir nécessairement recours aux propriétés particulières du substrat. Ainsi, les bulles de savon, le nid des abeilles ou les épithéliums monocouches adoptent la même topologie polygonale et génèrent des vertex à trois¹ (voir la représentation en bleu dans la *Figure 1B*). L'organisation polygonale des épithéliums est impliquée dans des processus cellulaires fondamentaux comme l'apoptose [3], la migration coordonnée des

¹ Université Montpellier 2, CNRS UMR5554, institut des sciences de l'évolution, place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France ;

² UFR des sciences pour la santé, 2, avenue de la source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France ;

³ Université Montpellier 2, CNRS UMR 5221, laboratoire Charles Coulomb, place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France ;

⁴ Université Montpellier 2, CNRS UMR 5237, centre de recherche de biochimie macromoléculaire, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

stbaghdi@univ-montp2.fr

¹ Les vertex à trois sont produits par le voisinage de cellules à base hexagonale. Ainsi, le voisinage de quatre cellules pentagonales produit un vertex à quatre.

cellules [4] ou encore l'orientation du plan de division au cours de la mitose [5]. Cette implication, toutefois, ne répond pas à la question de l'origine et de l'universalité du pavage polygonal observé dans de nombreuses structures biologiques. Cette question est d'autant plus importante que la fonction d'étanchéité assurée par les épithéliums découle directement de leur organisation polygonale.

En tant que membre du groupe actuel le plus proche des vertébrés [6, 7], *Ciona intestinalis* (Figure 1A) a émergé comme un modèle de choix pour l'étude du développement embryonnaire. Cette espèce est facilement manipulable au laboratoire, son lignage cellulaire est connu, l'embryogenèse est rapide (18 h à 18 °C) (Figure 1B, C), et son génome est complètement séquencé et très largement annoté [8, 18]. En outre, l'œuf de *Ciona* est recouvert d'un système folliculaire élaboré, géométriquement ordonné et dont l'élimination implique une phase d'apoptose coordonnée d'un point de vue spatio-temporel. *Ciona* est donc un modèle idéal pour l'étude des mécanismes moléculaires et/ou topologiques qui assurent l'orchestration d'un processus d'apoptose développementale.

Le système folliculaire

Le système folliculaire de *Ciona* est formé de deux feuillettes épithéliales à base polygonale qui recouvrent entièrement l'ovocyte (Figure 1B). Le feuillet externe est constitué des cellules folliculaires externes (CFE) et le feuillet interne des cellules de la testa (CT). Les deux feuillettes

sont idéalement observables au microscope du fait de leur position périphérique dessinant une forme régulière. Les CFE forment environ 60 structures de flottaison qui tapissent entièrement l'ovocyte. Le domaine membranaire basolatéral de chaque CFE présente un contour polygonal dont la surface recouvre, *via* le chorion, la surface de 20 CT également polygonales (pour un total de 1200 CT par œuf). Les deux couches épithéliales (les 60 CFE et les 1200 CT) forment un pavage compact autour de l'ovocyte. Le domaine membranaire basal des CFE est séparé du domaine membranaire apical des CT par une matrice extracellulaire jouant le rôle de lame basale, le chorion. Cette structure, perméable aux macromolécules comme du dextran fluorescent de masse moléculaire élevée, forme donc une barrière autorisant la diffusion verticale de messages biochimiques entre les CFE et les CT (Figure 2C). En complément, des messages latéraux au sein de la monocouche de CT sont possibles *via* les jonctions communicantes (Figure 2D). Des tests par permutation démontrent que le positionnement des noyaux des CFE autour de l'ovocyte n'est pas aléatoire, mais obéit à un ordre géométrique global ($p < 2,10^{-4}$). Cet ordre est exclusivement sous le contrôle de contraintes topologiques liées à la sphéricité de l'œuf, et il est secondairement utilisé pour optimiser un processus d'apoptose massive affectant les deux types cellulaires [9].

Apoptose du système folliculaire : le rôle déterminant des contraintes géométriques

Au cours du développement précoce, les CFE et les CT, caractérisées par des noyaux de taille très différente (Figure 2A, B), entrent en apoptose de façon séquentielle : l'apoptose des CFE précède toujours celle des CT sous-jacentes (Figure 2A, B). Au tout début du développement embryonnaire, les CFE synthétisent de la thyroxine, un régulateur de la voie $\kappa\text{B}/\text{NF-}\kappa\text{B}$ [10], et assurent la survie des CT *via* une activation de cette voie par la thyroxine. *A contrario*, la mort des CFE induit celle des CT sous-jacentes *via* un signal non identifié à ce jour [9, 10]. Ainsi, le destin des CT dépend de celui des CFE, et cette conclusion a pu être confortée par des ablations mécaniques aléatoires des CFE suivies d'une analyse des conséquences de cette ablation sur l'apparition de l'apoptose dans les CT. La Figure 2E présente un exemple de résultat obtenu par ablation mécanique qui conforte l'idée que les CFE jouent un rôle déterminant dans l'apparition de l'apoptose dans les CT. Un argument

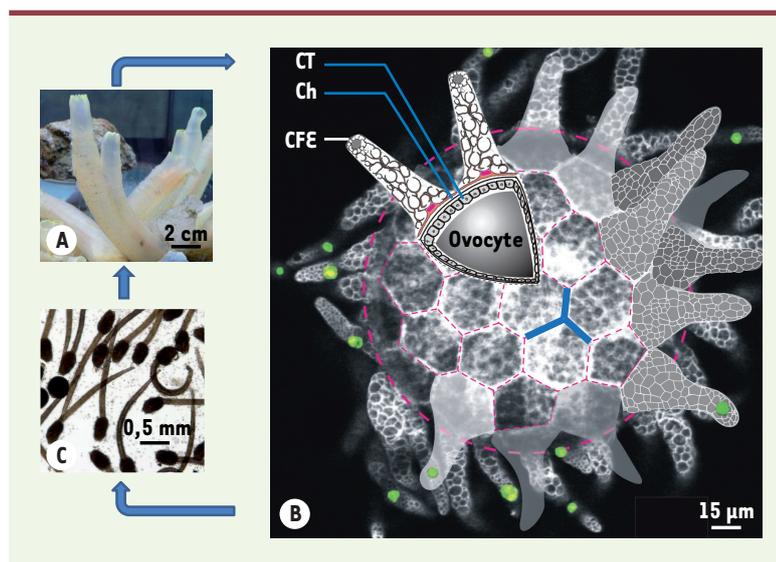


Figure 1. Cycle biologique de *Ciona intestinalis*. Après fécondation des œufs, le développement embryonnaire se déroule en 18 h à 18 °C. **A.** Individus adultes. **B.** Anatomie de l'œuf de *Ciona intestinalis*. Le contour des cellules est visualisé par un marquage phalloïdine-rhodamine de la F-actine. L'intégration, dans l'image, d'une partie schématisée en perspective aide à la compréhension de l'anatomie des deux feuillettes épithéliales. Un exemple de vertex à trois est représenté en bleu au centre de l'image. ©Laurence Meslin (CNRS) et Stephen Baghdiguan (UM2). Ch : chorion ; CT : cellules de la testa ; CFE : cellules folliculaires externes. **C.** Stade têtard. Ces derniers nagent pendant 4 à 6 h, puis se fixent à un substrat pour subir une métamorphose spectaculaire.

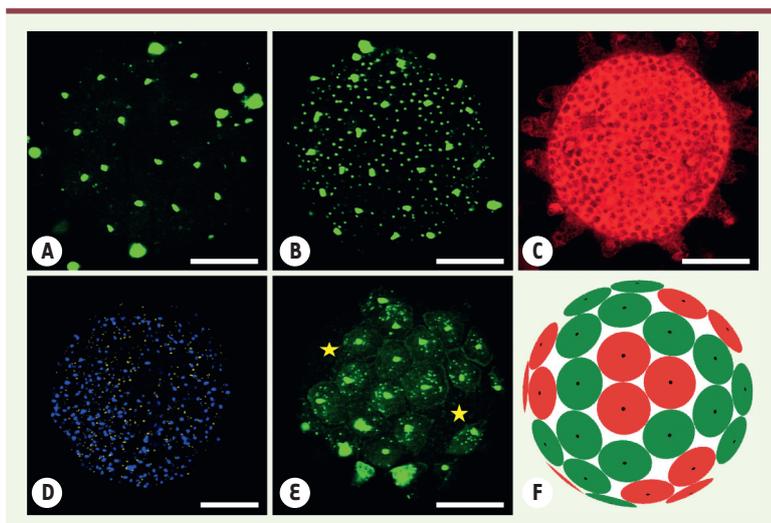


Figure 2. Données expérimentales étayant le concept d'organisateur apoptotique. **A.** Le marquage TUNEL (vert) permet de visualiser l'apoptose dans les CFE (cellules folliculaires externes) après 1 h d'incubation d'œufs non fécondés dans l'eau de mer. La position (les uns par rapport aux autres) des noyaux des CFE est statistiquement non aléatoire. **B.** Deux heures après l'apparition de l'apoptose dans les CFE (gros noyaux), la presque totalité des CT (cellules de la testa, petits noyaux) sont également en apoptose (marquage TUNEL vert). **C.** Image obtenue après incubation des œufs en présence de dextran fluorescent (rouge) de masse moléculaire 12 000. **D.** Double marquage connexine (jaune) et noyau (bleu). **E.** Les CFE contrôlent l'apoptose des CT sous-jacentes (œuf après 3 h de stabulation). Les marquages TUNEL (vert) montrent clairement

que les noyaux des CT sont positifs (petits noyaux) uniquement dans les zones où les CFE en apoptose (gros noyaux) n'ont pas été arrachées. À l'inverse, les zones où les CFE ont été éliminées mécaniquement (étoiles jaunes) sont exemptes d'apoptose. **F.** Résultat d'une simulation numérique pour le positionnement de $N = 60$ noyaux qui minimise l'énergie d'interaction pour $8 < \alpha < 12$. Notez que plusieurs axes de symétrie d'ordre 3 (centre des triangles rouges) apparaissent dans l'organisation globale. Barre d'échelle : 50 μm .

supplémentaire en faveur d'un tel rôle est la mise en évidence d'un facteur soluble et diffusible présent uniquement dans les extraits de CFE apoptotiques, et seul capable de déclencher l'apoptose des CT lors d'incubations expérimentales [9].

L'ensemble de ces observations est compatible avec l'hypothèse selon laquelle le destin de 60 cellules contrôle celui de 1200, et cela du fait d'un positionnement optimal autour d'une sphère (l'ovocyte). Ce modèle est le premier exemple d'un contrôle de déterminisme cellulaire (l'apoptose) par des contraintes géométriques et topologiques (Figure 3). L'utilisation d'outils développés en physique statistique a permis d'étayer cette hypothèse [9].

Les cellules folliculaires forment un pavage de symétrie tétraédrique

La distribution des noyaux, comme le contour des CFE, forment deux pavages réguliers et étroitement liés qui caractérisent l'ordre géométrique évoqué plus haut (Figure 3). Le domaine membranaire basal des CFE forme les faces d'un pavage polygonal. Les noyaux (Figure 2A) forment un autre pavage qualifié en topologie de « graphe de triangulation de surface ». Les sommets de ce graphe sont associés aux positions des noyaux, ses faces sont des triangles formés par les sommets voisins, ses côtés passant entre les plus proches voisins uniquement. L'étude du pavage des noyaux (contrairement à l'étude du pavage polygonal des contours) ne nécessite pas d'hypothèse physique supplémentaire concernant la distribution de contraintes mécaniques qui s'exercent sur le cytosquelette. Ces considérations ont conduit au développement d'un modèle basé sur l'interaction intercellulaire « molle », à courte portée, à la surface d'une sphère entièrement tapissée de cellules. L'état d'équilibre de 60 cellules « molles » qui en résulte correspond à une répartition spécifique de 48 cellules hexagonales et 12 cellules pentagonales (en

accord avec le théorème d'Euler) dont les noyaux forment un pavage de symétrie tétraédrique.

Cette approche a aussi permis de modéliser cette distribution de manière numérique, et de proposer son approximation analytique. Un exemple de résultat obtenu par simulation numérique pour $N = 60$ est présenté dans la Figure 2F. Ce type de représentation graphique est parfaitement adapté à la validation expérimentale du modèle théorique. Il est, en effet, particulièrement facile d'analyser par microscopie confocale et reconstruction 3D le positionnement effectif des noyaux des CFE à la surface des ovocytes après marquage fluorescent (Figure 2A). Ces analyses ont été effectuées sur un grand nombre d'œufs et les données obtenues sur des œufs de diamètre différents ont conduit à valider avec encore plus de robustesse ces simulations numériques. Cette démarche, ainsi que la comparaison avec tout autre type de pavage cellulaire symétrique, ont permis de montrer sans ambiguïté que la configuration tétraédrique adoptée par un pavage autour d'une sphère pour $N = 60$ cellules était optimale. Cette optimisation est exclusivement sous la dépendance de contraintes géométriques (sphéricité) et topologiques (pavage polygonal étanche caractéristique des épithéliums). Jusqu'à présent, la plupart des données obtenues en termes de pavage d'objets à géométrie sphérique l'ont été sur des éléments rigides (fullerènes, pollens, capsides virales). L'obtention de solutions numériques et analytiques à la structuration d'objets faisant appel à des interactions élastiques à courte distance caractéristiques des membranes

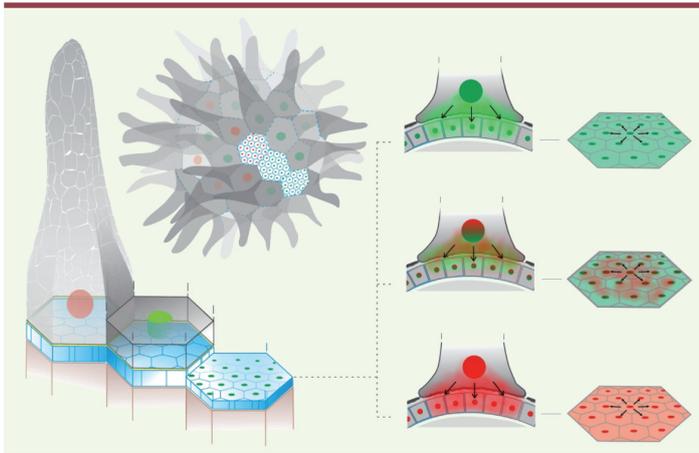


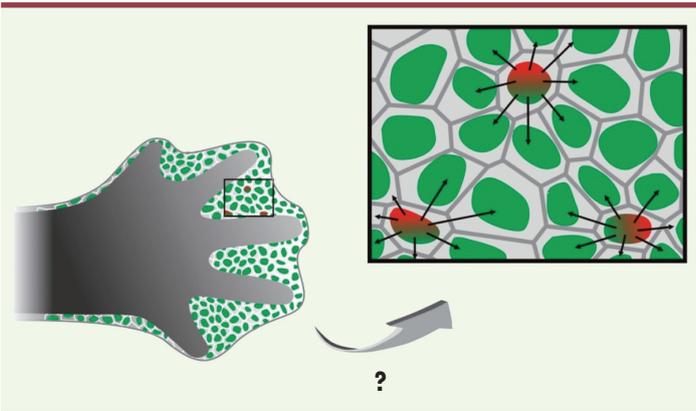
Figure 3. Illustration schématique du contrôle topologique de la vie et de la mort dans le système folliculaire de *Ciona*. Les 60 CFE (cellules folliculaires externes) présentent un positionnement ordonné (partie gauche du schéma) exclusivement lié à des contraintes géométriques (sphéricité de l'ovocyte) et topologiques (pavage sans trou). Un zoom permet de mieux comprendre l'organisation 3D du système folliculaire (en bas à gauche du schéma). Ce positionnement permet de contrôler la vie (signal diffusible vert) et la mort (signal diffusible rouge) des 1 200 CT (cellules de la testa) sous-jacentes (coupe longitudinale présentée dans la partie centrale du schéma). Ces signaux de vie et de mort peuvent également être optimisés par la présence de jonctions communicantes entre les CT (vue en perspective transversale présentée dans la partie droite du schéma) (© Laurence Meslin, CNRS et Stephen Baghdiguian, UM2).

biologiques est maintenant possible grâce à l'utilisation de modèles biologiques pertinents [9]. On voit là l'intérêt d'un aller-retour permanent entre physique, statistique et biologie, chaque discipline s'alimentant des apports des autres.

Conclusions et perspectives

L'implication de l'apoptose dans la morphogenèse animale et la formation de structures régulièrement espacées sont aujourd'hui bien établies. L'ensemble des données obtenues avec le modèle *Ciona* conforte l'idée selon laquelle un contrôle « architectural » de l'apoptose est également possible chez les métazoaires. Ainsi, un modèle préétabli par des contraintes géométriques et topologiques permet l'optimisation d'un programme apoptotique au cours duquel la mort de 60 cellules géométriquement positionnées contrôle celle des 1 200 cellules sous-jacentes. La démonstration statistique du rôle clé des CFE sur l'apoptose des CT valide d'ailleurs ce concept [9]. Ainsi, la remarquable coordination des processus apoptotiques observés à des moments précis de l'embryogenèse pourraient n'être que le fruit d'une utilisation secondaire de faits biologiques dont la raison d'être tient à des contraintes de l'architecture globale d'un tissu voire d'un organisme. Le modèle *Ciona* est un révélateur de cette situation et c'est dans ce cadre que doit être compris le concept d'« organisateur apoptotique », où le positionnement idéal (sous le seul contrôle de contraintes physiques) de cellules spécialisées dans la sécrétion

d'apoptogènes (cette fonction étant quant à elle *a priori* indépendante de la topologie) orchestre et optimise certaines formes d'apoptose développementale. D'une manière plus générale, ce concept peut être associé à celui d'effet de voisinage (*the bystander effect*) développé il y a une dizaine d'années [11]. Dans cette optique, il avait été envisagé de cibler le suicide d'une tumeur par thérapie génique. Cette stratégie consiste à introduire dans des cellules cancéreuses un gène dont le produit est capable de convertir une pro-drogue non toxique en un agent fortement cytotoxique [12]. Un de ces gènes suicides, la thymidine kinase du *simplex herpes virus* (HSVtk) en combinaison avec le ganciclovir (GCV) a ainsi été utilisé avec succès sur une grande variété de tumeurs dans des modèles animaux. HSVtk phosphoryle l'analogue guanosine GCV et conduit à sa transformation en ganciclovir-triphosphate qui bloque l'activité des ADN polymérase cellulaires [13]. L'apoptose induite par le GCV est due à l'incorporation de la drogue dans l'ADN, ce qui entraîne la formation de cassures double-brin et un arrêt du cycle en phase S ou G2/M [14]. Par ce mécanisme, les cellules exprimant HSVtk peuvent être tuées dans des systèmes de culture en deux dimensions après cinq jours de traitement par 20 μ M de GCV, et transmettre cette toxicité aux cellules adjacentes qui n'expriment pas HSVtk. Ce phénomène, qui implique l'envoi de signaux apoptotiques d'une cellule en apoptose vers d'autres cellules, est qualifié d'effet de voisinage. Cet effet est rendu possible par les jonctions communicantes qui permettent le transfert latéral d'apoptogènes optimisant ainsi l'effet de la drogue [11]. Dans une moindre mesure, cet effet est également observé dans des sphéroïdes tumoraux [15], prouvant que l'effet de voisinage est également possible dans des systèmes 3D. L'élimination ciblée de quelques cellules au sein d'une tumeur conduisant à sa régression efficace est une idée séduisante qui s'apparente assez bien avec le concept d'« organisateur apoptotique » établi chez *Ciona* [9]. En effet, l'ensemble des acteurs nécessaires à un tel scénario de suicide collectif est présent dans les deux modèles. Dans un cas, ces acteurs pourraient optimiser la régression tumorale indépendamment d'une organisation positionnelle ordonnée ; celle-ci est d'ailleurs difficilement envisageable dans une tumeur dont l'organisation cellulaire est loin d'adopter un pavage géométrique tétraédrique. Dans l'autre cas, ces acteurs assurent le bon déroulement du développement précoce *via* un ordre géométrique et topologique préétabli. Pour être généralisés, ces concepts (organisateur apoptotique, *bystander effect*) devront toutefois être validés chez d'autres organismes dans lesquels des phases



Figures 4. La sculpture des membres observée chez les vertébrés à la fin du développement embryonnaire pourrait-elle être sous le contrôle d'organismes apoptotiques géométriquement ordonnés ?

d'apoptose massive ont été préalablement observées. Ainsi, il serait judicieux, à la lumière de ces nouvelles perspectives, de réévaluer expérimentalement quelques exemples bien connus d'apoptose massive et coordonnée observés au cours du développement embryonnaire, par exemple le phénomène de cavitation chez les mammifères [16] ou d'interdigitation chez les vertébrés. En effet, au moment de la maturation de l'extrémité des membres chez les vertébrés, une mort cellulaire programmée massive des cellules interdigitales se met en place, à l'origine de la forme finale des doigts ou des pattes (Figure 4). Les réseaux moléculaires qui contrôlent cette sculpture des membres sont maintenant connus [17] mais, pour l'instant, la question d'une orchestration possible de ces processus par des cellules « apoptogéniques », comme c'est le cas chez *Ciona*, reste complètement ouverte (Figure 4).

En conclusion, les données expérimentales et théoriques obtenues chez *Ciona* sont à l'origine de deux nouveaux concepts : d'une part l'implication de contraintes architecturales fondamentales ayant secondairement acquis une utilité fonctionnelle, dans le contrôle optimisé de la vie et de la mort des cellules au sein de structures tissulaires complexes ; et d'autre part, l'existence d'un organisateur apoptotique à la fois capable d'entrer en apoptose et de transmettre un signal apoptotique vers des cellules voisines (*bystander effect*). ♦

SUMMARY

Would D'Arcy Thompson have predicted a topological control of apoptosis?

The laws that drive morphogenesis remain a major biological question. Today's views emphasize molecular autonomous processes rather than physical and mechanical constraints proposed by d'Arcy Thompson earlier on. In *Ciona intestinalis* oocyte, follicular cells formed by two distinct sets of geometrically-ordered epithelial monolayers positioned over the egg control apoptosis, implying that physically-pre-determined shapes play a role in the control of cell determinism. In follicular cells ideally positioned over the spherical geometry of the egg, a drastic, optimized and polarized inward apoptosis sequence directly results from this positioning, suggesting the existence of some

apoptotic master cells which control the destiny of neighboring cells. This concept could shed a new light on the origin of massive apoptosis phases that take place during embryogenesis in vertebrates (e.g., cavitation, inter-digitation). It could also be applied to specific therapeutic strategies to fight cancer. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Laurence Meslin pour avoir réalisé l'ensemble des représentations schématisques. Ce travail représente la contribution n°2012-214 de l'Institut des sciences de l'évolution de Montpellier (UMR 5554-CNRS).

RÉFÉRENCES

1. D'Arcy W. Thompson. *On growth and form*. Cambridge : Cambridge University Press, 1942 : 1116 p.
2. Prost J. Mais où sont passés les gènes ? *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 1043-4.
3. Chen CS, Mrksich M, Huang S, et al. Geometric control of cell life and death. *Science* 1997 ; 276 : 1425-8.
4. Lecuit T, Lenne PF. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 ; 8 : 633-44.
5. Gibson WT, Veldhuis JH, Rubinstein B, et al. Control of the mitotic cleavage plane by local epithelial topology. *Cell* 2011 ; 144 : 427-38.
6. Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 2006 ; 439 : 965-8.
7. Delsuc F, Baurain D, Philippe H. Origine des vertébrés : la tunique fait-elle le moine ? *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 688-90.
8. Dehal P, Satou Y, Campbell RK, et al. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* 2002 ; 298 : 2157-67.
9. Martinand-Mari C, Maury B, Rousset F, et al. Topological control of life and death in non-proliferative epithelia. *PLoS One* 2009 ; 4 : e4202.
10. Maury B, Martinand-Mari C, Chambon JP, et al. Fertilization regulates apoptosis of *Ciona intestinalis* extra-embryonic cells through thyroxine (T4)-dependent NF-kappaB pathway activation during early embryonic development. *Dev Biol* 2006 ; 289 : 152-65.
11. Andrade-Rozental AF, Rozental R, Hopperstad MG, et al. Gap junctions: the kiss of death and the kiss of life. *Brain Res Brain Res Rev* 2000 ; 32 : 308-15.
12. Aghi M, Hochberg F, Breakefield XO. Prodrug activation enzymes in cancer gene therapy. *J Gene Med* 2000 ; 2 : 148-64.
13. Moolten FL. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* 1986 ; 46 : 5276-81.
14. Tomicic MT, Thust R, Kaina B. Ganciclovir-induced apoptosis in HSV-1 thymidine kinase expressing cells: critical role of DNA breaks, Bcl-2 decline and caspase-9 activation. *Oncogene* 2002 ; 21 : 2141-53.
15. Finocchiaro LM, Bumashny VF, Karara AL. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in multicellular tumor spheroids. *Cancer Gene Ther* 2004 ; 11 : 333-45.
16. Coucouvanis E, Martin GR. Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* 1995 ; 83 : 279-87.
17. Chautan M, Chazal G, Cecconi F, et al. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol* 1999 ; 9 : 967-70.
18. Lamy C, Lemaire P. Les embryons d'ascidies : de la naissance de l'embryologie expérimentale à l'analyse des réseaux de gènes. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 263-9.

TIRÉS À PART

S. Baghdigian