

50 576  
1971  
124-1  
N° D'ORDRE 249

50376

1971

124-1

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES  
ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir

LE GRADE DE  
DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

ROGER MARCEL

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE FACTEURS  
INTERVENANT DANS LA RÉGÉNÉRATION CHEZ LE  
LOMBRICIEN EISENIA FETIDA SAV. F. TYPICA  
(ANNÉLIDE OLIGOCHÈTE)



Soutenue le 17 DEC. 1971

devant la commission d'examen

MM. R. DEFRETIN Président  
M. DURCHON Rapporteur  
T. LENDER Examineur  
F. ANDRÉ Examineur

SCD LILLE 1



D 030 196808 8

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

**THÈSE**

présentée à

**L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES  
ET TECHNIQUES DE LILLE**

pour obtenir

**LE GRADE DE  
DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES**

par

**ROGER MARCEL**

---

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE 3 FACTEURS  
INTERVENANT DANS LA RÉGÉNÉRATION CHEZ LE  
LOMBRICIEN EISENIA FŒTIDA SAV. F. TYPICA  
(ANNÉLIDE OLIGOCHÈTE)**

Soutenu le  1971  
devant la commission d'examen

---

MM. R. DEFRETIN	Président
M. DURCHON	Rapporteur
T. LENDER	Examineur
F. ANDRÉ	Examineur

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE FACTEURS  
INTERVENANT DANS LA REGENERATION  
CHEZ LE LOMBRICIEN EUSENTA FOETIDA SAV.  
F. TYPICA (ANNELIDE, OLIGOCHETE)

---

Roger MARCEL

---

Laboratoire de Biologie Animale et Laboratoire Associé au CNRS n° 148

Université des Sciences et Techniques de Lille



UNIVERSITE DES SCIENCES  
ET TECHNIQUES DE LILLE

-----

DOYENS HONORAIRES de l'ancienne Faculté des Sciences

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des anciennes Facultés de Droit et  
Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DEHORS, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERRET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, LIEBART, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKY.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. DEFRETIN René

Professeur de Biologie Marine  
Directeur de l'Institut de Biologie Marine  
et Régionale de Wimereux.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFTLS Jean Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	Physique
M. BLOCH Vincent	Psychophysiologie
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie et Physico-Chimie Industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CAPET Marcel-Francis	Institut de Préparation aux Affaires
M. CELET Paul	Géologie
M. CONSTANT Eugène	Physique Industrielle - Electronique
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques Générales



### Professeurs Titulaires (Suite)

M. DEDECKER Paul	Mathématiques
M. DEFRETIN René	Biologie Marine
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Zoologie Générale et Appliquée
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Radio-électricité et Electronique
M. GEHU Jean-Marie	Institut Agricole
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Expérimentale
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. POUZET Pierre	Informatique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Analyse Supérieure
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WERTHEIMER Raymond	Physique

### PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. DELHAYE Michel	Chimie
M. FLATRES Pierre	Géographie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LINDER Robert	Botanique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. PARREAU Michel	Mathématiques Appliquées
M. PRUDHOMME Rémy	Droit et Sciences Economiques
M. SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BILLARD Jean	Physique
M. BODARD Marcel	Botanique
M. BOILLET Pierre	Physique
M. DERCOURT Jean-Michel	Géologie
M. DEVRAINE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie
M. GRUSON Laurent	Mathématiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANDAIS Jean	Chimie
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
M. LOUCHEUX Claude	Chimie
M. MAES Serge	Physique
Mlle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTEL Marc	Physique
M. PANET Marius	I E E A
M. PROUVOST Jean	Minéralogie

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés de fonctions)

M. ANTOINE Philippe	Mathématiques
M. ADAM Michel	Economie Politique
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. AUBIN Thierry	Mathématiques Pures
M. BART André	Biologie Animale
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Bénoni	Zoologie
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Analyse Numérique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique

M. CORTOIS Jean	Physique
M. COULON Jean-Paul	Physique Appliquée
M. DEBRABANT Pierre	Instrumentation Géophysique
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique
M. DRIEUX Baudoin	I E E A
M. DYMENT Arthur	Mathématiques
M. ESCAIG Bertrand	Physique
Mme EVRARD Micheline	Chimie
M. FROELICH Daniel	Sciences des Matériaux
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Mathématiques
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD de la MARRE Pierre	Mécanique
M. JOLY Robert	Biologie (Amiens)
M. JOURNEL Gérard	Physique
Mle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. KREMBEL Jean	Chimie Biologique
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie
M. LAURENT François	Automatique
M. LAVAGNE Pierre	Sciences Economiques et de Gestion
Mle LEGRAND Denise	Mathématiques
Mle LEGRAND Solange	Mathématiques (Calais)
Mme LEHMANN Josiane	Calcul des Probabilités
M. LENTACKER Firmin	Géographie et Aménagement Spatial
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique
M. LOUAGE Francis	Mesures Industrielles
Mme MAILLET Monique	Sciences Economiques
M. MAIZIERES Christian	E E A
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
M. MERIAUX Emile	Sciences de la Terre
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Chimie (Sciences Appliquées)
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Végétale
M. MUSSCHE Guy	Sciences Economiques
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique



M. OUZIAUX Roger	Technologie des Machines
M. PAQUET Jacques	Géotechnique
M. PARSY Fernand	Mathématiques
M. PONSOLLE Louis	Chimie (Valenciennes)
M. PERROT Pierre	Chimie
M. POVY Jean-Claude	Automatique
M. RACZY Ladislas	Physique
Mme RENVERSEZ Françoise	Sciences Economiques
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SALMER Georges	Radio-électricité et Electronique
M. SIMON Michel	Psychologie
M. SLIWA Henry	Chimie
M. SMET Pierre	Physique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Chimie Biologique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Informatique
M. TREANTON Jean-René	Psychologie
M. VANDORPE Bernard	Chimie-Physique
M. VILETTE Michel	Génie Mécanique
M. WATERLOT Michel	Géologie

## S O M M A I R E

INTRODUCTION .....	p. 1
TERMINOLOGIE .....	p. 4
MATERIEL ET METHODES .....	p. 5
A - ELEVAGE .....	p. 5
B - TECHNIQUE OPERATOIRE .....	p. 6
1 - Cultures organotypiques .....	p. 6
2 - Opérations <u>in vivo</u> .....	p. 7
C - TECHNIQUE HISTOLOGIQUE .....	p. 8
D - TECHNIQUE BIOMETRIQUE .....	p. 9
E - TECHNIQUE BIOCHIMIQUE .....	p. 9

### PREMIERE PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE .....	p. 10
I - REGENERATION CEPHALIQUE .....	p. 11
Chapitre 1 - MISE EN EVIDENCE D'UNE SUBSTANCE INHIBITRICE .....	p. 11
1 - Tronçons 8 - 13 (= "antérieurs") .....	p. 11
2 - Tronçons 18 - 23 (= "postérieurs") .....	p. 12
3 - Conclusion .....	p. 12
Chapitre 2 - ROLE DU SYSTEME NERVEUX AU COURS DE L'INHIBITION DE LA REGENERATION CEPHALIQUE .....	p. 14
1 - Influence du système nerveux antérieur .....	p. 14
2 - Action du broyat de moitiés dorsales et ventrales prélevées dans la région céphalique .....	p. 15
3 - Effet des broyats des différentes parties du système nerveux central .....	p. 17
4 - Action des broyats de ganglions ventraux prélevés à différents niveaux de l'axe antéro-postérieur .....	p. 18
5 - Effets de la dilution de broyats des ganglions 5 à 7 .....	p. 19
Discussion et conclusion .....	p. 20
Chapitre 3 - ROLE INDUCTEUR DU SYSTEME NERVEUX .....	p. 25
Chapitre 4 - ETUDE "IN VIVO" DE L'INHIBITION CEPHALIQUE .....	p. 28
1 - Régénération après injection unique de broyats .....	p. 28
2 - Régénération après injections répétées de broyats .....	p. 30
Discussion et conclusion .....	p. 31

II - REGENERATION CAUDALE .....	p. 33
Chapitre 5 - ETUDE "IN VIVO" DE L'INHIBITION .....	p. 33
1 - Régénération au niveau de l'intersegment 50/51 .....	p. 34
2 - Régénération au niveau de l'intersegment 60/61 .....	p. 35
Discussion et conclusion .....	p. 35
III - DISCUSSION ET CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE .....	p. 38

## DEUXIEME PARTIE

ACTION DES SUBSTANCES INHIBITRICES SPECIFIQUES	
SUR LE BLASTEME DE REGENERATION (Etude histologique)	
	p. 41
Chapitre 1 - LE BOUCHON CICATRICIEL CHEZ LES VERS INHIBES .....	p. 43
Chapitre 2 - LES PREMIERS STADES DE LA REGENERATION ANTERIEURE ....	p. 45
1 - Chronologie des différentes phases de la régénération chez les témoins .....	p. 45
2 - Mise en place et évolution du bourgeon de régéné- ration en présence de broyat de têtes .....	p. 46
3 - Evolution du blastème en présence de broyat de queues .....	p. 47
Conclusion.....	p. 48
Chapitre 3 - LES PREMIERS STADES DE LA REGENERATION CAUDALE .....	p. 50
1 - Les différentes étapes de la régénération chez les témoins .....	p. 50
a - Chronologie des différents stades de la régénération dans le type "clos" .....	p. 51
b - Chronologie de la régénération suivant le type "ouvert" .....	p. 53
c - Discussion .....	p. 53
2 - La régénération chez les vers ayant reçu du broyat de queues .....	p. 54
3 - La régénération en présence de broyat de têtes .....	p. 55
Conclusion .....	p. 56
DISCUSSION ET CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE .....	p. 57



## TROISIEME PARTIE

### ACTION DES SUBSTANCES INHIBITRICES SPECIFIQUES SUR LES CELLULES SECRETRICES DE LA CHAINE NERVEUSE p. 59

Chapitre 1 - CYCLES NEUROSECRETOIRES CHEZ LES TEMOINS EN REGENERATION	p. 62
1 - Le neuromère d' <u>E. foetida</u> .....	p. 62
2 - Cycle sécrétoire au cours de la régénération antérieure .....	p. 63
3 - Cycle sécrétoire pendant la régénération caudale .....	p. 66
4 - Discussion et conclusion .....	p. 67
Chapitre 2 - CYCLE SECRETOIRE EN PRESENCE D'INHIBITEUR CEPHALIQUE OU DE SUBSTANCE TROPHIQUE D'ORIGINE CAUDALE .....	p. 70
1 - Action de l'inhibiteur céphalique .....	p. 70
2 - Action de la substance trophique d'origine caudale .....	p. 72
3 - Conclusion .....	p. 74
Chapitre 3 - CYCLES SECRETOIRES EN PRESENCE D'INHIBITEUR ET DE SUBSTANCE TROPHIQUE AU COURS DE LA REGENERATION CAUDALE .....	p. 76
1 - Action de l'homogénat de régions caudales .....	p. 76
2 - Action de l'homogénat de régions céphaliques .....	p. 78
3 - Discussion et conclusion .....	p. 81
DISCUSSION ET CONCLUSION DE LA TROISIEME PARTIE .....	p. 84

## QUATRIEME PARTIE

### APPROCHES BIOCHIMIQUES DE L'ISOLEMENT DE LA SUBSTANCE INHIBITRICE CEPHALIQUE

INTRODUCTION .....	p. 91
Chapitre 1 - CARACTERISATION D'UNE FRACTION DIALYSABLE ACTIVE .....	p. 93
1 - Méthode .....	p. 93
2 - Essai biologique .....	p. 93
3 - Conclusion .....	p. 94

Chapitre 2 - COMPOSITION DE LA FRACTION MICROMOLECULAIRE ET FRACTIONNEMENT SUR RESINES ECHANGEUSES D'IONS .....	p. 95
A - ELECTROPHORESE A pH 3,9 .....	p. 95
1 - Protocole .....	p. 95
2 - Résultats .....	p. 95
B - CHROMATOGRAPHIE SUR ECHANGEURS D'IONS .....	p. 96
1 - Protocole .....	p. 96
2 - Résultats des tests biologiques .....	p. 97
3 - Conclusion .....	p. 97
Chapitre 3 - ANALYSE DE LA FRACTION DITE "NEUTRE" .....	p. 99
1 - Electrophorèse à pH 3,9 .....	p. 99
2 - Composition en acides aminés de la fraction dite "neutre" ...	p. 100
a - Analyse de la fraction "neutre" avant hydrolyse .....	p. 100
b - Composition en acides aminés après hydrolyse de 24 h. ....	p. 100
c - Hydrolyse de la fraction "neutre" pendant 48 h. ....	p. 101
3 - Conclusion .....	p. 102
CONCLUSION DE LA QUATRIEME PARTIE .....	p. 103

#### DISCUSSION ET CONCLUSION

##### GENERALES

p. 104

## AVANT-PROPOS

Avant de commencer cet exposé, je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur DURCHON qui m'a confié ce sujet de thèse. Je n'oublie pas qu'il m'a initié à la recherche, lorsque j'ai entrepris, sous sa direction, un Diplôme d'Etudes Supérieures. Il m'accueillit alors dans son laboratoire et m'enseigna non seulement des techniques mais aussi et surtout, avec un enthousiasme communicatif, et malgré de nombreuses difficultés matérielles, le désir acharné de connaître. Depuis, malgré ses charges de plus en plus lourdes, il a toujours suivi dans le détail l'évolution de mon travail, me guidant et me conseillant constamment. Qu'il veuille bien accepter, avec ce mémoire, l'expression de ma respectueuse gratitude.

Je tiens à remercier également Monsieur le Professeur DEFRETIN, Président de l'Université de Lille I, de l'intérêt qu'il porte à mon travail. Je lui suis particulièrement reconnaissant d'avoir accepté de présider mon Jury de Thèse en dépit de ses importantes responsabilités administratives.

Monsieur le Professeur LENDER, de l'Université de Paris XI, m'a fait l'honneur de s'intéresser à mes recherches et de participer à mon Jury de Thèse. Je me permets de lui témoigner ma sincère reconnaissance.

Je remercie également Monsieur le Professeur ANDRE, de l'Université de Bordeaux I, qui a bien voulu accepter de juger ce travail en participant à mon Jury de Thèse.

Une partie des expériences a pu être réalisée au Laboratoire de Chimie Biologique grâce à l'obligeance de Monsieur le Professeur MONTREUIL à qui j'adresse mes vifs remerciements.



## INTRODUCTION

C'est surtout depuis la fin du XIX<sup>e</sup> siècle que les recherches expérimentales ont permis d'étudier le phénomène complexe de la régénération chez les Oligochètes. Ces très nombreux travaux ont été analysés dans les remarquables mises au point de STOLTE (1955) et AVEL (1959). Toutefois il est nécessaire de comparer les résultats obtenus chez les Oligochètes à ceux décrits dans d'autres groupes de vers, en particulier les Polychètes et les Planaires. C'est ainsi que les articles de synthèse de AVEL (1947, 1961), ABELOOS (1965), HERLANT-MEEWIS et DELIGNE (1965) et DURCHON (1967 a, 1967 b) sur les Annélides Polychètes et Oligochètes, WOLFF (1962, 1967) chez les Planaires, permettent de dégager les faits suivants.

AVEL (1930, 1932, 1947) montre chez Eisenia foetida, par de délicates opérations, que "la chaîne nerveuse ancienne est nécessaire à une régénération normale, qu'elle ne détermine pas la nature du régénérat, qu'elle n'est pas l'inducteur des différenciations mais qu'elle provoque la prolifération des tissus ecto-mésodermiques". (AVEL, 1959).

OKADA (1932) détermine la poussée de têtes supplémentaires en détournant la chaîne nerveuse chez Myricola aesthetica et chez Eisenia foetida (OKADA et KAWAKAMI, 1943). Ainsi prend corps la notion de "rôle trophique" de la chaîne nerveuse.

CHILD (1911, 1929). à partir d'expériences sur les Planaires formule sa célèbre théorie des "gradients". Pour cet auteur, le gradient métabolique axial est maintenu par la "dominance" de la tête. Cette notion de dominance est évidemment liée à celle d'inhibition. Ce phénomène est démontré chez les Planaires, au niveau de la tête, de la queue ou de différents organes par RAND et BROWNE dès 1926, suivis entre autres par LENDER (1955), PENTZ (1961, 1963), ZILLER-SENGEL (1967). (Voir Tableau I).

Des expériences du même type sont conduites sur une Némerte, Lineus vegetus par TUCKER (1959) puis par SMITH (1963) sur le Polychète Clymenella

TABLEAU I  
 RECHERCHES ANTERIEURES SUR  
 L'INHIBITION CHEZ DIFFERENTES  
 ESPECES DE VERS

AUTEURS	ANNEE	ESPECES	TECHNIQUES
		<u>PLANAIRE</u>	
CHILD	1911	<i>Planaria dorotocephala</i>	Sections
-		<i>Planaria sp.</i>	"
RAND et ELLIS	1926	<i>Planaria maculata</i>	Sections :double-tête double-queue
RAND et BROWNE	1926	<i>P. maculata</i>	Greffes
LENDER	1955	<i>Polycelis nigra</i>	Broyats
	1956	<i>Dugesia lugubris</i>	Greffes-Broyats
PENTZ et SEILERN-ASPANG	1961	<i>Polycelis nigra</i>	Sections
ZILLER-SENGEL	1966	<i>Dugesia lugubris</i>	Greffes - Broyats
	1967 a, b	<i>D. tigrina</i>	"
		<i>Polycelis nigra</i>	"
		<u>NEMERTES</u>	
TUCKER	1959	<i>Lineus vegetus</i>	Broyats
		<u>POLYCHETES</u>	
SMITH(S.D.)	1933	<i>Clymenella torquata</i>	Broyats
		<u>OLIGOCHETES</u>	
KROPP	1963	<i>Helodrilus caliginosus</i>	Broyats
MARCEL	1967	<i>Eisenia foetida typica</i>	Broyats
CHAPRON	1969	<i>Eisenia foetida unicolor</i>	Greffes



torquata. Utilisant les méthodes des greffes ou des broyats dilués dans le milieu de culture, ces auteurs ont pu montrer qu'une tête ou une queue ou un organe inhibait spécifiquement la régénération de la partie homologue amputée.

Chez les Oligochètes, KROPP (1933) essayant de montrer le rôle trophique du système nerveux antérieur sur la régénération céphalique, a observé, au lieu d'une action favorisante, un affaiblissement de la régénération de la tête. Cet auteur, toutefois, n'a pas interprété ce fait comme le résultat d'une inhibition.

AVEL (1941, 1950) a mis en évidence les processus inducteurs qui interviennent au cours de la régénération céphalique chez les Lombriciens. De son côté LENDER (1952) a montré le rôle inducteur du cerveau sur la régénération des yeux de la Planaire Polycelis nigra. Sur cette même espèce, FENTZ (1961, 1963) a observé que le développement des yeux, après induction cérébrale, était limité en taille et en nombre par un facteur inhibiteur issu de ces yeux mêmes : si l'influence inductrice est peu importante, un petit nombre d'yeux se développe ; mais chacun d'eux atteint une grande taille car la quantité de facteur inhibiteur en provenance des yeux néoformés est faible. Par contre si l'induction est forte, le nombre d'yeux est grand ; l'inhibition est alors elle aussi très forte : par suite les yeux restent petits. WOLFF et ses élèves, ayant repris certaines expériences anciennes et ayant précisé ces résultats par de nouvelles, ont pu expliquer le mécanisme de la régénération des Planaires par un enchaînement d'inductions.

Des travaux de HUBL (1956), il ressort que la présence du cerveau serait nécessaire à la régénération caudale après section des dix derniers segments. Ces résultats n'ont pas été entièrement confirmés par des recherches plus récentes sur des Lombriciens amphodynames ou homodynames. En ce qui concerne Eisenia foetida, il semble que le cerveau soit nécessaire dans les cas de régénération très postérieure mais non à des niveaux plus antérieurs (JUBERTHIE, 1965)

D'autre part GERSCH et VOHLRABE (1965) ont mis en évidence le rôle de cellules neurosécrétrices cérébrales dans la régénération postérieure d'Enchytraeus (Oligochète Limicole).

Ainsi donc, il apparaît que la régénération serait sous la dépendance du système nerveux central. Celui-ci la favoriserait grâce à un triple rôle :

1 - endocrine, par l'élaboration dans des neurones du cerveau d'une hormone agissant sur la régénération postérieure ;

2 - inducteur, au cours de la morphogenèse de certains organes, en élaborant une "organisine" ;

3 - trophique, au niveau de la chaîne nerveuse, en particulier aux abords du front de section.

D'autre part, la régénération pourrait être limitée par un système inhibiteur, empêchant la formation d'un organe déjà mis en place (voir Tableau I).

Dans ce travail, notre but a été, chez une espèce d'Oligochète terricole, Eisenia foetida, d'analyser ces différents facteurs, d'en localiser l'origine et de tenter d'isoler les principes actifs responsables, dans la régénération céphalique et dans la régénération caudale. Toutefois, l'action endocrine étant controversée chez E. foetida (SUDAIN, 1968) ou tout au moins limitée à la reformation des derniers segments caudaux (JUBERTHIE, 1965), nous nous sommes placés dans des conditions expérimentales telles (50° et 60° segments) que cette action ne pouvait se faire sentir et introduire, le cas échéant, une cause d'erreur.

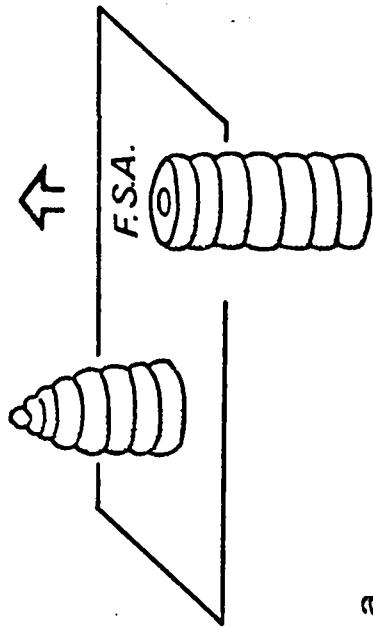
Nous nous proposons donc, dans une première partie, d'étudier expérimentalement l'inhibition spécifique et le rôle trophique de la chaîne nerveuse, ainsi que le rôle inducteur du cerveau. Dans une deuxième partie, nous rechercherons histologiquement sur quels tissus ou cellules influe l'inhibition et nous envisagerons l'origine possible du facteur trophique de la chaîne ventrale (3° partie). Enfin dans une quatrième partie, nous essayerons d'aborder le problème de l'isolement, par des méthodes biochimiques, de la substance inhibitrice ainsi mise en évidence.

Figure 1 - Terminologie.

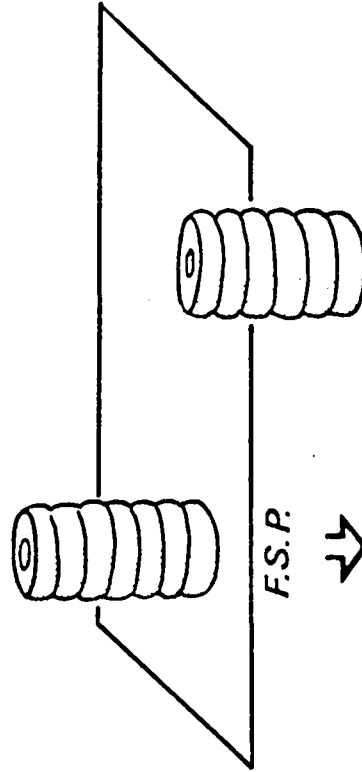
- a - Après coupure en deux tronçons (plan horizontal) une partie postérieure est limitée par un front de section antérieur (F S A) et forme (flèche) un régénérat céphalique.
  
- b - Une partie postérieure est limitée par un front de section postérieur (F S P) et forme (flèche) un régénérat caudal.



Régénération  
céphalique



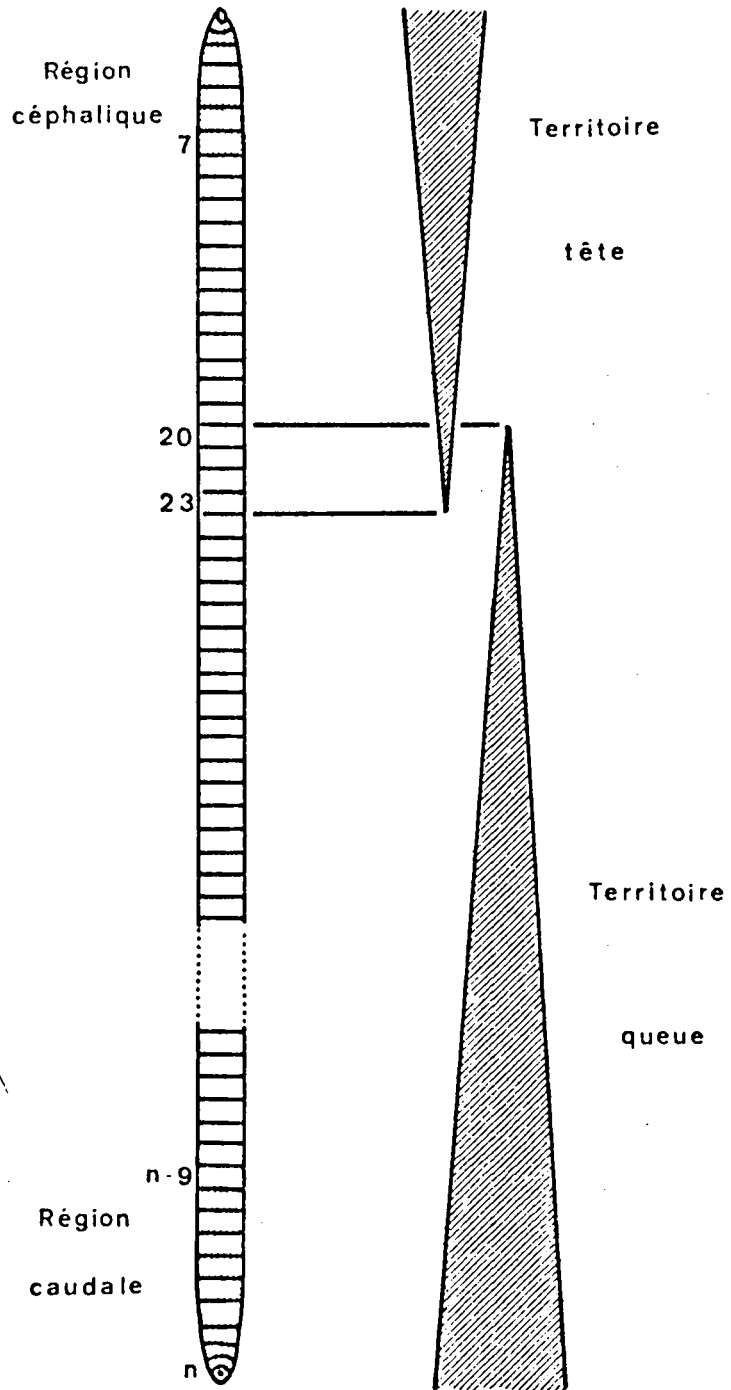
a



b Régénération  
caudale

Figure 2 - Etendue des territoires de régénération.

Le territoire tête s'étend jusqu'au 23<sup>e</sup> métamère tandis que le territoire queue commence vers le 20<sup>e</sup>. Les sources d'inhibiteurs (en grisé sur la figure) sont localisées dans la "région céphalique" (les 7 premiers segments et le prostomium) et dans la "région caudale" (les 10 derniers métamères et le pygidium).



## TERMINOLOGIE

Nous utiliserons dans ce travail la terminologie définie par AVEL (1959). Lorsqu'un ver est coupé en deux (quelle que soit la taille des fragments) le tronçon antérieur est limité par un front de section postérieure et la régénération, si elle a lieu, est dite postérieure ou caudale. Inversement, une partie postérieure formera éventuellement, vers l'avant, un régénérat antérieur ou céphalique (Fig. 1). Nous avons suivi AVEL (1959) après GATES (1949) pour qualifier d'équimériques, hypomériques ou hypermériques des régénérats respectivement à nombres de segments égaux, inférieurs ou supérieurs à ceux de la partie amputée.

Ce que nous appelons région céphalique, en particulier comme source d'inhibiteur, ne correspond nullement à la région "céphalisée" discutée par AVEL (1959), mais comprend les 7 premiers segments et le prostomium. De même, nous nommons région caudale les dix derniers métamères et le pygidium (Fig. 2).

Le territoire de régénération céphalique (= territoire tête) s'étend, chez Eisenia foetida, jusqu'au 21° segment (ANDRE, 1949, cité par AVEL, 1959) ou 23° segment (GATES, 1949). D'après GATES (1950), des régénérats caudaux, métamérisés, peuvent être obtenus à partir de l'intersegment 20/21. La figure 2 schématise l'étendue de ces deux territoires.

## MATERIEL ET METHODES

Toutes nos recherches ont été conduites sur le Lombricien Eisenia foetida Sav. forme typica, espèce homodyname que nous avons élevée au laboratoire suivant plusieurs procédés.

### A - ELEVAGE

#### 1 - Technique de HERLANT-MEEWIS (1954)

Des adultes, sexuellement mûrs, prélevés dans la nature d'abord, puis provenant de notre élevage, sont conservés par couples pendant quelque temps dans des boîtes de Pétri sur du terreau tamisé, bien humide, additionné de feuilles de frêne macérées. Lorsque la fécondation réciproque des partenaires est prouvée par l'émission de plusieurs cocons, les vers sont isolés dans des boîtes d'élevage identiques aux précédentes. Cet isolement autorise un rythme de ponte plus rapide, comme l'a montré HERLANT-MEEWIS, et nous a permis de récolter en moyenne un cocon tous les trois jours et par ver contre un cocon tous les six jours, par ver, lorsque ceux-ci restent par couples. Les cocons sont relevés trois fois par semaine et mis à incuber dans une boîte de Pétri, entre deux rondelles de papier filtre de même diamètre, humidifiées régulièrement. Une étiquette porte la date de récolte et la référence du parent. Les jeunes vers sont retirés dès leur naissance et placés, par lots de 10, dans des pots en terre selon la technique suivante.

#### 2 - Technique de AVEL (1929)

Les pots, de 13 cm de diamètre sur 12 de haut, sont remplis au trois-quarts de terreau tamisé, très humide et légèrement tassé. L'orifice inférieur est obturé par un petit opercule de verre. Au milieu du terreau est disposée une couche de feuilles de frêne macérées. Les pots sont recouverts d'une plaque de verre pour éviter une dessiccation trop rapide, et placés dans une cuvette que l'on remplit d'eau une fois par semaine. Cette méthode permet d'avoir facilement des lots homogènes de vers dont on connaît exactement l'âge et la provenance. Mais pour disposer d'une quantité supérieure d'individus, en vue de broyats, nous avons dû procéder à un élevage "en masse".

### 3 - Elevage "en masse"

Les vers se reproduisent librement dans plusieurs bacs de 80 cm sur 50, remplis de terreau auquel sont ajoutées régulièrement les feuilles macérées. Les bacs sont disposés dans une pièce maintenue constamment à 20° C. L'humidité est entretenue par arrosage hebdomadaire. Les animaux sont ainsi susceptibles de se multiplier même pendant la mauvaise saison. Les vers sont récoltés au fur et à mesure des besoins. Cette technique nous a permis d'obtenir sans grandes difficultés les nombreux vers nécessaires aux études biochimiques.

## B - TECHNIQUE OPERATOIRE

La partie expérimentale de notre travail a été effectuée selon les méthodes de cultures organotypiques et d'opérations "in vivo".

### 1 - Cultures organotypiques

Les explants sont cultivés sur le milieu gélosé mis au point par C. SENDEL (1960) pour les cultures de blastèmes de planaires. Ce milieu a déjà été essayé par SCHALLER (inédit, cité par DURCHON, 1964) pour Eisenia foetida avec des résultats satisfaisants. Nous avons toutefois été amené à augmenter la concentration en gélose en raison de la taille et de la mobilité de nos explants. La composition du milieu utilisé est la suivante :

Gélose à 1 % dans la solution de Holtfreter . . . . .	8 gouttes
Solution de Holtfreter + glucose à 1% . . . . .	4 gouttes
Extrait d'embryon de poulet dilué à 50 % . . . . .	
dans le Holtfreter glucosé à 1 % . . . . .	3 gouttes
Spécilline G . . . . .	500 UI
Streptomycine . . . . .	0,01 mg

Avant solidification de la gélose, est éventuellement ajouté à ce milieu le broyat à raison de 2 gouttes par salière. Dans ce cas, la quantité de gélose est portée à 10 gouttes pour maintenir la dureté du substrat.

Les Eisenia, âgés de un mois, devant fournir les explants, sont isolés, pendant quelques jours, en milieu stérile, sur du papier filtre humidifié par du liquide de Holtfreter stérilisé et additionné de pénicilline et de streptomycine (respectivement 50 000 UI et 3,5 mg pour 100 ml). Il est en effet indispensable, pour éviter le plus possible les contaminations du milieu par des bactéries ou par des champignons, d'obtenir une <sup>de culture</sup>

élimination totale de la terre contenue dans le tube digestif. La température constante (24° C) et l'obscurité favorisent une activité normale des vers qui mangent le papier filtre.

Au moment de la mise en culture, les sujets sont exposés pendant une dizaine de minutes à l'action des radiations U.V. d'un tube germicide. Toutes les opérations d'explantation et de mise en culture sont réalisées en chambre stérile. Les explants sont constitués par des tronçons de 5 segments de long. Les sections sont effectuées, sans anesthésie préalable, au moyen d'un microscalpel. Les explants, après lavage dans la solution de Holtfreter et essorage, sont déposés à la surface du milieu gélosé. Lorsque des associations sont pratiquées, les deux explants sont réunis par des agrafes en fil d'argent. En leur absence, en effet, les fragments se déplacent et la soudure ne se fait pas correctement. Les cultures sont observées, et éventuellement asséchées tous les trois jours et repiquées tous les 10 jours.

La survie des explants est très bonne. La contamination bactérienne est rare. Le développement de champignons est par contre plus fréquent et nous avons, pour certaines séries, utilisé de la mycostatine pour en limiter l'extension.

Préparation des broyats. Le jour de la mise en culture, les donneurs sont disséqués dans du liquide de Holtfreter, sous la loupe bino-culaire, et les différents fragments prélevés sont, par lots, broyés avec un homogénéiseur de Potter dans le Holtfreter. La concentration est de 10 fragments pour 1 ml de solution. Après centrifugation à 5 000 g pendant 10 minutes, le surnageant est stérilisé par passage sur filtres Millipore de 0,45  $\mu$ . Le filtrat est prêt à être mélangé au milieu de culture.

## 2 - Opérations "in vivo"

Les vers à opérer sont isolés comme précédemment, mais en milieu non stérile. Les broyats sont préparés à partir de tronçons prélevés à l'avance, congelés et stockés à -70° C. Les régions céphaliques (7 segments) et caudales (10 segments) sont ainsi conservées longtemps sans altération. L'homogénat, obtenu avec l'appareil de Potter dans de l'eau bi-distillée, est centrifugé à 30 000 t/mn pendant une heure (centrifugeuse Spinco, rotor 40). Nous avons été amené à augmenter sensiblement la vitesse de centrifugation pour éliminer le plus complètement possible les débris

tissulaires, enrobés de mucus, qui auraient pu entraver la suite des manipulations. Le sédiment est repris une seconde fois à l'homogénéiseur en présence d'eau bidistillée et de nouveau centrifugé à 30 000 t/mn pendant une heure. Les deux surnageants sont mélangés et lyophilisés. Au moment de l'expérience, les lyophilisats sont dissous dans du liquide de Holtfreter à la concentration de une région céphalique ou caudale pour 10  $\mu$ l.

Sous anesthésie profonde au chloréto-ne à C, 15 %, les 7 premiers segments sont réséqués. Dans le cas de la régénération caudale, la section est faite à l'intersegment 50/51 ou au niveau 60/61. Dans les deux séries, les opérés reçoivent aussitôt la solution à tester, sous forme d'injection intra-coelomique au moyen d'une seringue "Hamilton". L'aiguille est introduite directement au niveau du front de section en direction proximo-distale sur une longueur de 5 ou 6 métamères. Lorsque des doses de rappel doivent être administrées aux sujets, les injections suivantes sont conduites, sur des vers légèrement anesthésiés, disto-proximale-ment au travers de la paroi du corps, une dizaine de segments en arrière du front de section. De la sorte, la solution remplit la cavité coelomique des 4 ou 5 premiers métamères. Dans tous les cas, la survie est assez bonne et semble dépendre de la manière dont est pratiquée l'opération : une lésion importante de la musculature pariétale ou du tube digestif est néfaste. Les vers en expérience sont placés à l'obscurité dans une enceinte maintenue à 24° C. Les segments régénérés sont comptés tous les deux jours.

## C - TECHNIQUE HISTOLOGIQUE

### 1 - Contrôle microscopique des cultures

Après l'expérimentation, c'est-à-dire au bout de trois semaines de culture, tous les explants sont fixés au Bouin-Hollande sans acide acétique, pour être étudiés au microscope. Les coupes, à la paraffine, de 5 ou 7  $\mu$  d'épaisseur, pratiquées suivant un plan sagittal, sont colorées au glychémalun de Mayer ou selon la technique de Prenant modifiée par Gabe.

### 2 - Etude histologique des opérés "in vivo"

Des séries de vers opérés, en régénération céphalique ou caudale, ont été fixées à des temps réguliers après l'opération. Les colorations utilisées ont été le glychémalun de Mayer, pour l'étude topo-



graphique, et la fuchsine-paraldéhyde de Gabe, suivant la technique de Clark, pour la mise en évidence des cellules sécrétrices.

#### D - TECHNIQUE BIOMETRIQUE

Pour estimer la signification des résultats des expériences "in vitro", nous avons comparé les pourcentages obtenus à ceux observés chez les témoins en calculant à chaque fois l'écart réduit. Lorsque la différence était significative, nous avons recherché le degré de signification.

Pour chaque lot de vers en régénération "in vivo", la moyenne du nombre des métamères néoformés est calculée à chaque observation ainsi que l'écart-type. Pour ce calcul, n'ont été retenus que les vers ayant survécu pendant la totalité de la durée de l'expérience. La comparaison entre les moyennes des différents lots et celles des témoins, à un instant donné, est effectuée par le test "t" de "Student", après avoir vérifié par le test "F" que les variances n'étaient pas significativement différentes pour le risque 5 %. Dans les cas contraires, la comparaison a néanmoins pu être réalisée par le test "U" de Mann et Whitney, qui ne postule pas une telle identité entre les variances. Enfin nous nous sommes assuré de la normalité de la distribution des nombres de segments régénérés par une méthode graphique (droite de Henry).

#### E - TECHNIQUE BIOCHIMIQUE

La préparation des homogénats est réalisée comme précédemment (voir le paragraphe opérations "in vivo"). Les différentes méthodes biochimiques utilisées sur le matériel lyophilisé seront exposées dans la quatrième partie.

PREMIERE PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

Figure 3 - Schéma des expériences ayant permis de mettre en évidence une substance inhibitrice de la régénération céphalique.

Le tronçon 8-13, hachuré sur la partie gauche de la figure, est soumis à l'influence de broyats de régions céphaliques ou moyennes (flèches).

Le tronçon 18-23, représenté à droite de la figure, est mis en présence d'homogénats des régions céphalique, oesophagiennes et caudales (flèche).

Tronçons 8 - 13

Tronçons 18 - 23

Région céphalique

Région céphalique

R. œsophagienne

R. moyenne

R. caudale

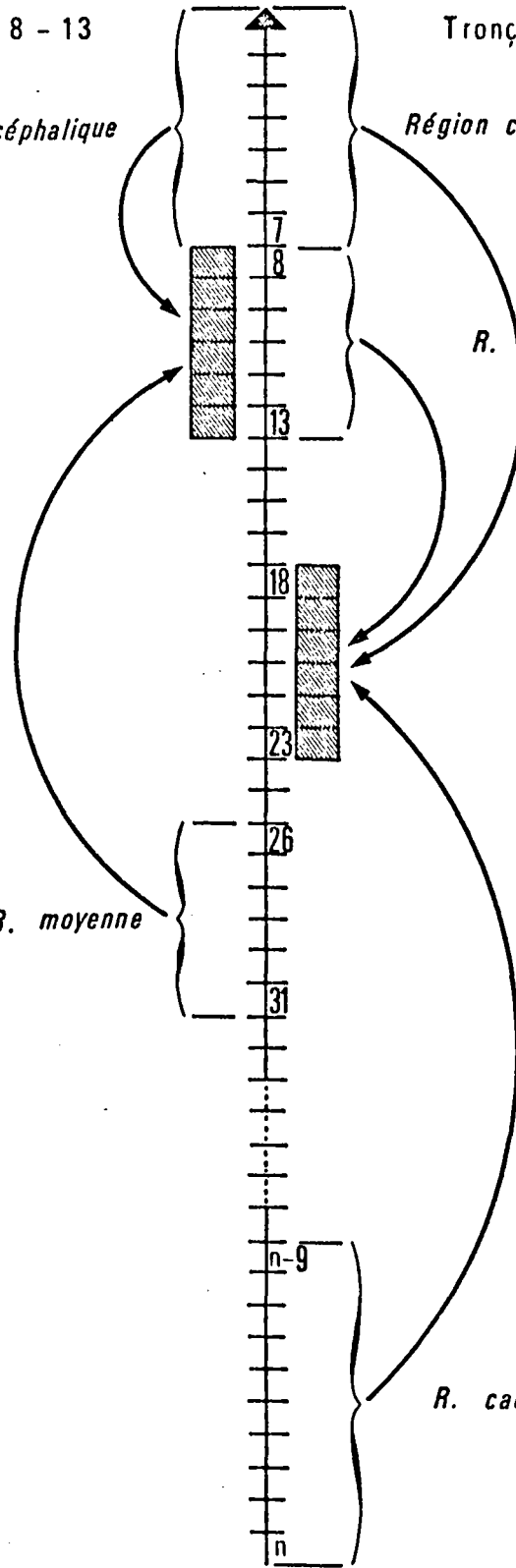




TABLEAU II

## INHIBITION DANS LES TRONCONS 8-13 ("ANTERIEURS")

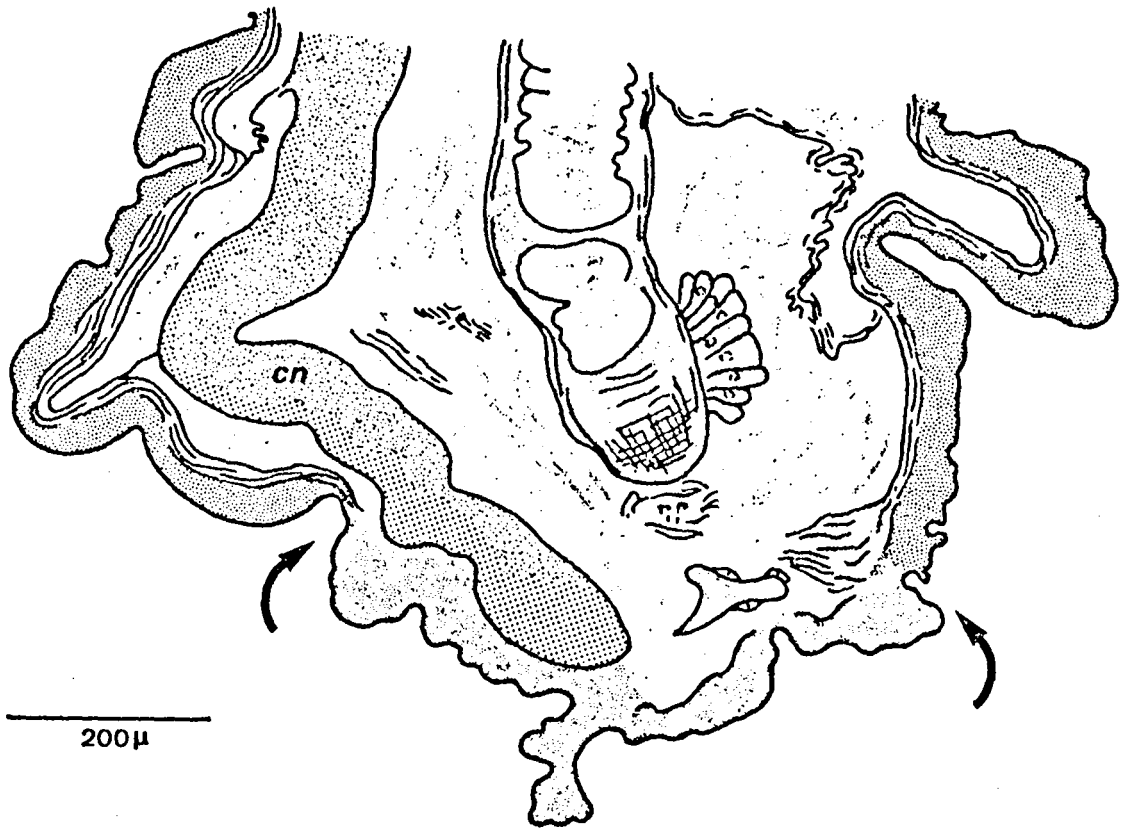
Broyats	Nombre d'opérés survivants	Nombres de Régénérats		Nombres de vers n'ayant pas régénéré	% de vers n'ayant pas régénéré normalement	Signification
		Normaux	Anormaux			
Métamères 1 à 7 (= Région céphalique)	20	5	2	13	75 %	+ (0,01)
Métamères 26 à 31 (= Région moyenne)	20	14	0	6	30 %	-
Témoin	14	10	0	4	29 %	

N.B. Le signe + indique une différence significative par rapport aux témoins, le signe - une différence non-significative. Le nombre entre parenthèses représente le degré de signification.

Figure 4 - Coupe sagittale d'un tronçon 8-13 soumis à l'action du  
broyat de région céphalique (5 semaines de culture).

bl : blastème cicatriciel (entre les flèches)

cn : chaîne nerveuse.



200μ

*bl*



I

REGENERATION CEPHALIQUE

Chapitre 1

MISE EN EVIDENCE D'UNE SUBSTANCE INHIBITRICE

Par la méthode des cultures, nous avons recherché l'existence éventuelle d'une inhibition spécifique de la régénération céphalique (MARCEL, 1967 a). Nous avons étudié, pour cela, l'influence de broyats des 7 premiers segments ("région céphalique") sur des tronçons comprenant les métamères 8 à 13 ; d'autre part, sur des fragments plus postérieurs, au niveau des segments 18 à 23, nous avons testé des broyats de la "région oesophagienne", c'est-à-dire des segments 8 à 13 (voir Fig. 3).

1 - Tronçons 8-13 (= "antérieurs")

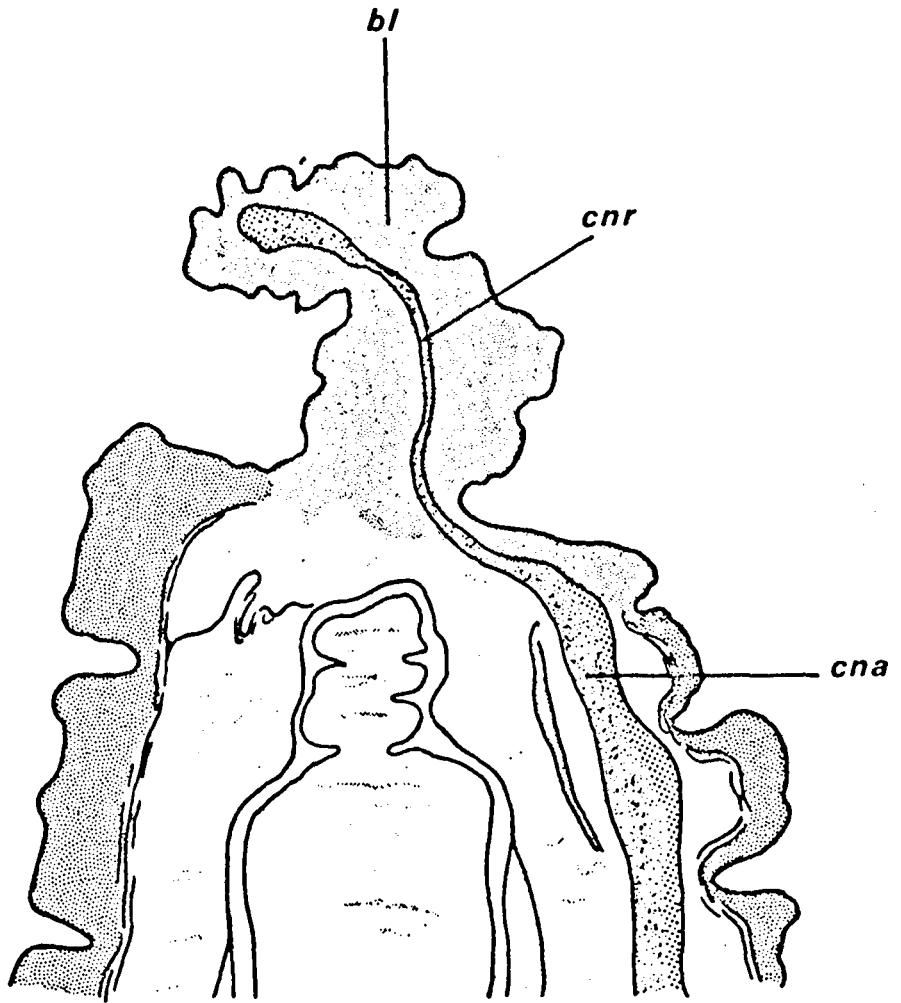
Les explants de cette série sont divisés en trois lots : l'un est mis en présence d'un broyat de "régions céphaliques", le second est placé sur milieu additionné d'un homogénat de segments du territoire caudal (26° au 31° métamère) ; le troisième, sur milieu normal, sert de témoin.

Le Tableau II indique les nombres de régénérats obtenus ainsi que les nombres et pourcentages de vers n'ayant pas régénéré. En présence de broyats de segments "céphaliques" (1° lot), 75 % des vers ne régénèrent pas (Pl. I, figs a et b), ou régénèrent très anormalement (2 cas). 30 % des tronçons soumis à l'influence de l'homogénat de métamères moyens (2° lot) et 29 % des témoins ne régénèrent pas (Pl. I, figs c et d).

Le contrôle histologique de tous les explants après trois semaines de culture confirme les observations morphologiques effectuées sur le vivant. Dans le 1er lot, on peut noter une activation et une multiplication des cellules du feuillet ectodermique (Fig. 4 et Pl. II, fig. b). La chaîne nerveuse régénère souvent sur une faible distance, mais il n'y a



Figure 5 - Même cas que la figure 4 (coupe sagittale). Le blastème cicatriciel (bl), plus développé, reste indifférencié.  
cnr : chaîne nerveuse régénérée, cna : chaîne nerveuse ancienne.



200μ

315  
FILE

Figure 6 - Régénérat anormal (coupe sagittale).

La face ventrale montre les 2 segments néoformés (1, 2).  
A la face dorsale, le tube digestif se relie à la paroi  
du tronçon.

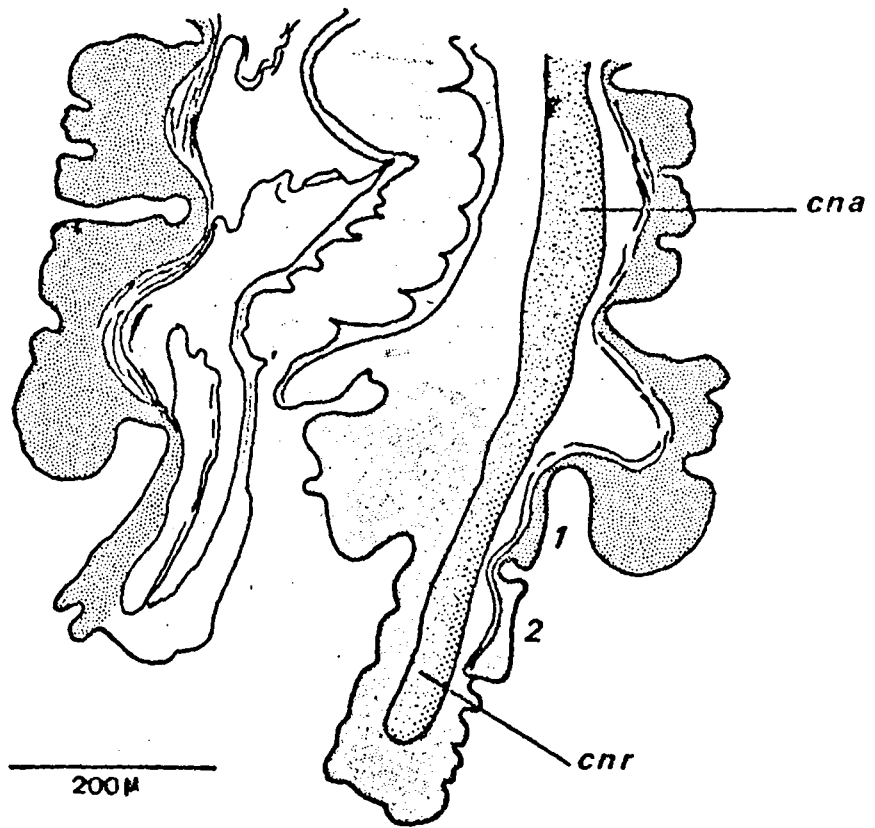




TABLEAU III  
INHIBITION DANS LES TRONCONS 18-23 ("POSTERIEURS")

Broyats	Nombre d'opérés survivants	Nombre de Régénérats	Nombre de vers n'ayant pas régénéré	% de vers n'ayant pas régénéré	Signification
Région "céphalique" (0-7)	20	2	18	90 %	+ (0,001)
Région "oesophagienne" (8-13)	20	1	19	95 %	+ (0,001)
Région "caudale"	20	12	8	40 %	-
Témoins	14	9	5	36 %	

N.B. Le signe + indique une différence significative par rapport aux témoins ; le degré de signification est représenté par le nombre entre parenthèses.



TABLEAU III  
INHIBITION DANS LES TRONÇONS 18-23 ("POSTERIEURS")

Broyats	Nombre d'opérés survivants	Nombre de Régénérats	Nombre de vers n'ayant pas régénéré	% de vers n'ayant pas régénéré	Signification
Région "céphalique" (0-7)	20	2	18	90 %	+ (0,001)
Région "oesophagienne" (8-13)	20	1	19	95 %	+ (0,001)
Région "caudale"	20	12	8	40 %	-
Témoins	14	9	5	36 %	

N.B. Le signe + indique une différence significative par rapport aux témoins ; le degré de signification est représenté par le nombre entre parenthèses.

pas d'organisation de tissu cicatriciel (Fig. 5). Dans ce lot nous avons rencontré deux régénérats très anormaux, caractérisés par une absence complète de néoformation dorsale. Seule, la face ventrale régénère plus ou moins, pouvant même former (Fig. 6) deux segments en continuité avec les tissus anciens et organisés au-dessous d'une chaîne nerveuse néoformée. Dorsalement, on ne trouve aucune formation nerveuse pouvant correspondre à un cerveau. Par contre, un pharynx s'est différencié aux dépens de l'ectoderme régénéré, en position latérale chez l'un, et ventrale chez le second.

Chez les explants du 2ème lot, les différentes parties du régénérat céphalique montrent un aspect tout à fait normal (Pl. II, fig. a), en tout point comparable à celui des témoins (Pl. II, fig. c).

## 2 - Tronçons 18-23 (= "postérieurs")

Quatre séries opératoires ont été constituées (voir Fig. 3 à droite) dont l'une, sur milieu normal, sert de témoin. Les trois autres ont été soumises à l'action d'un broyat effectué respectivement à partir de "régions céphaliques" (jusqu'au 7° segment), de "régions oesophagiennes" (8° -13° segments) et des 7 à 10 derniers segments ("régions caudales").

Les résultats sont transcrits dans le Tableau III.

Les broyats de segments prélevés à un niveau "céphalique" ou "oesophagien" inhibent fortement la régénération de la tête ; respectivement 90 et 95 % des vers ne régénèrent pas. Par contre, des segments "caudaux" n'ont pratiquement pas d'effet inhibiteur : dans ce cas, comme chez les témoins, on ne relève que 36 à 40 % de non-régénérats.

Les explants dont la régénération a été inhibée montrent à ce moment sur coupe histologique, une simple prolifération ectodermique au niveau du blastème cicatriciel. Dans le cas du développement maximum de ces "bourgeons", on note la présence d'une chaîne nerveuse néoformée. Mais nous n'avons jamais observé de tissu nerveux en position dorsale correspondant à un cerveau régénéré. Les témoins et les tronçons ayant formé un régénérat possèdent toujours une tête normalement constituée.

## 3 - Conclusion

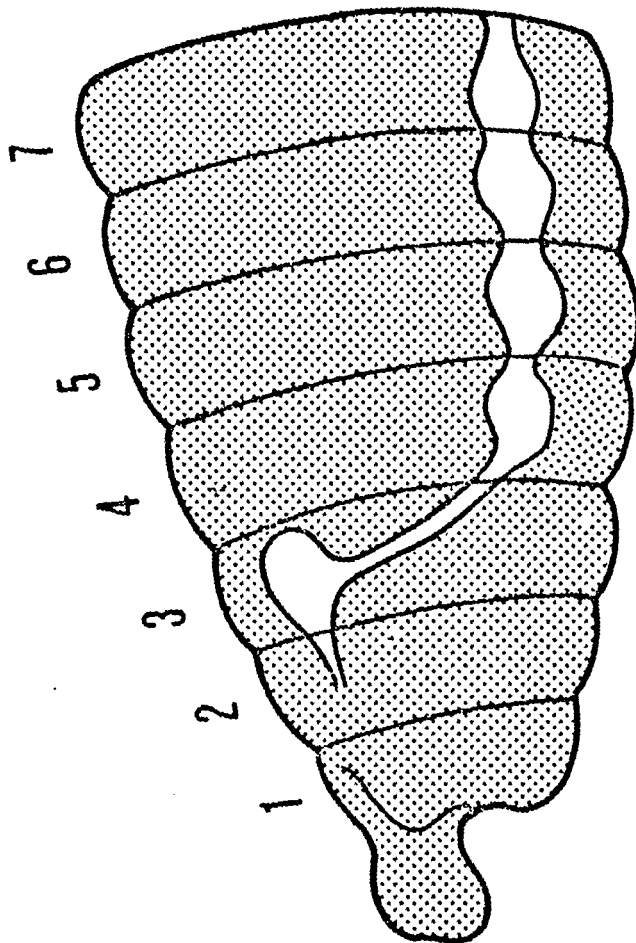
L'examen de ces résultats permet de dire que, dans les conditions de nos expériences, la régénération céphalique des tronçons prélevés à différents niveaux est inhibée par des broyats de segments situés plus

antérieurement ("céphaliques" ou "oesophagiens"). Les segments prélevés à un niveau postérieur (région "moyenne" constituée par les métamères 26 à 31 ou région "caudale") n'ont pratiquement aucune influence sur cette régénération.

D'autre part, le fait qu'un surnageant puisse empêcher une régénération montre que l'inhibition est due à une substance capable de diffuser dans un solvant aqueux.



Figure 7 - Rôle du système nerveux antérieur au cours de l'inhibition céphalique. Différents types de broyats : tissu nerveux (en blanc), région céphalique dénervée (en grisé).



305  
LILLE



TABLEAU IV

REGENERATION A PARTIR DE TRONCONS PRELEVES  
ENTRE LE 8° ET LE 13° SEGMENT

	Nombre de survivants	Nombre de Régénérats	Absence de Régénérats		Signification
			Nombre	%	
a. Cerveau + Ganglion sous-oesophagien + Chaîne nerveuse 5 � 7	16	3	13	81	+ (0,001)
b. Région céphalique dénervée	18	9	9	50	-
c. Chaîne nerveuse 30-36	16	12	4	25	-
d. Région 30-36 dénervée	19	14	5	26	-
e. Témoins	28	21	7	25	

N.B. Le signe + indique une différence significative par rapport aux témoins ; le degré de signification est représenté par le nombre entre parenthèses.

Chapitre 2

ROLE DU SYSTEME NERVEUX AU COURS DE  
L'INHIBITION DE LA REGENERATION CEPHALIQUE

(Etude "in vitro)

Nous avons montré dans le chapitre précédent qu'un homogénat de région céphalique inhibe la régénération d'une tête sur des tronçons prélevés au niveau des 8°-13° et 18°-23° métamères. Il nous faut tenter maintenant de localiser le tissu responsable de cette inhibition.

1 - Influence du système nerveux antérieur (MARCEL, 1967 b)

Des broyats sont préparés à partir (Fig. 7) :

a) de tissu nerveux prélevé dans la région céphalique (prostomium et 7 premiers segments) comprenant le ganglion cérébroïde, le ganglion sous-oesophagien et la chaîne nerveuse correspondante (en blanc sur la Fig. 7)

b) de régions céphaliques dénervées (en grisé sur la Fig. 7) : c'est-à-dire dont les ganglions cérébroïde et sous-oesophagien ainsi que les neuromères 5, 6 et 7 ont été excisés.

c) de chaînes nerveuses provenant des segments 30 à 36

d) de tronçons 30-36 privés de leur système nerveux.

Cinq lots d'explants sont constitués : quatre sont mis en présence de l'un des types de broyats ; le cinquième, sur milieu normal, sert de témoin.

Les résultats sont consignés dans le Tableau IV.

L'homogénat du tissu nerveux, prélevé dans la région céphalique, empêche la régénération de la tête dans 81 % des cas.

Le broyat de la région céphalique, privée de son système nerveux central, inhibe la régénération dans 50 % des cas seulement.

Les ganglions nerveux 30 à 36 ou les segments d'où ils sont issus n'ont pas d'effet particulièrement inhibiteur ; le pourcentage de "non-régénération" est pratiquement le même que chez les témoins (25 % environ).

Il semble donc que la substance inhibitrice de la régénération céphalique soit localisée dans le tissu nerveux. Mais le niveau relatif auquel est prélevé ce tissu, le long de l'axe céphalo-caudal est déterminant puisque le broyat de chaîne nerveuse, issue de segments postérieurs n'exerce aucune influence inhibitrice.

Figure 8 - Broyats de moitiés dorsales et ventrales prélevées dans la région céphalique.

a - avec système nerveux.

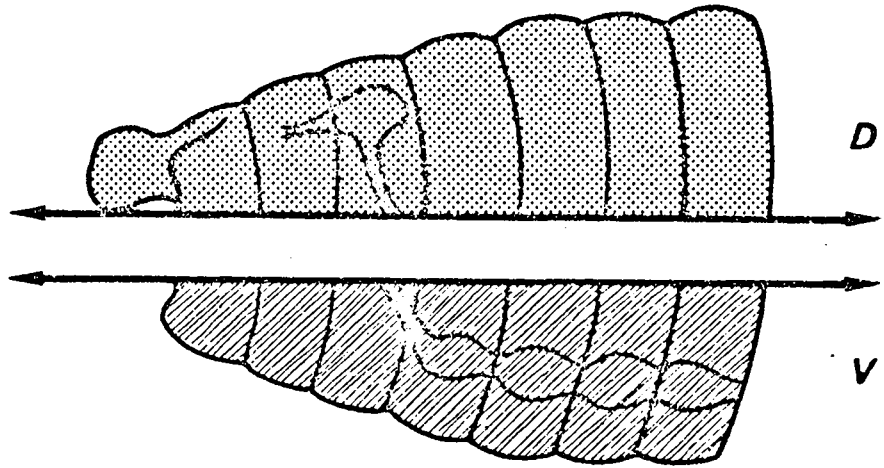
D : région dorsale conservant le ganglion cérébroïde.

V : région ventrale conservant le ganglion sous-oesophagien et les neuromères 5, 6, 7.

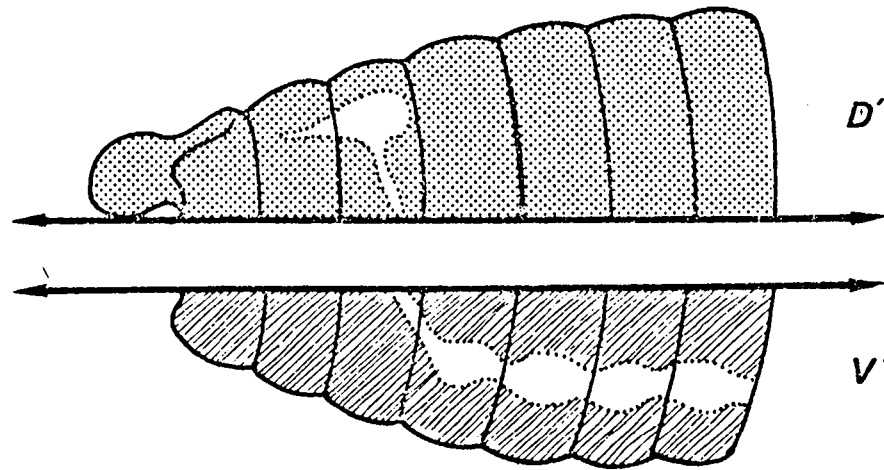
b - sans système nerveux (en blanc).

D' : région dorsale dénervée

V' : région ventrale dénervée.



a



b





TABLEAU 2

ACTION DU BROYAT DE MOITIÉS DORSALES ET VENTRALES DE TÊTES  
AVEC OU SANS LEUR SYSTÈME NERVEUX

Types de Broyats	Opérés survivants	Régénérats normaux	Régénération très anormale	Pas de Régénération
Dorsal	18	1 (6 %) + (0,00001)	2 (11 %) -	15 (83 %)
Ventral	16	1 (7 %) + (0,00001)	11 (68 %) + (0,0001)	4 (25 %)
Dorsal dénervé	16	10 (63 %) -	1 (6 %) -	5 (31 %)
Ventral dénervé	16	12 (75 %)	0 -	4 (25 %)
Témoins	19	15 (80 %)	0 -	4 (20 %)

N.B. Le signe + indique une différence significative par rapport aux témoins.  
Le nombre décimal entre parenthèses représente le degré de signification

D'autre part, malgré un taux assez élevé d'inhibition, dans le cas des broyats de région céphalique "dénervée", il est probable que la substance inhibitrice ne se situe pas dans les tissus autres que le neuroderme. En effet, le test de l'écart-réduit montre que la différence avec les témoins n'est pas significative pour le risque 5 %. De plus les Oligochètes possèdent un système nerveux superficiel particulièrement important, dont les péricaryons sont situés dans la paroi du corps (AVEL, 1959); ces neurones, qu'il est impossible de détruire chirurgicalement, doivent vraisemblablement posséder le même pouvoir inhibiteur que ceux du système nerveux central.

2 - Action du broyat de moitiés dorsales et ventrales prélevées dans la région céphalique

Dans cette série expérimentale (MARCEL, 1967 b) les régions céphaliques (prostomium et 7 premiers métamères) sont sectionnées au moyen d'un microscalpel suivant un plan frontal médian, tangent à la face inférieure du prostomium (Fig. 8a), découpant ainsi 2 moitiés : dorsale et ventrale (D et V) destinées à être broyées. Le système nerveux est donc partagé de la façon suivante : avec la partie dorsale, le cerveau et la moitié du connectif périoesophagien ; avec la face ventrale, le reste du connectif, le ganglion sous-oesophagien et les trois premiers ganglions de la chaîne nerveuse correspondant aux 5°, 6° et 7° métamères.

D'autre part, des régions antérieures, privées de leur système nerveux central, sont partagées en deux comme précédemment (D' et V', fig. 8 b) pour, après broyage et centrifugation, être incorporées au milieu de culture.

Corrélativement, des tronçons témoins sont placés sur milieu normal.

Tous les explants sont, ici encore, constitués par les métamères 8 à 13.

Les résultats de cette série figurent dans le Tableau V.

Dans les deux lots de vers soumis à l'action de broyats de moitiés dorsales et ventrales possédant leur système nerveux, on note qu'il y a très peu de régénérats normaux (6 % dans le lot "dorsal" et 7 % dans le lot "ventral") ; 80 % des témoins régénèrent. La différence est très hautement significative. L'étude histologique de ces témoins permet d'observer les différents constituants du bourgeon (Pl. II, fig. c). Un cer-



veau s'est formé dorsalement, en relation avec la chaîne ventrale par un collier périoesophagien. Au-dessous du cerveau, s'est différencié un pharynx en communication avec l'oesophage ancien. Par contre, le broyat "dorsal" empêche toute régénération dans 83 % des cas (Pl. II, fig. d), tandis que l'homogénat d'origine "ventrale" n'inhibe complètement la régénération que chez 25 % des explants. Dans ce dernier cas, on remarque la présence de 68 % de régénérats ébauchés ventralement ou très anormaux. Au microscope, ceux-ci montrent le plus souvent, dans le prolongement de la chaîne nerveuse ancienne, une néoformation nerveuse autour de laquelle se développe un bourgeon de régénération contenant les principaux tissus qui paraissent se différencier, sans s'organiser. C'est ainsi que l'épiderme est très souvent "cryptique" (Pl. III, figs a et b) ; les fibres musculaires ne montrent pas les directions, longitudinale et circulaire, habituelles. Des soies complètes peuvent apparaître, perforant les cryptes épidermiques (Pl. III, fig. c). Nous n'avons pas observé dans ces "régénérats" de stomodeum.

Les broyats provenant des moitiés ventrales, privées de leur système nerveux, ne montrent pas d'action inhibitrice notable. Une faible inhibition peut toutefois être décelée chez les explants mis en présence de moitiés dorsales "dénervées" ; dans ce cas on note 63 % de régénérats au lieu de 75 % pour les fragments soumis à l'action du broyat ventral. Cependant l'écart n'est pas significatif pour le risque 5 %. Donc dans l'ensemble, l'effet de ces deux derniers types d'homogénats est comparable à celui des témoins qui présentent 78 % de régénérats. On remarque aussi l'absence à peu près complète de régénérats anormaux dans ces dernières séries.

L'examen des résultats obtenus dans ces cultures confirme ceux enregistrés précédemment : le système nerveux est responsable de l'inhibition ; en particulier le ganglion sus-oesophagien empêche la régénération dans 83 % des cas, chiffre très voisin de celui obtenu dans les séries faisant intervenir un homogénat de tissu nerveux seul. Par contre l'ablation du système nerveux retire tout effet inhibiteur aux moitiés dorsales ou ventrales.

Mais une deuxième remarque peut être faite. Il apparaît, dans la série mettant en jeu le broyat "ventral" non dénervé, un nombre important de régénérats très anormaux (68 %). Cette valeur est trop élevée pour ne par être liée au type même du broyat utilisé, et nous envisagerons plus loin une explication à ce phénomène.



TABLEAU VI

EFFETS DES BROYATS DE DIFFERENTES PARTIES  
DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Broyats	Opérés survivants	Régénérats normaux	Début régénération ventrale ou régénération très anormale	Pas de Régénération
Cerveau	16	4 (25 %) + (0,01)	0 - -	12 (75 %)
G. S. O.	15	12 (80 %) -	1 (7 %) -	2 (13 %)
G. 5,6,7	18	3 (17 %) + (0,001)	9 (50 %) + (0,001)	6 (33 %)
G. 30 à 36	19	14 (74 %) -	4 (21 %) + (0,04)	1 (5 %)
Témoins	18	14 (78 %)	0 -	4 (22 %)

N.B. Le signe + indique une différence significative par rapport aux témoins.  
Le nombre décimal entre parenthèses représente le degré de signification.

### 3 - Effet des broyats des différentes parties du système nerveux central

Dans cette seconde série (MARCEL, 1967 b), cerveau, ganglion sous-oesophagien et les trois premiers ganglions de la chaîne nerveuse sont isolés et homogénéisés séparément. Corrélativement, des tronçons de chaîne nerveuse sont prélevés du 30° au 36° segment pour être éprouvés sur des témoins. Au cours de la même mise en culture des tronçons du même niveau (8° au 13° métamère) sont placés sur milieu normal.

Les résultats de cette série d'explants figurent dans le Tableau VI.

Le cerveau, isolé, a une action inhibitrice importante (75 % de non-régénération) comparable à celle du broyat "dorsal" (voir Tableau V et Pl. III, fig. d). Il n'y a pas eu, dans ce lot, de régénérat abortif. Le broyat de ganglions sous-oesophagiens n'entrave nullement la régénération : 80 % des explants présentent un régénérat normal (Pl. III, fig. e), en tout point comparable à celui formé par les témoins dont 78 % régénèrent. Les ganglions ventraux 5 à 7 empêchent fortement une morphogenèse régénératrice normale (17 % seulement régénèrent, écart hautement significatif). Toutefois, dans la moitié des cas, on note la présence de bourgeons anormaux et incomplets (Pl. IV, fig. a), comparables à ceux obtenus dans la série expérimentale précédente (paragraphe 2). Histologiquement, le régénérat (bg) montre de nombreuses cryptes (flèche sur la fig. a de la Pl. IV). Seul l'ectoderme paraît différencié en épiderme et tissu nerveux (indiqué en sur cette figure). Les cellules mésodermiques demeurent en majeure partie indifférenciées ; quelques fibres musculaires seulement sont formées.

Enfin, si l'on soumet des explants à l'action de broyats de chaîne nerveuse prélevée postérieurement (30° au 36° métamère), on observe une régénération normale chez 74 % des sujets et un début de régénération dans 21 % des cas (écart significatif pour le risque 4 %). L'observation microscopique montre que, comme dans les lots précédents, une néoformation nerveuse émane de la chaîne nerveuse ancienne, se prolonge dans le "bourgeon" où elle se termine parfois en une masse de tissu nerveux, de diamètre plus important, et dont l'aspect est nettement cérébroïde (Pl. IV, fig. b). L'explant présenté sur cette figure montre de plus que l'épiderme



TABLEAU VII

ACTION DE BROYATS DE TRONCONS DE CHAINE

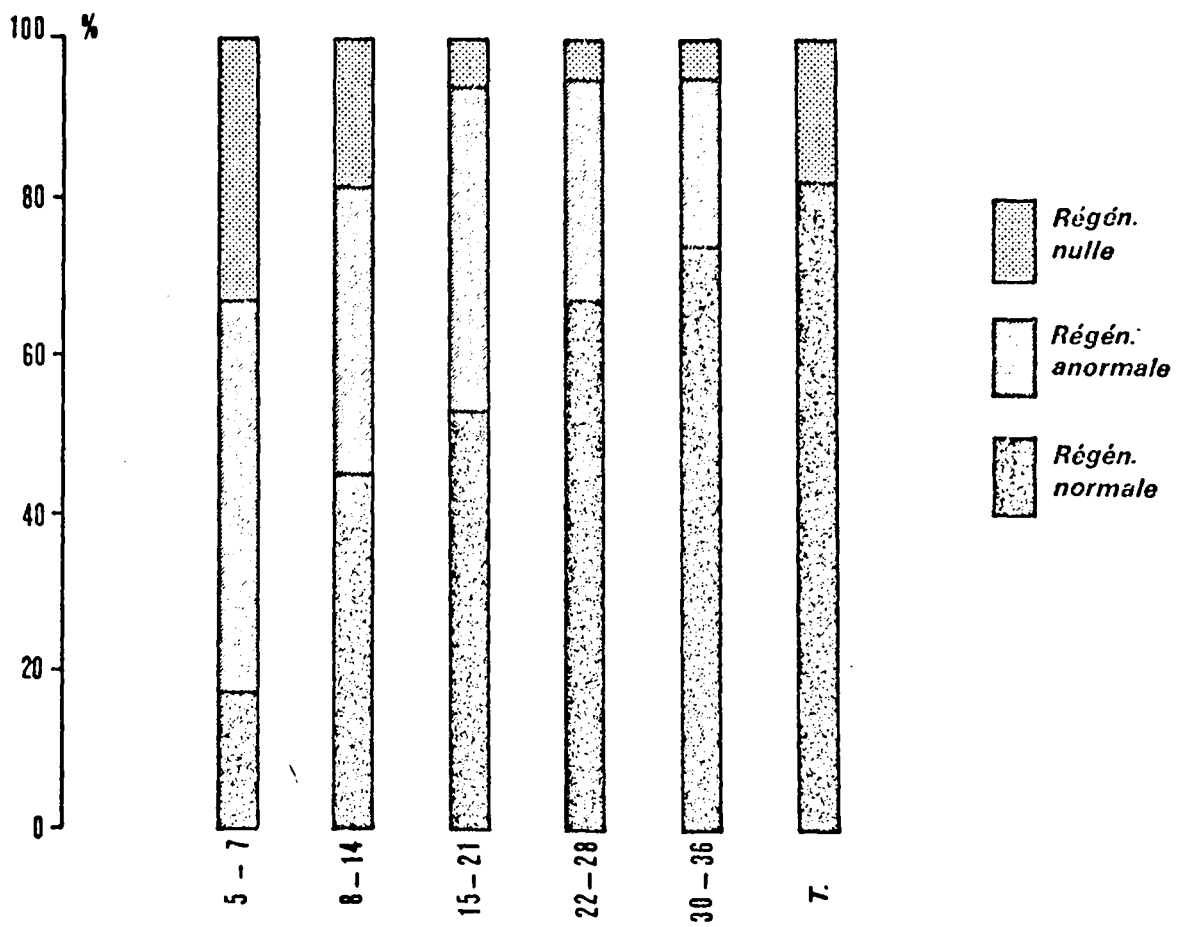
NERVEUSE PRELEVES A DIFFERENTS NIVEAUX

Broyats	Opérés survivants	Régénérats normaux	Début régénération ventrale ou régénération très anormale	Pas de Régénération
G. 5 à 7	18	3 (17 %) + (0,0001)	9 (50 %) + (0,001)	6 (33 %)
G. 8 à 14	22	10 (45 %) + (0,02)	8 (37 %) + (0,01)	4 (18 %)
G. 15 à 21	17	9 (53 %) - (0,07)	7 (41 %) + (0,01)	1 (6 %)
G. 22 à 28	21	14 (67 %) -	6 (28 %) + (0,02)	1 (5 %)
G. 30 à 36	19	14 (74 %) -	4 (21 %) + (0,05)	1 (5 %)
Témoins	17	14 (83 %)	0 -	3 (18 %)

N.B. Le signe + indique une différence significative par rapport aux témoins.

Le nombre décimal entre parenthèses représente le degré de signification.

Figure 9 - Diagramme illustrant les résultats de l'action des broyats  
de ganglions nerveux ventraux à différents niveaux  
(repérés en abscisses).



sous-jacent est différencié en un épithélium pharyngien, dont la face ciliée (flèche) est tournée vers l'extérieur, tandis que des fibres musculaires assez nombreuses apparaissent dans le mésoderme.

Cette série expérimentale nous a donc montré que le cerveau a un fort pouvoir inhibiteur. D'autre part, la chaîne nerveuse paraît empêcher elle aussi la régénération mais avec un effet moindre, surtout si elle est prélevée à un niveau assez postérieur le long de l'axe céphalocaudal.

#### 4 - Action des broyats de ganglions nerveux ventraux prélevés à différents niveaux de l'axe antéro-postérieur

Devant les résultats obtenus au paragraphe précédent, il était intéressant de rechercher la présence du facteur inhibiteur, le long de l'axe nerveux (MARCEL, 1967 b). Pour cela nous avons constitué 5 lots d'explants mis respectivement en présence de ganglions nerveux de la chaîne ventrale : du 5° au 7° segment, 8° au 14°, 15° au 21°, 22° au 28°, 30° au 36°. De plus, des tronçons témoins sont explantés comme à l'ordinaire.

Le Tableau VII groupe les résultats obtenus dans cette série de cultures, et reportés d'autre part sur le diagramme (Fig. 9) dans lequel chaque barre correspond à un niveau de prélèvement des ganglions nerveux homogénéisés. En ordonnées, figurent les pourcentages obtenus. Les rectangles grisés sont relatifs à la régénération normale, ceux hachurés à la régénération très anormale, et ceux en pointillé à l'absence totale de régénération.

On remarque que le pourcentage des régénérats normaux augmente régulièrement lorsque les ganglions homogénéisés sont prélevés à un niveau plus caudal : de 17 %, correspondant à une inhibition maximale, à 74 %, taux à peine inférieur à celui des témoins (82 %). L'écart ne demeure significatif que jusqu'au niveau 15-21. Inversement, les explants n'ayant pas régénéré sont de moins en moins nombreux (de 33 % à 5 %), au fur et à mesure que les broyats sont d'origine plus postérieure. Simultanément, le taux de régénérats anormaux diminue à peu près régulièrement ; il varie entre 50 %, lorsque le broyat est d'origine tout à fait antérieure, et 21 % lorsque les ganglions homogénéisés sont prélevés au niveau des 30°-36° segments ; il ne s'annule que chez les témoins. Par rapport à ces derniers, l'écart est constamment significatif.

TABLEAU VIII

## EFFETS DE LA DILUTION DE BROYATS DE GANGLIONS 5-7



Concentration des Broyats	opérés survivants	Régénérats normaux	Début régénération ventrale ou régénération très anormale	Pas de Régénération
1	18	3 (17 %) + (0,001)	9 (50 %) + (0,001)	6 (33 %)
1/2	17	4 (24 %) + (0,0001)	5 (29 %) + (0,02)	8 (47 %)
1/3	23	8 (35 %) + (0,01)	9 (39 %) + (0,01)	6 (26 %)
0 (moins)	18	14 (78 %)	0 -	4 (22 %)

N.B. Le signe + indique une différence significative par rapport aux témoins.

Le nombre décimal entre parenthèses représente le degré de signification.



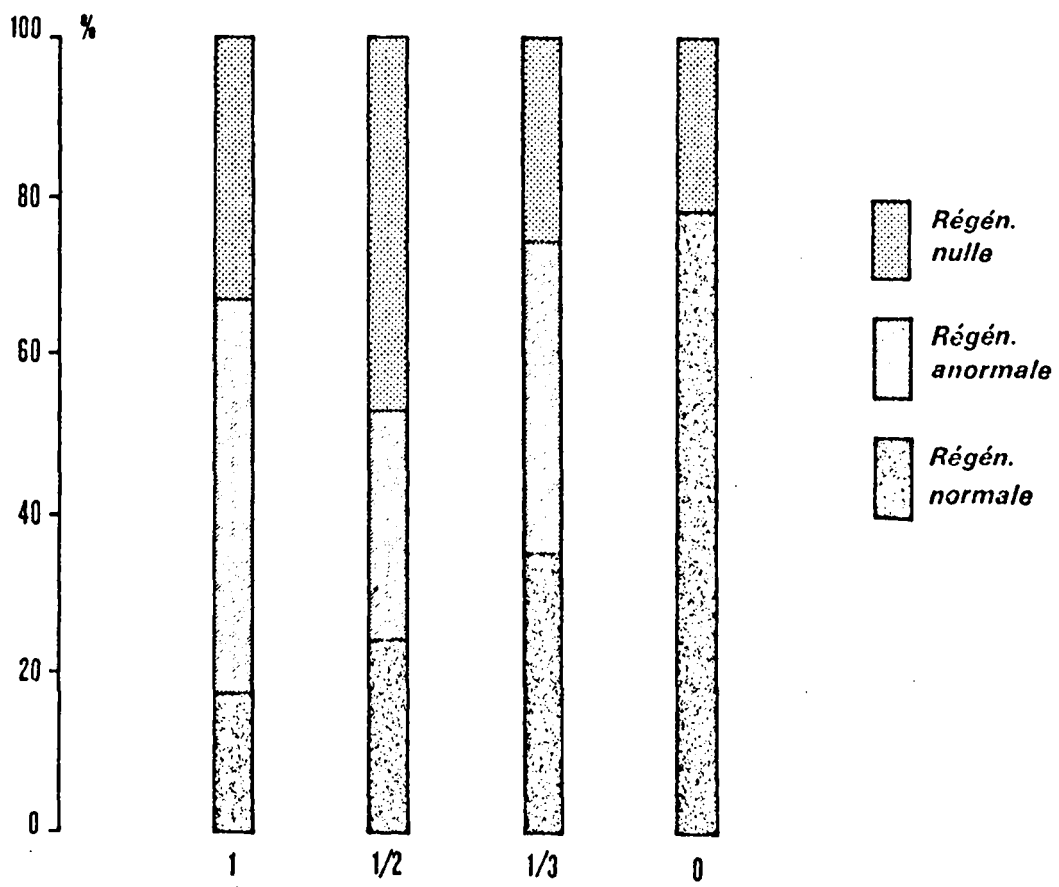
Figure 10 - Diagramme illustrant les résultats de l'action de broyats  
des ganglions 5 à 7 après dilution.

1 : concentration habituelle

1/2 : dilution de moitié

1/3 : dilution au tiers

0 : témoins (pas de broyat).



L'étude histologique des explants présentant des régénérats aberrants montre que, ici aussi, la chaîne nerveuse s'accroît (Pl. IV, fig. c) et que certains groupes cellulaires se différencient. Mais le bourgeon n'est généralement pas organisé. Le plus souvent, le tube digestif ancien ne participe pas à l'édification de ces "régénérats" et il est oblitéré par un tissu cicatriciel (reste du bouchon cicatriciel) ; parfois, il s'ouvre normalement aux fronts de section ou bien une hernie plus ou moins importante le fait saillir au niveau de l'un deux.

Au total, il semble donc bien que la chaîne nerveuse possède un pouvoir inhibiteur, en avant du front de section expérimenté, mais aussi bien en arrière de la zone considérée. D'autre part, le taux de régénérats anormaux diminue, tandis que la fréquence de régénération normale augmente, depuis la région antérieure jusqu'à la région moyenne.

La substance inhibitrice est donc distribuée, dans le système nerveux, suivant un gradient céphalo-caudal.

#### 5 - Effets de la dilution de broyats des ganglions 5 à 7

L'action de la dilution du broyat des ganglions 5 à 7 est éprouvée dans une autre série de cultures (MARCEL, 1967 b). Le surnageant de l'homogénat est dilué de moitié ou au tiers dans du liquide de Holtfreter. La concentration habituelle sert de terme de comparaison. Comme à l'ordinaire, des témoins sont placés sur milieu normal.

Les résultats des cultures de cette série figurent dans le Tableau VIII et sur un diagramme (Fig. 10) dans lequel les dilutions de moitié (1/2) et au tiers (1/3), comparées à la concentration normale (1) et aux témoins (0), sont repérées en abscisses ; les pourcentages sont portés en ordonnées.

Il va de soi que l'action inhibitrice du broyat s'affaiblit avec la dilution : 17 % de régénérats pour la concentration habituelle (1) contre 35 % lorsque l'extrait est dilué au tiers (sur le graphique, portion des colonnes en grisé) ; néanmoins l'écart est constamment significatif. Le taux de non-régénération totale, hachuré sur le graphique, est maximum à la concentration 1/2 (47 %). Lorsque le broyat est dilué au tiers, ce taux est minimum (26 %) et du même ordre de grandeur que celui des témoins non soumis à un homogénat (22 %). Lorsque la concentration est normale (1), la moitié des vers expérimentés montrent un début de régénération. En présence de broyat dilué de moitié ce taux est réduit à 29 %,

tandis qu'il est de 39 % lorsque la concentration est trois fois plus faible que la normale. Ici encore, l'écart par rapport aux témoins est significatif.

L'étude histologique des explants anormaux montre que la chaîne nerveuse régénère en partie. Au niveau de son extrémité distale, se forme un bourrelet plus ou moins développé. Il peut n'être qu'un simple blastème (Pl. IV, fig. d) dont l'ectoderme néoformé recouvre un amas de grosses cellules mésodermiques indifférenciées. Il peut aussi donner un bourgeon beaucoup plus développé dans lequel se prolonge la chaîne nerveuse.

#### Discussion et conclusion

Les différentes séries expérimentales envisagées dans ce chapitre font apparaître l'existence de régénérats anormaux lorsque des broyats de chaîne nerveuse sont ajoutés au milieu de culture. La fréquence de ces régénérats varie, suivant le niveau de prélèvement des ganglions ventraux, de 21 % (30° au 36° segment) à 50 % (5° au 7° métamère). La présence constante de ces régénérats anormaux, à des taux relativement élevés, mais dont les écarts par rapport aux témoins sont toujours hautement significatifs, permet de penser qu'il ne s'agit pas d'un phénomène aléatoire. Ces régénérats n'apparaissent jamais lorsque les explants sont soumis à l'action du broyat de cerveau ni chez les témoins. Ils sont rares en présence d'homogénat de ganglion sous-oesophagien et de tégument "dénervé" (respectivement 7 et 6 %) ; dans ces cas d'ailleurs les écarts ne sont pas significatifs. Cette morphogenèse abortive est donc bien liée à l'influence de la chaîne ventrale, par l'intermédiaire d'une substance diffusible dans le surnageant.

L'examen des structures régénérées semble mettre en évidence un effet trophique dont l'action morphogène serait annulée par la présence d'une inhibition céphalique originaire du tissu nerveux.

Compte tenu de ces régénérats anormaux, il convient maintenant de discuter successivement de l'existence et de la répartition des substances trophique et céphalo-inhibitrice.

A l'exception du ganglion sous-oesophagien, tout le système nerveux central possède une substance inhibitrice de la régénération céphalique, que l'on peut extraire par homogénéisation. Ce pouvoir inhibiteur existe surtout en avant du front de section ; il est maximum au

niveau du cerveau : 75 % dans le cas des ganglions cérébroïdes isolés et 83 % si le broyat intéresse la moitié dorsale des 7 premiers métamères. Mais la chaîne nerveuse possède aussi un effet inhibiteur très au delà du niveau de régénération (7/8). En présence de broyats de ganglions 30-36 et surtout 22-28, les régénérats normaux ont une fréquence inférieure à celle des témoins (respectivement 74 % et 67 % contre 82 % chez les témoins). Si l'on considère l'action des broyats de ganglions ventraux prélevés à différents niveaux, depuis la région céphalique jusque vers les 30-36° métamères, on note que la régénération normale est de plus en plus fréquente, tandis que le nombre des régénérats abortifs diminue. Il semble donc bien que la substance inhibitrice soit distribuée suivant un gradient antéro-postérieur.

CHAPRON (1969 a, 1970 c) a étudié l'influence de ce facteur inhibiteur sur la régénération de la tête d'E. foetida unicolor en greffant une région céphalique à peu de distance de l'intersegment 8/9, niveau auquel sera faite, après prise du greffon, la section. Cet auteur trouve dans ce cas que, dans l'ensemble, l'inhibition est incomplète et se borne à ralentir la régénération sans l'empêcher complètement. La différence avec nos résultats pourrait, selon nous, être expliquée de la façon suivante. La substance inhibitrice provenant de la région céphalique greffée se répand dans le liquide coelomique où elle se dilue. Ce liquide, d'autre part, susceptible d'être rejeté par l'animal par l'intermédiaire des pores dorsaux, doit se renouveler assez rapidement, ce qui expliquerait l'insuffisance d'action inhibitrice. De plus, lorsque les greffes sont pratiquées sur la face ventrale de l'animal, et que la chaîne nerveuse du greffon s'unit à celle du porte-grefe, CHAPRON observe que la régénération est beaucoup plus ralentie que dans le cas contraire. En particulier le cerveau est minuscule : il mesure 120  $\mu$  x 60  $\mu$  au lieu de 300  $\mu$  x 200  $\mu$ , en régénération normale. On peut alors penser que le facteur inhibiteur se trouve davantage au contact du front de régénération que lorsqu'une solution de continuité existe entre les deux cordons nerveux.

Le ganglion sous-oesophagien n'exerce aucune inhibition sur la régénération. Il semble au contraire avoir une action trophique : le nombre de vers présentant un bourgeon plus ou moins développé (87 %) est sensiblement supérieur à celui que l'on trouve chez les témoins (78 %).

En dehors du système nerveux, il semble que la substance inhibitrice soit également présente dans les tissus de la région céphalique. En

effet, les broyats de moitiés dorsales "dénervées" empêchent la régénération dans 33 % des cas. Si l'on considère les moitiés dorsales ou ventrales non dénervées, on remarque que la partie dorsale est plus inhibitrice que la ventrale, celle-ci ayant surtout un rôle trophique : le broyat ventral entraîne, en effet, dans 68 % des cas des débuts de régénération ou la formation de régénérats très anormaux.

SMITH (1963) dans une expérience du même type réalisée chez le Polychète Clymenella torquata, mais portant sur la régénération caudale, avait trouvé que les moitiés dorsales empêchaient le développement de la face dorsale, tandis que les broyats d'origine ventrale entravaient la régénération de la face ventrale. Nos expériences effectuées sur la régénération céphalique ne nous ont pas montré de différence d'action dorso-ventrale, confirmant ce qu'il avait lui-même remarqué (communication personnelle de l'auteur) au cours de la régénération antérieure. Il y aurait donc une différence dans les modalités entre l'inhibition antérieure et l'inhibition postérieure. Dans l'ensemble donc, nos résultats confirment ceux de cet auteur.

L'influence de l'action trophique se manifeste déjà au niveau des neuromères 5 à 7 qui ont la même action que la moitié ventrale. Se superposant à l'effet inhibiteur, on retrouve le rôle trophique de la chaîne nerveuse. AVEL (1932 a) et OKADA et KAWAKAMI (1943) chez le même Oligochète E. foetida ont en effet montré par des déviations de chaîne nerveuse que celle-ci induit à son front de section antérieur un régénérat de type céphalique dans le territoire correspondant. Des ganglions nerveux (22° au 28°) provenant de la région moyenne du corps, donc prélevés au début du territoire caudal, possèdent aussi une substance trophique capable d'influencer une régénération céphalique. Ceci correspond aux résultats d'AVEL (1932 b, 1947) qui obtient des régénérations de têtes en présence d'une chaîne nerveuse prélevée dans la région moyenne du corps.

On peut essayer de chiffrer, à partir des nombres de régénérats normaux et anormaux, dans les différentes séries expérimentales, l'influence du facteur trophique présent dans la chaîne nerveuse. Si l'on effectue pour chaque niveau envisagé, le rapport :

$$t = \frac{\text{nombre de régénérats normaux} + \text{nombre de régénérats anormaux}}{\text{nombre de régénérats témoins}}$$

que l'on peut appeler "coefficient trophique" pour le tronçon 8-13, on trouve les nombres suivants :

	G S 0	G 5-7	G 8-14	G 15-21	G 22-28	G 30-36	$\bar{x}$
t	1,1	0,8	1,0	1,1	1,1	1,1	1,03

Ces nombres sont très voisins les uns des autres et s'écartent très peu de la moyenne 1,03. Il s'ensuit donc que l'on peut estimer uniforme, au moins jusqu'au niveau 30-36, c'est-à-dire nettement en territoire caudal, l'influence du facteur trophique sur la régénération céphalique à l'intersegment 7/8.

Cet ensemble de faits semble donc indiquer que la substance trophique responsable est distribuée également tout au long de la chaîne nerveuse. Les substances trophique et inhibitrice étant localisées essentiellement dans le tissu nerveux, il convient d'envisager leurs rôles respectifs d'un point de vue quantitatif. Les expériences de dilution apportent à ce sujet quelques renseignements. En diluant de moitié le broyat des ganglions 5 à 7, l'inhibition diminue en valeur absolue. Mais comme on note près de 50 % de cas d'absence de régénération et 30 de régénérats anormaux, on peut en déduire que l'inhibition est relativement plus forte que l'action trophique. Dilué au tiers, le broyat possède une action inhibitrice faible, puisque le taux des non-régénérats est très peu supérieur à celui observé chez les témoins (26 % contre 22 %). Mais la présence de près de 40 % de régénérats anormaux et 35 % de régénérats normaux indique que, dans ce cas, le rôle trophique domine largement l'effet inhibiteur. Ces résultats posent donc la question d'un seuil d'action pour la substance inhibitrice et la substance trophique. Il semble que ce seuil se situe entre la concentration 1/2 et la concentration 1/3 : en passant de l'une à l'autre, en effet, on modifie la dominance de l'une ou l'autre des substances.

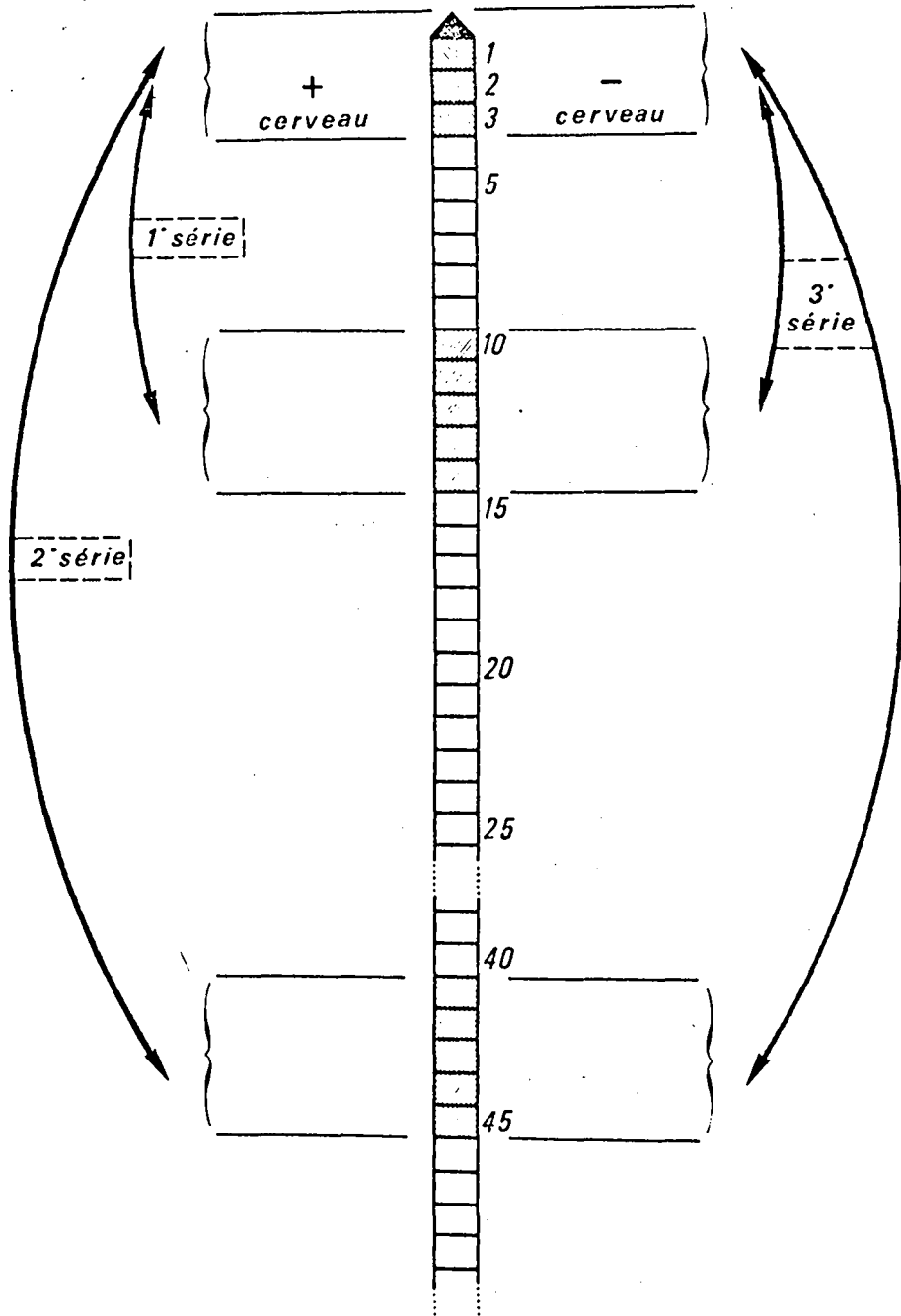
Dans cet aspect quantitatif, il convient cependant de faire preuve de prudence et de prendre en considération la longueur de l'explant éprouvé. En effet, dans nos expériences, l'enrichissement du milieu de culture en extrait de chaîne nerveuse, quel qu'en soit le niveau, ne nous a jamais permis d'obtenir des régénérats hypermériques. Or, AVEL, en réduisant la circonférence du corps, provoque des hyper-régénérations céphaliques par suite d'une hyper-innervation du blastème. Il est donc possible que nos explants soient trop courts pour présenter un tel comportement car les témoins régénèrent le plus souvent un nombre de segments inférieur à celui du tronçon réséqué.

De ce chapitre, il convient donc de retenir l'existence simultanée, à tous les niveaux, depuis la région antérieure, jusqu'à la région moyenne (dans le territoire caudal), de deux substances que l'on peut extraire du tissu nerveux central par homogénéisation. L'une a un effet trophique et serait distribuée également le long de la chaîne nerveuse. L'autre est inhibitrice et répartie suivant un gradient céphalo-caudal.

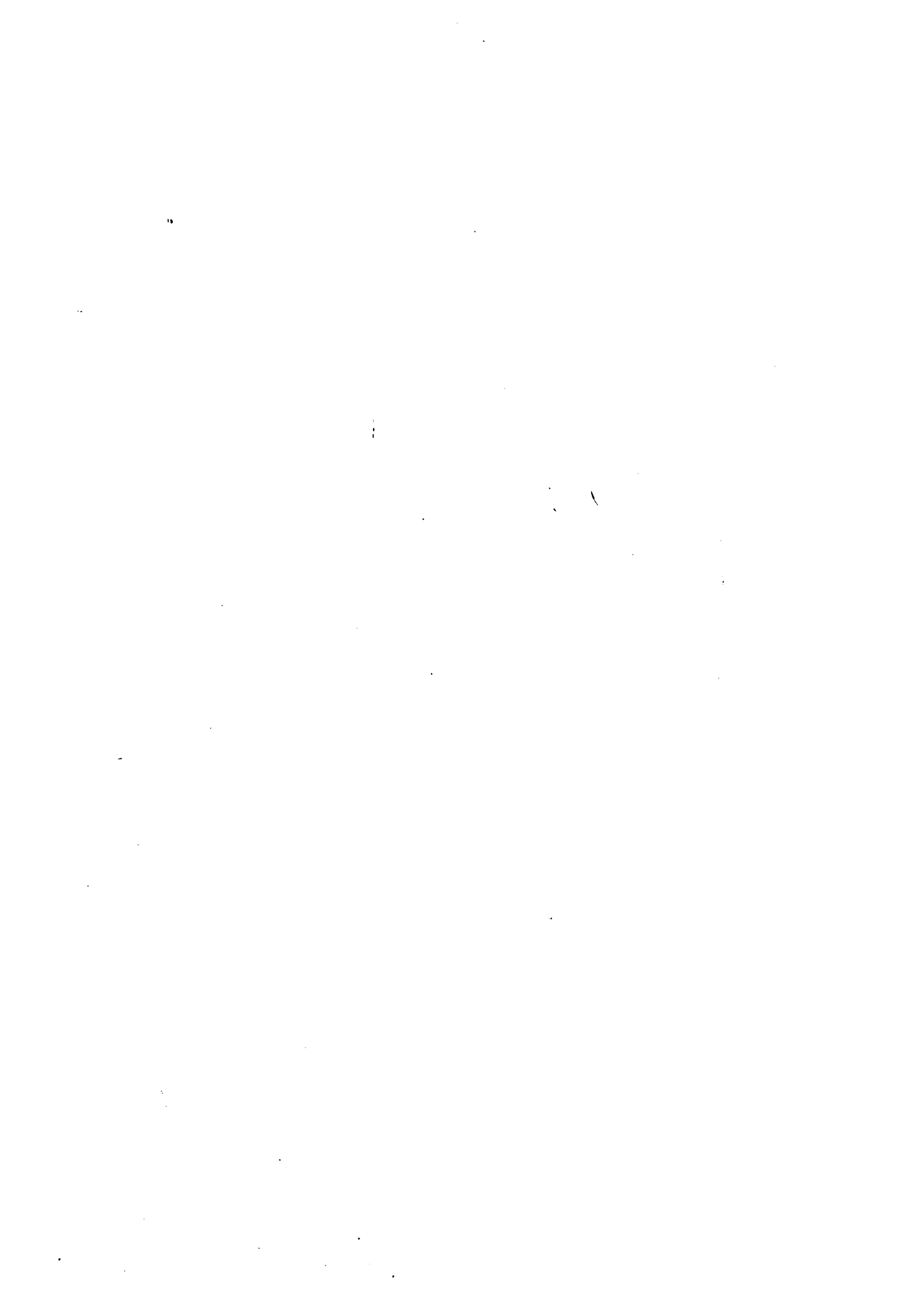


Figure 11 - Schéma des associations réalisées pour étudier le rôle inducteur du système nerveux.

Les parties hachurées correspondent aux explants associés, les flèches aux différentes séries expérimentales. A gauche de la figure les associations sont faites avec une région céphalique conservant le cerveau ; à droite, cette région est privée de cerveau.



SUS  
SILLE



Chapitre 3

ROLE INDUCTEUR DU SYSTEME NERVEUX

Le système nerveux favorisant la régénération, il convient d'essayer de discerner dans ce rôle la part qui revient aux phénomènes d'inductions et à ceux purement trophiques.

AVEL (1941, 1950) a mis en évidence les processus inducteurs qui interviennent au cours de la régénération céphalique. Pour cet auteur, le pharynx serait formé par une différenciation du régénérat oesophagien, induite par le blastème ecto-mésodermique. Nous avons repris l'étude de ce problème par la méthode des cultures organotypiques (MARCEL, 1966). Pour cela, trois séries opératoires ont été entreprises (Fig. 11).

Dans la première, des régions cérébrales (prostomium et les 3 premiers segments) ont été associées au front de section antérieur de tronçons de 5 segments, prélevés dans la région oesophagienne (10° au 14° métamère). Dans ce cas, le tractus digestif ne comporte aucun élément pharyngien. Après trois semaines de culture, l'examen histologique des explants révèle l'existence d'un pharynx caractéristique, placé sous le cerveau et différencié aux dépens de l'épithélium stomodéal ; on remarque en particulier la présence de cellules ciliées et de fibres musculaires en cours de différenciation (Pl. V, fig. a).

Dans une deuxième série, la région céphalique (prostomium + trois segments) est associée à 5 segments prélevés dans la région moyenne du corps, correspondant au territoire caudal. Dans un délai de trois semaines, le pharynx s'est différencié à partir de l'épithélium dorsal du stomodeum (Pl. V, fig. c), malgré l'absence de suture entre l'intestin et la région intestinale ectodermique.

Dans une troisième, des régions céphaliques, préalablement privées de cerveau, sont associées, soit à des segments prélevés dans la région oesophagienne, soit à des métamères de la région moyenne du corps. Dans ce cas, on assiste à la différenciation d'un pharynx qui s'effectue parallèlement à la régénération du cerveau (Pl. V, fig. d). L'absence de néoformation cérébrale accidentelle observée sur un explant a été corrélative du non développement d'un pharynx.

11

11/11/11

11/11/11

11/11/11

11/11/11

11/11/11

11/11/11

11

11/11/11

11/11/11

11

11/11/11

11/11/11

11/11/11

11/11/11

11

11/11/11

11

11/11/11

11

11/11/11

11/11/11

11

11/11/11

11

11/11/11

11/11/11

11/11/11

11/11/11

11/11/11

11/11/11

11/11/11

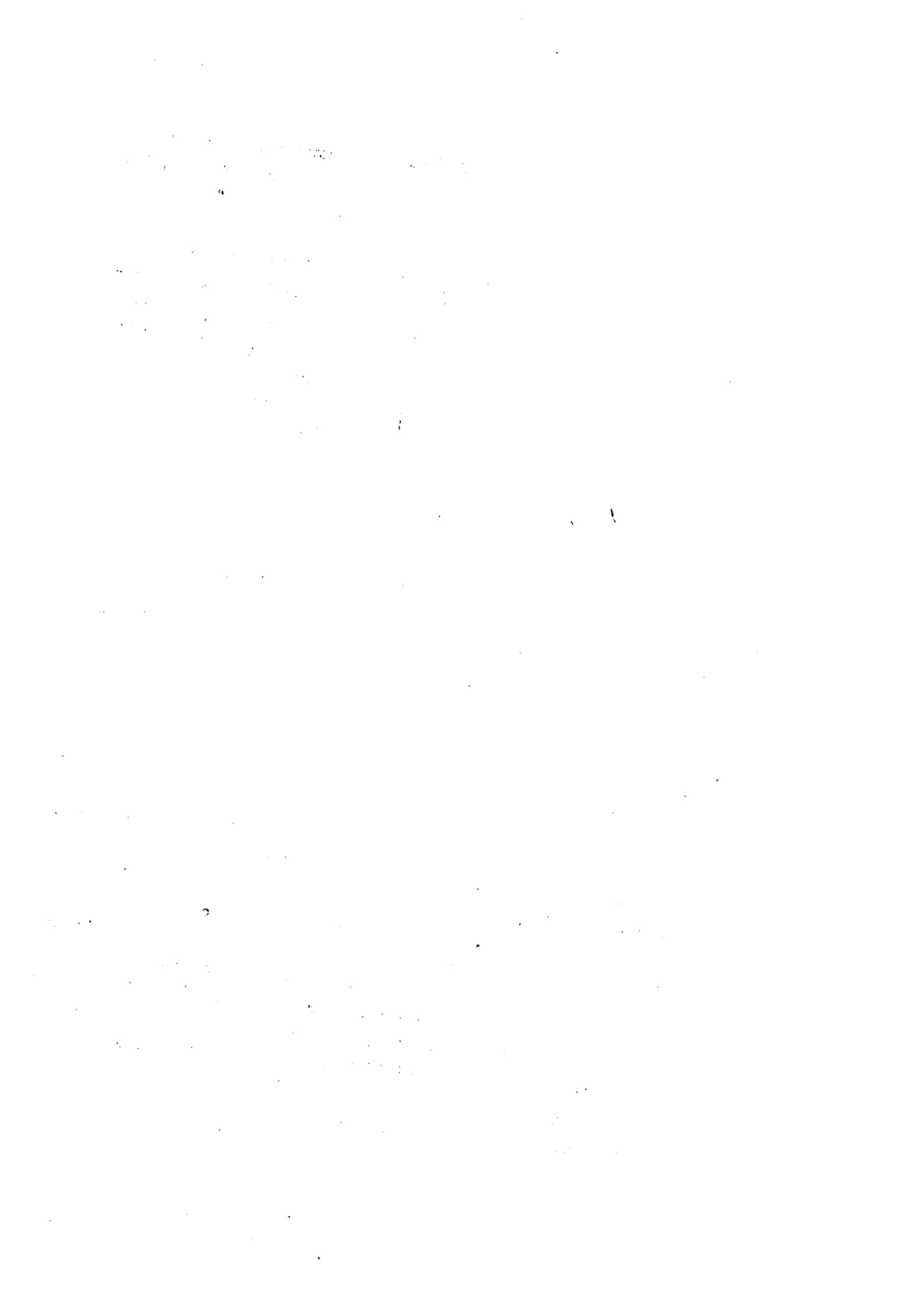
11/11/11

Ces résultats nous ayant montré que le pharynx semble prendre naissance à partir du tissu ectodermique, à la condition essentielle qu'un cerveau soit présent, nous avons procédé à des implantations de ganglions cérébroïdes à différents niveaux, pour préciser la nature des tissus susceptibles de présenter une compétence vis-à-vis de l'induction cérébrale.

Un ou deux ganglions cérébroïdes ont été implantés dorsalement sur le front de section antérieur de tronçons de 5 segments prélevés dans la région oesophagienne et dans la région médiane du corps. La régénération normale du tronçon oesophagien est empêchée par apposition d'un volet de tégument prélevé dans la région postérieure du ver. L'examen microscopique effectué après 3 ou 4 semaines de culture révèle l'absence totale de formation pharyngienne dans les portions oesophagiennes ou intestinales sous-jacentes au cerveau greffé, qui conserve par ailleurs une structure normale.

Un premier résultat de ces cultures est de mettre en évidence un facteur indispensable à la différenciation des structures pharyngiennes : la présence de ganglions cérébroïdes, néoformés ou non. Selon AVEL, le pharynx serait induit par le blastème ecto-mésodermique. Au cours de la régénération, le cerveau, issu de ce blastème, semble donc être l'inducteur de la formation du pharynx.

Il est admis généralement, à la suite des travaux de AVEL (1941) et de KAWAKAMI (1952) que le pharynx se forme à partir du régénérat oesophagien. Récemment CHAPRON (1971 b) a repris cette étude, par les techniques de la microscopie électronique, sur des vers en régénération normale. Il conclut ses observations en confirmant les résultats d'AVEL et de KAWAKAMI : le pharynx se différencie à partir du régénérat de l'oesophage. En ce qui nous concerne, dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placé, il semble que les tissus ectodermiques en régénération soient les seuls à être compétents. Cette constatation suggère que la reformation d'un pharynx se déroule suivant des processus morphogénétiques identiques à ceux qui interviennent au cours de l'organogenèse larvaire. Il se peut toutefois qu'en perturbant le processus normal de la régénération par des opérations microchirurgicales un tissu en cours de néoformation, donc de type embryonnaire, puisse suppléer à l'absence du feuillet normalement compétent. De toute façon un tissu déjà différencié ne peut se transformer en pharynx même en présence de l'inducteur.



D'autre part, les formations pharyngiennes que nous avons observées par ailleurs (Ch. 2 § 3) à partir d'un épiderme régénéré, au-dessous d'une structure cérébroïde néoformée, s'expliquent par le rôle inducteur du cerveau que nous avons ainsi mis en évidence. Il y a donc lieu de séparer nettement, au cours de la régénération, d'une part l'influence trophique de la chaîne nerveuse et d'autre part le rôle inducteur du cerveau.



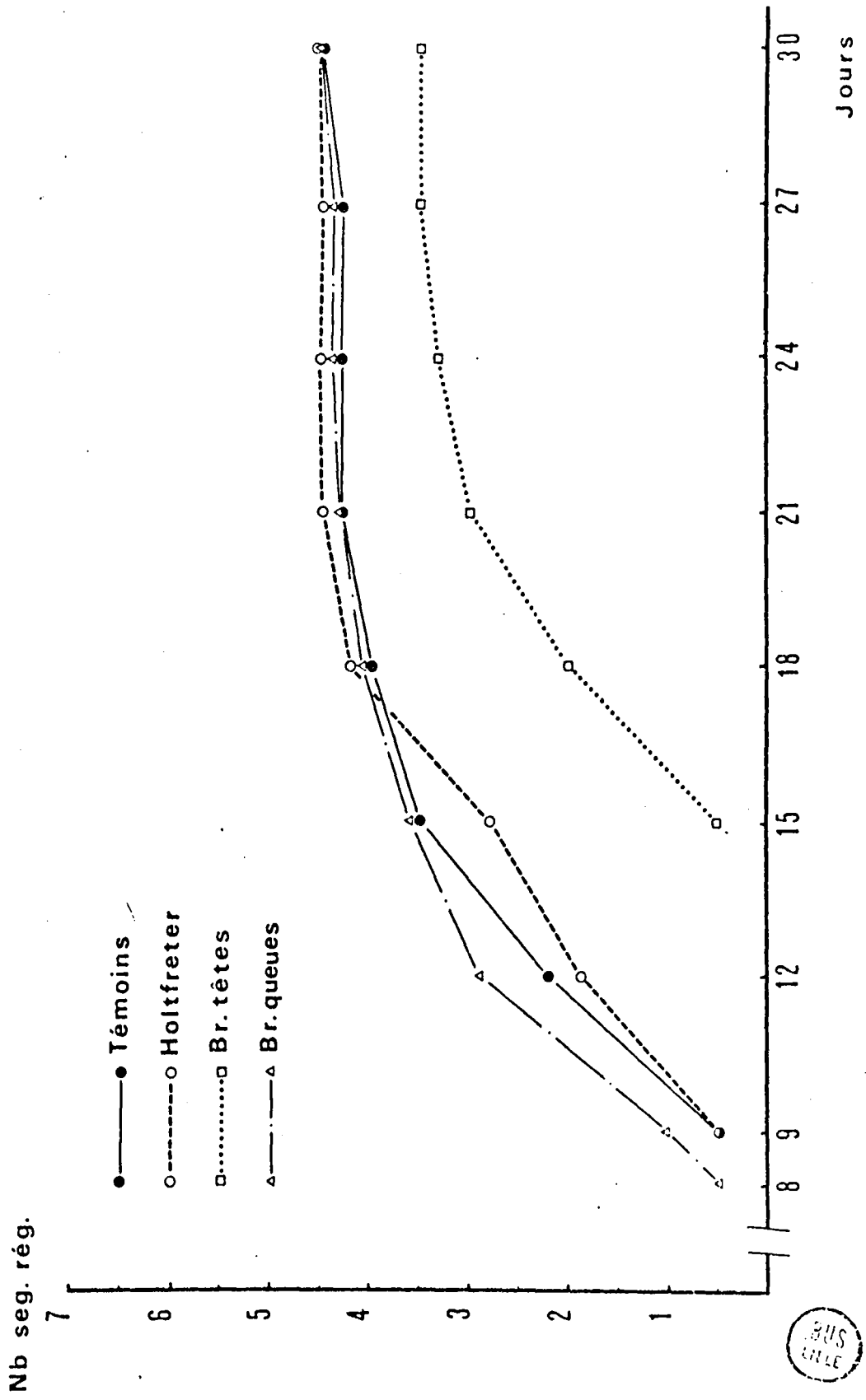
COMPARAISON DES MOYENNES  
I - INJECTIONS UNIQUES

TABLEAU IX  
DES DIFFERENTS LOTS A LA MOYENNE DES TEMOINS

Séries	Temps	8	9	12	15	18	21	24	27	30
1	TEMOINS (16)	0	0,4 ± 0,6	2,2 ± 0,8	3,5 ± 0,8	4,0 ± 0,5	4,3 ± 0,5	4,3 ± 0,8	4,3 ± 0,8	4,5 ± 1,0
2	HOLTFRETER (18)	0	0,5 ± 1,0	1,9 ± 0,9	2,8 ± 0,7	4,2 ± 0,7	4,5 ± 0,7	4,5 ± 0,7	4,5 ± 0,7	4,5 ± 0,7
3	SIGNIFICATION 2 par rapport à 1		-	+*	-	-	-	-	-	-
4	Br. TETES (15)	0	0	0	0,4 ± 0,8	2,0 ± 1,1	3,0 ± 1,0	3,3 ± 0,9	3,5 ± 0,8	3,5 ± 0,8
5	SIGNIFICATION 4 par rapport à 1				+*	+**	+*	+*	+*	+*
6	INDICE D'IN- HIBITION				8,75	2,00	1,43	1,30	1,23	1,28
7	Br. QUEUES (17)	0,4	1,0 ± 0,9	2,9 ± 1,3	3,6 ± 1,5	4,1 ± 1,4	4,3 ± 1,2	4,4 ± 1,1	4,4 ± 1,1	4,5 ± 1,1
8	SIGNIFICATION 7 par rapport à 1		+*	+*	-**	-*		-*	-*	-*

BUS  
LILLE

Observations : Tailles des régénérats en nombres de segments ± écart-type.  
Le signe + indique un écart significatif, 1. Le signe - un écart non-significatif entre la moyenne du lot et celle des témoins  
\* : test de "t", risque inférieur à 1 %  
\*\* : test "U", risque inférieur à 1 %



Chapitre 4

ETUDE "IN VIVO" DE L'INHIBITION CEPHALIQUE

L'existence d'un facteur inhibiteur de la régénération céphalique, localisé dans le système nerveux central, étant démontrée "in vitro", il fallait confirmer ces résultats par son étude sur le vivant chez le même Eisenia foetida (MARCEL, 1970 b). Nous avons effectué deux séries expérimentales. Dans la première, une seule injection est pratiquée le jour de l'opération, tandis que dans la seconde les Eisenia reçoivent plusieurs injections de rappel les jours suivant l'opération.

1 - Régénération après injection unique de broyats

Dans cette première série, quatre lots de 20 individus chacun sont constitués : l'un reçoit une injection de 5 µl de solution de "têtes", le second 5 µl de "queues", le troisième 5 µl de liquide de Holtfreter pur, et le dernier sert de témoin. Les opérés sont ensuite isolés entre deux rondelles de papier filtre humide dans des boîtes de Pétri, jusqu'à cicatrisation de la plaie ; ils sont ensuite placés sur du terreau humidifié, permettant une meilleure survie.

Les résultats de cette première série opératoire sont transcrits dans le Tableau IX et sur le graphique (Fig. 12).

Les témoins commencent à régénérer au bout d'une semaine ; ils présentent tous au moins un petit bourgeon conique le 9<sup>o</sup> jour. Certains montrent une segmentation post-prostomiale. Tant que cette métamérisation n'est pas apparente, le régénérat est compté 0. La croissance de la tête est assez rapide la semaine suivante, puis se ralentit du 15<sup>o</sup> au 21<sup>o</sup> jour, date à laquelle la néoformation a pratiquement atteint sa taille définitive.

Les vers ayant reçu une injection de Holtfreter pur accusent un retard à partir du 12<sup>o</sup> jour, en particulier le 15<sup>o</sup>. Ce retard est comblé le 18<sup>o</sup> jour, date à partir de laquelle la courbe de croissance se confond avec celle des témoins.

Les vers auxquels on a injecté du broyat de "queues" commencent à régénérer le 8<sup>o</sup> jour, par conséquent un jour plus tôt que les témoins. Jusqu'au 15<sup>o</sup> jour, ils ont un régénérat dont la taille moyenne est supé-

rieure à celle des témoins. A partir du 15° jour les courbes sont presque confondues.

Enfin, les Eisenia soumis à l'action du broyat de "têtes" ne commencent à régénérer que le 15° jour, soit une semaine environ après les témoins. La courbe de croissance est semblable à celle des témoins mais demeure toutefois constamment au-dessous : on note au 30° jour une différence moyenne de 1 segment. Les tests biométriques permettent d'affirmer que cette différence est toujours significative.

On peut estimer la valeur de cette inhibition par un "indice d'inhibition"  $i$  égal au rapport du nombre de segments régénérés chez les témoins (N) au nombre de nouveaux métamères chez les opérés (n) :

$$i = \frac{N}{n}.$$

Cet indice est égal à 1 dans le cas où l'inhibition est nulle. Il est  $> 1$ , et d'autant plus grand, lorsque l'inhibition est plus forte.

Les différentes valeurs de cet indice sont reportées sur la ligne 6 du tableau IX. On peut remarquer qu'il diminue très rapidement entre le 15° et le 17° jour après l'opération et qu'il se rapproche par la suite de la valeur 1,23 qu'il atteint au 27° jour.

On peut donc conclure de cette première série d'expériences que :

a) une injection de Holtfreter pur n'affecte que légèrement et passagèrement la régénération entre le 12° et le 15° jour (écart significatif des moyennes à 12 jours). Par conséquent une modification importante de la courbe de croissance sera due à la nature de la substance injectée et non au stress provoqué par l'opération elle-même ou par le solvant de l'extrait.

b) Une seule injection de 5  $\mu$ l de broyat de "têtes" (soit l'équivalent de 1/2 tête) empêche toute régénération pendant une semaine. La croissance du régénérat est, par la suite, ralentie et celui-ci n'atteint jamais la taille des témoins.

c) Le broyat de "queues" n'a aucune influence inhibitrice. Au contraire, il paraît favoriser le début de la régénération ; l'écart des moyennes est encore significatif le 14° jour.

TABLEAU X

COMPARAISON DES MOYENNES DES DIFFERENTS LOTS A LA MOYENNE DES TEMOINS

2 - INJECTIONS REPETEES

Temps		7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
1	TEMOINS (16)	0	0,5 ± 0,7	1,5 ± 0,8	2,8 ± 0,9	3,4 ± 1,2	3,8 ± 1,1	3,9 ± 1,1	4,2 ± 1,3	4,3 ± 1,3	4,2 ± 1,3	4,3 ± 1,3	4,3 ± 1,3	4,3 ± 1,3
2	TEMOINS INJECTES APRES 9 JOURS (16)	0	0,4 ± 0,6	1,5 ± 0,9	3,0 ± 0,8	3,5 ± 1,2	4,5 ± 1,0	5,1 ± 0,9	5,5 ± 1,0	5,5 ± 1,0	5,5 ± 1,0	5,5 ± 1,0	5,5 ± 1,0	5,5 ± 1,0
3	SIGNIFICATION 2 par rapport à 1		-		-	-	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*
4	Br. TETES (16)	0	0	0	0	0,7 ± 1,5	1,4 ± 1,5	2,2 ± 1,6	2,4 ± 1,7	2,5 ± 1,8	2,5 ± 1,8	2,5 ± 1,8	2,5 ± 1,7	2,5 ± 1,7
5	SIGNIFICATION 4 par rapport à 1					+**	+**	+**	+**	+**	+**	+**	+**	+**
6	INDICE D'IN- HIBITION i					4,85	2,71	1,77	1,75	1,68	1,72	1,72	1,72	1,72
7	Fr. QUEUES (18)	0,3 ± 0,5	1,0 ± 0,8	2,0 ± 0,8	3,7 ± 1,2	5,0 ± 1,2	5,4 ± 0,9	5,5 ± 1,1	5,5 ± 1,0	5,5 ± 1,0	5,7 ± 0,9	5,7 ± 0,9	5,7 ± 0,9	5,7 ± 0,9
8	SIGNIFICATION 7 par rapport à 1			-*	-**	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*

Mêmes légendes et observations que pour le Tableau IX.



Figure 13 - Vitesse de la régénération après injections répétées de broyats.

La courbe en tirets correspond à la vitesse de régénération lorsque les injections de broyat de têtes ne sont commencées que le 9<sup>e</sup> jour (Br. têtes > 9 j.). Comparer cette courbe avec celle, en pointillé, correspondant à des injections répétées dès le début de l'expérience (Br. têtes cont.).

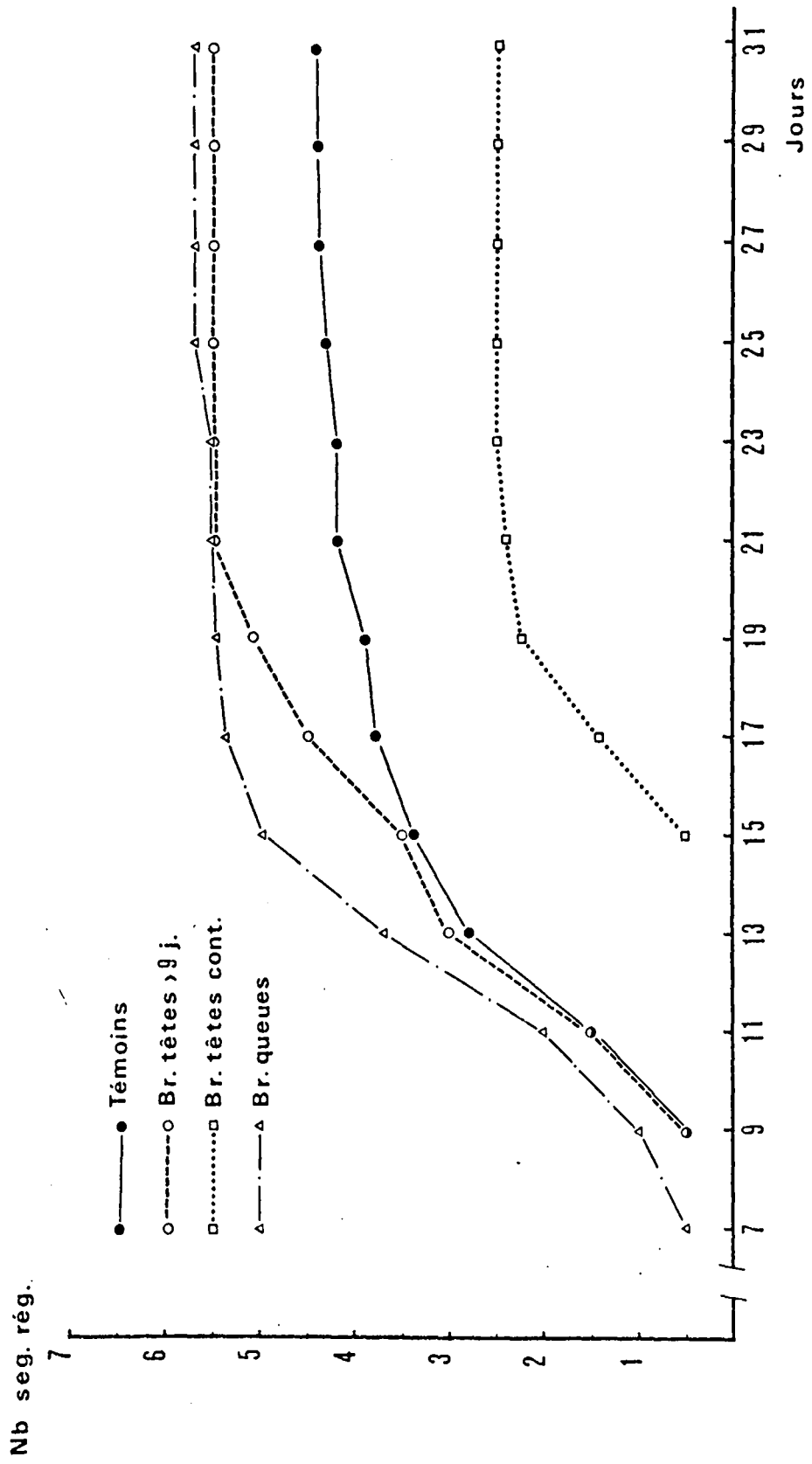
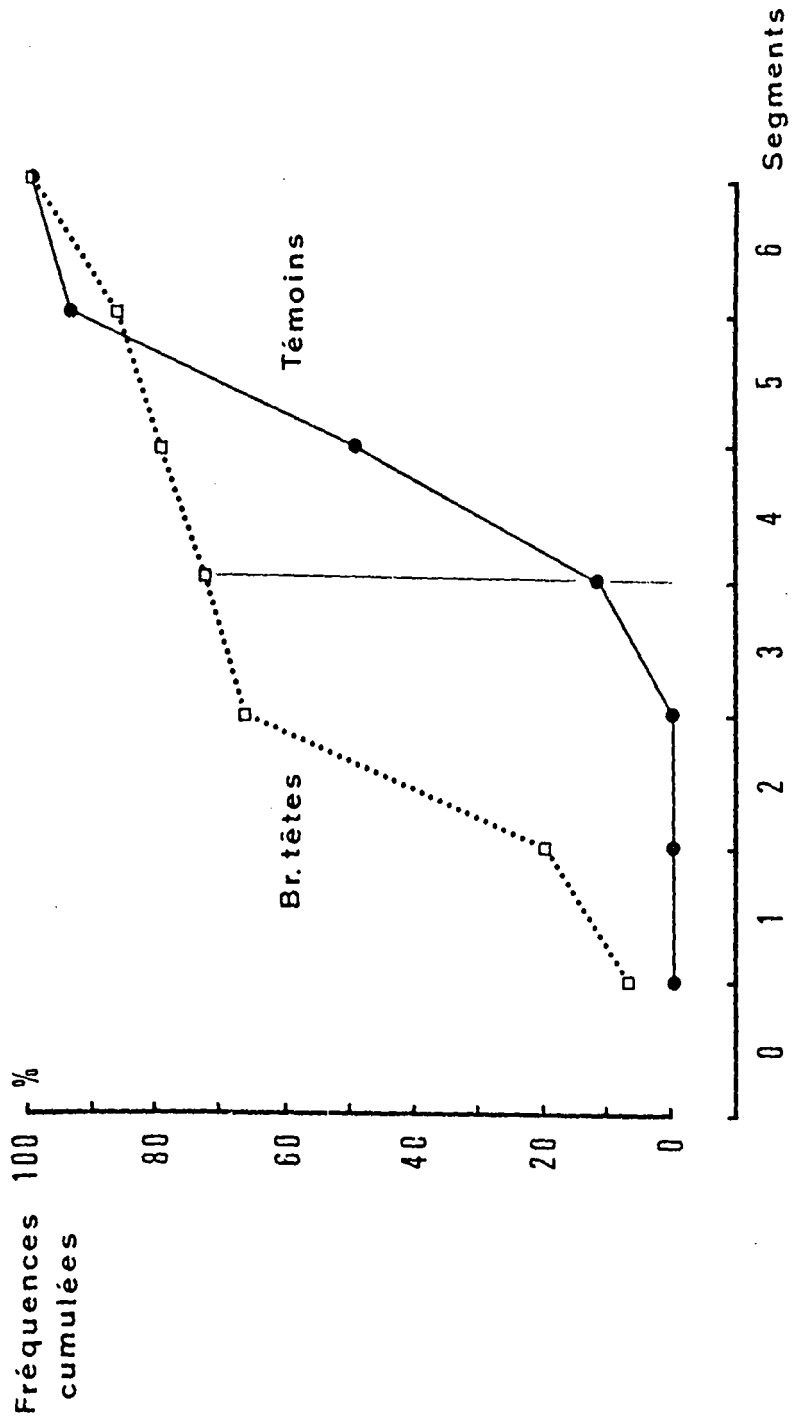


Figure 1<sup>h</sup> - Polygone des fréquences cumulées.

La courbe relative aux témoins est tracée en trait continu, la courbe relative aux expériences en présence de broyat de têtes, en pointillé.





## 2 - Régénération après injections répétées de broyats

Pour tenter d'accroître l'efficacité des substances injectées, nous avons essayé d'augmenter la concentration de l'inhibiteur. Mais nous nous sommes heurté à une difficulté technique : la viscosité du produit (due au mucus abondant) ne nous a pas permis de réaliser les opérations. Nous avons donc été amené à répéter plusieurs fois les injections en utilisant chaque fois la dose et la concentration précédentes. Ainsi, les vers reçoivent 5  $\mu$ l tous les jours pendant 8 jours, puis tous les deux jours jusqu'au 29<sup>e</sup> jour. Lorsqu'on soumet ainsi des vers "décapités" à des injections répétées de broyats de "têtes" ou de "queues", les résultats sont les suivants (Tableau X et Fig. 13).

La courbe de croissance des témoins est à peu près superposable à celle de la série précédente.

Les vers qui reçoivent des injections de broyats de têtes régulièrement répétées jusqu'à la fin de l'expérience ne débutent leur régénération que le 15<sup>e</sup> jour. Les régénérats atteignent leur plus grande longueur moyenne le 23<sup>e</sup> jour. Celle-ci, d'ailleurs, ne dépasse pas 2,5 segments. Le calcul du test "U" à défaut du test "t" permet de conclure à une différence significative entre ces deux croissances. D'autre part la répartition des fréquences, par nombres de segments régénérés, montre que chez les témoins 87 % des individus ont au moins 4 segments contre 27 % chez les vers injectés ; inversement 73 % de ceux-ci ont acquis moins de 4 segments contre 13 % pour les témoins. Ces faits sont bien montrés par le polygone des fréquences cumulées (Fig. 14). L'indice d'inhibition (ligne 6, Tableau X), défini précédemment, varie de 4,85 le 15<sup>e</sup> jour à 1,72 à partir du 25<sup>e</sup>.

La courbe de croissance des régénérats des vers ayant reçu des broyats de "queues" pendant 9 jours met en évidence un accroissement de la vitesse de régénération. Celle-ci augmente rapidement du 7<sup>e</sup> au 15<sup>e</sup> jour. A partir de cette date, les moyennes sont nettement supérieures à celles des témoins et les écarts en sont significativement différents.

Si l'on injecte du broyat de "têtes" à partir du 9<sup>e</sup> jour seulement, les résultats diffèrent nettement de ceux obtenus chez les vers à qui les injections ont été effectuées dès le début de l'expérience. En effet, si, du 9<sup>e</sup> au 15<sup>e</sup> jour, les deux courbes sont pratiquement superposables, à partir du 15<sup>e</sup> jour la vitesse de régénération augmente brusquement. Les longueurs moyennes des néoformations deviennent identiques, à

partir du 21° jour, à celles des vers ayant reçu du broyat de "queues". Une action trophique de la part de la tête se manifeste donc si l'injection débute le 9° jour.

Cette seconde série expérimentale permet de déduire que :

a) l'homogénat de régions céphaliques, injecté régulièrement pendant un mois empêche la régénération de débiter avant le 15° jour, et, d'autre part, les tailles moyennes des régénérats obtenus restent faibles (73 % des bourgeons ont moins de 4 segments).

b) Les injections du même broyat effectuées à partir du 9° jour n'ont aucun effet inhibiteur. Au contraire, se manifeste l'effet trophique de la chaîne nerveuse.

c) Le broyat de régions caudales possède un facteur trophique favorisant nettement une régénération plus précoce et permettant des formations céphaliques de taille plus grande que chez les témoins.

#### Discussion et Conclusion

La croissance des régénérats à partir d'animaux témoins est, dans nos conditions d'expérience, sensiblement identique à celle décrite par CHAPRON (1969 a). La régénération est hypomériké, comme le signale d'ailleurs cet auteur.

Le broyat de régions céphaliques, injecté dès le début de l'expérience, empêche toute régénération pendant 8 jours mais ne peut l'inhiber complètement. En effet, à partir du 9° jour, que l'injection soit unique ou répétée, un bourgeon se forme et aboutit à un régénérat. Celui-ci demeure toutefois de petite taille, surtout dans le lot des vers ayant reçu des injections répétées tout au long de l'expérience. Ce résultat confirme donc l'existence d'une substance inhibitrice qui, cependant, dans le cadre de ces expériences "in vivo", ne permet pas d'atteindre les taux d'inhibition obtenus "in vitro". Il est toutefois en accord avec les données de CHAPRON (1969 a) qui, au moyen de greffes, trouve que l'inhibition est incomplète et ralentit la régénération. Nos expériences de rappels d'injection ont pour effet d'augmenter le taux de substance inhibitrice dans le liquide coelomique et par suite de ralentir davantage la régénération. Mais, par suite du renouvellement, sans doute assez rapide, du contenu coelomique, la proportion d'inhibiteur est toujours moindre que dans le cas des cultures organotypiques où l'explant est constamment

en contact avec le broyat. Nos observations "in vivo" semblent donc confirmer cette hypothèse de l'élimination du facteur inhibiteur que nous avons déjà émise pour expliquer les résultats de CHAPRON (MARCEL, 1970 a).

Le facteur inhibiteur fourni à un ver en régénération, à partir du 9° jour, n'a plus aucune action retardatrice. A cette date, un bourgeon non segmenté au moins est toujours visible (stade 8 suivant CHAPRON, 1969 a). Mais les processus morphogénétiques sont suffisamment avancés pour ne plus pouvoir être bloqués ou même seulement ralentis. Au contraire, le broyat a une action diamétralement opposée : la substance trophique, que nous avons mise en évidence dans la chaîne nerveuse (chapitres précédents et MARCEL, 1968) et sécrétée par elle (CHAPRON, 1969 b), est alors seule à agir ; elle provoque l'accroissement de la vitesse de régénération observée du 15° au 21° jour. La néoformation est encore le plus souvent hypomérique ; elle est équimérique dans 6 % des cas.

C'est cette même substance trophique qui est vraisemblablement responsable de l'augmentation de la régénération chez les vers ayant reçu du broyat caudal. Ce résultat confirme et complète celui que nous avons obtenu "in vitro" : le facteur trophique existe bien tout au long de la chaîne nerveuse, depuis les premiers neuromères jusqu'à l'extrémité postérieure. L'augmentation du taux de substance trophique ne nous a pas toutefois permis d'observer les hyperrégénérations qu'AVEL (1947) avait obtenues en augmentant la proportion de la chaîne nerveuse par rapport à la paroi du corps.

Ces deux dernières expériences permettent aussi de penser que la substance trophique pourrait avoir un double rôle. D'une part, dès les premières manifestations de la régénération, elle activerait les mécanismes, en particulier en agissant sur le bouchon cicatriciel, comme le suppose CHAPRON. Mais d'autre part elle agirait sur la taille du régénérat. Cette seconde influence se ferait sentir plus tardivement et serait, par conséquent, responsable de l'accroissement du nombre de métamères, dans les expériences d'AVEL, comme dans les nôtres.

## II

### REGENERATION CAUDALE

#### Chapitre 5

Les expériences effectuées "in vitro" et "in vivo", rapportées dans les chapitres précédents, ont montré que la régénération céphalique était sous la dépendance de deux facteurs à rôle antagoniste. Le premier inhibe la régénération d'une tête ; il est localisé dans le tissu nerveux antérieur. Le second, trophique, se trouve distribué tout au long de la chaîne nerveuse. Il fallait rechercher si des substances à rôle homologue intervenaient dans la régénération postérieure (MARCEL, 1970 c).

MOMENT (1946) a montré que la taille du régénérat caudal ne dépend que du niveau d'amputation, quel que soit le nombre initial de segments. Cette corrélation n'existerait pas pour des amputations très postérieures (SAUDAIN, 1968). On sait d'autre part (HUBL, 1956, JUBERTHIE, 1965) que la régénération caudale à un niveau très distal est dominée par une neurosécrétion d'origine cérébrale. Cette action endocrine a toutefois été controversée récemment par SAUDAIN (1968) par des résultats d'expériences portant sur un grand nombre de vers.

Pour essayer d'éviter l'interaction de cet éventuel facteur supplémentaire, nous avons envisagé la régénération caudale sur des individus entiers (in vivo) aux intersegments 50/51 et 60/61, donc à peu près au milieu du corps. La technique est la même que celle qui a été utilisée pour les expériences relatées au chapitre 4.

Pour chacun des deux niveaux (50/51 et 60/61), trois lots de vers sont constitués. L'un reçoit tous les jours, pendant 10 jours, 10 µl de broyat de têtes, soit l'équivalent de 1/2 tête par jour. Au second lot est injecté, dans les mêmes conditions et à la même concentration, de l'homogénat de queues. Le troisième lot, élevé comme les précédents, sert de témoin. Les segments régénérés sont comptés tous les deux jours.

TABLEAU XI

## ACTION DES BROYATS DE QUEUES ET DE TETES AU NIVEAU DE L'INTERSEGMENT 50/51

	Temps en jours	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	40
1	TEMOINS (28)	0	Py	5,1 ± 3,2	11,7 ± 5,1	21,0 ± 7,1	26,5 ± 8,3	32,4 ± 7,3	35,9 ± 7,5	39,4 ± 6,4	41,3 ± 6,7	42,0 ± 7,0	42,6 ± 7,0	42,8 ± 6,8
2	BROYAT DE QUEUES (18)	0	0	Py	3,2 ± 5,0	6,1 ± 6,5	9,5 ± 8,2	14,0 ± 9,9	17,6 ± 10,5	19,2 ± 10,0	20,9 ± 11,0	21,5 ± 11,4	22,0 ± 11,5	22,3 ± 11,9
3	SIGNIFICATION 2 par rapport à 1				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	INDICE D'INHIBITION			5,10	3,65	3,50	2,78	2,31	2,04	2,05	1,97	1,95	1,93	1,92
5	BROYATS DE TETES (17)	0	Py	4,0 ± 2,2	9,4 ± 3,2	20,8 ± 5,8	27,0 ± 4,8	31,2 ± 7,7	36,6 ± 5,9	38,7 ± 5,2	40,8 ± 5,5	41,2 ± 5,8	41,6 ± 6,0	41,8 ± 6,2
6	SIGNIFICATION 5 par rapport à 1			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Observations : Tailles des régénérats en nombres de segments ± écart-type.

Le signe + indique un écart significatif, le signe - un écart non-significatif entre la moyenne du lot et celle des témoins

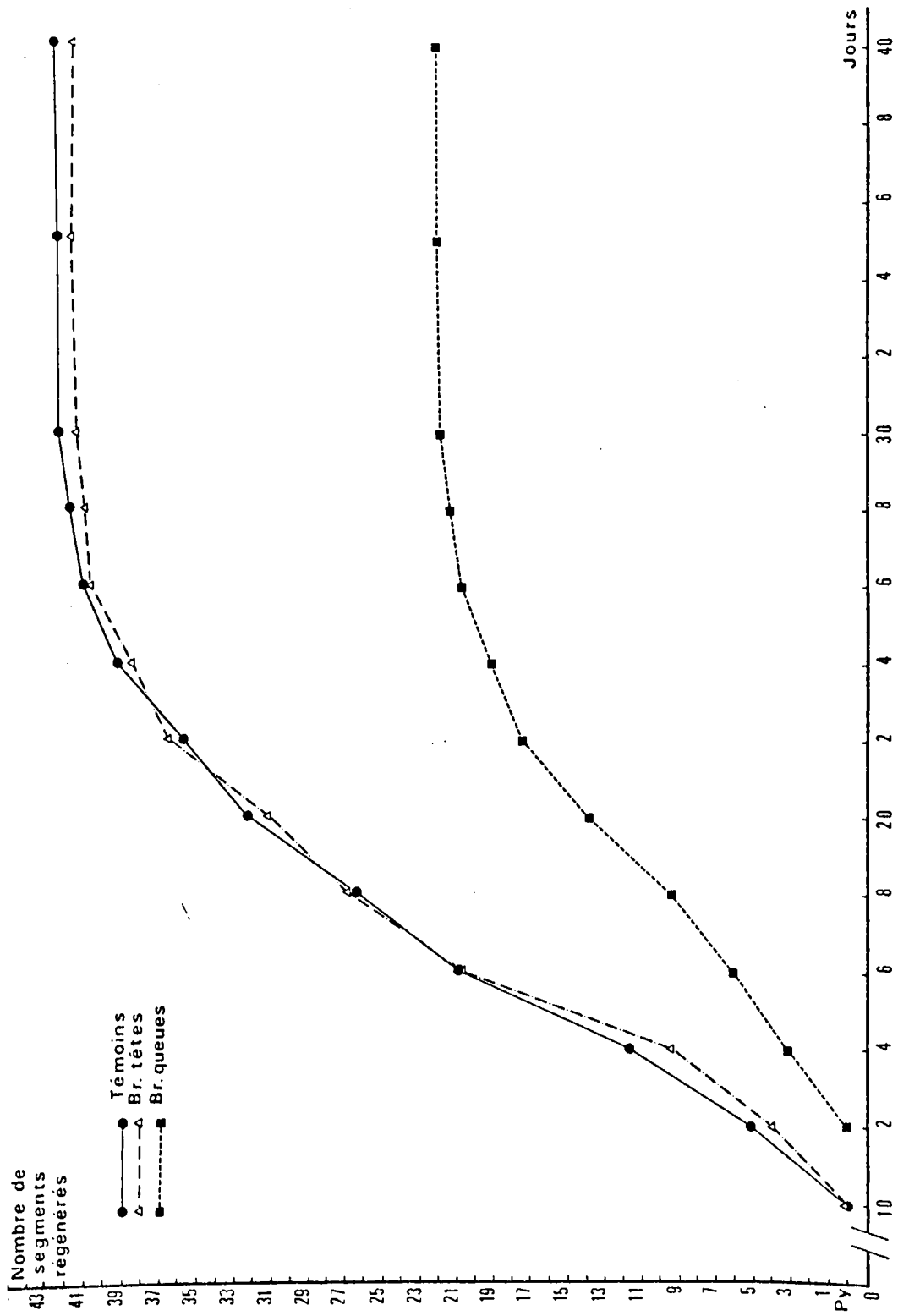
\* : test de "t", risque inférieur à 1 %

\*\* : test "U", risque inférieur à 1 %

Indice d'inhibition (ligne 4) =  $\frac{\text{Nombre de segments régénérés chez les témoins}}{\text{Nombre de segments régénérés chez les opérés}}$

Les nombres entre parenthèses dans la première colonne indiquent les nombres de vers survivants après 40 jours.

Figure 15 - Vitesse de la régénération caudale au niveau de l'intersegment 50/51 après injection de broyat de têtes (br. têtes) et de broyat de queues (br. queues).





1 - Régénération au niveau de l'intersegment 50/51

Sur le Tableau XI, sont reportés les nombres moyens de segments des régénérats, comptés tous les deux jours, pour les trois lots : 1-témoins, 2-vers ayant reçu du broyat de têtes, 3-vers ayant reçu du broyat de queues. La figure 15 représente les courbes de croissance de ces différents régénérats.

Ces courbes ont une allure en "S" caractéristique. On peut noter tout d'abord que les témoins commencent à régénérer le 10° jour un petit pygidium (noté Py en ordonnée). La vitesse de régénération est de plus en plus grande jusqu'au 16° jour : la néoformation atteint alors 21 segments. A partir de cette date, l'inflexion de la courbe traduit un ralentissement de la croissance. Celle-ci s'arrête 30 jours après l'amputation ; on compte à ce moment 42,6 segments. Entre le 30° et le 40° jour, l'augmentation du nombre de métamères est infime, en moyenne 0,2.

L'injection de l'homogénat de queues retarde de 48 heures l'apparition du pygidium. Par la suite, la courbe de croissance des opérés indique d'une part une vitesse de régénération plus faible que celle des témoins et d'autre part que la taille des régénérats est inférieure à celle des témoins. Le point d'inflexion de la courbe se situe à 18 jours, 48 heures après celui relatif aux témoins. A cette date, la taille moyenne des régénérats n'est que de 9,5 métamères. Le maximum d'extension de la queue néoformée apparaît à partir du 30° jour, avec une moyenne de 22 segments. En fin d'expérience on peut donc observer une régénération près de deux fois moindre chez les vers injectés que chez les témoins. La comparaison entre les moyennes des opérés et des témoins montre, pour chaque jour de comptage, une différence statistiquement significative (notée + sur le tableau XI).

Dans le lot des vers ayant reçu des injections répétées d'homogénat de têtes, la courbe de croissance des régénérats est pratiquement confondue avec celle des témoins. La vitesse paraît toutefois légèrement plus faible vers le 14° jour, mais l'écart entre les moyennes (9,4 contre 11,7) n'est pas statistiquement significatif. De même, n'est pas significative la différence que l'on observe du 30° au 40° jour.

Donc au niveau de l'intersegment 50/51, l'injection de broyat de queues retarde et ralentit la régénération caudale. L'indice d'inhibition  $i$  (ligne 4 sur le tableau XI) varie de 5,10, en début de régénération à 1,92 au 40° jour (voir Fig. 18).

Figure 16 - Vitesse de la régénération caudale au niveau de l'intersegment 60/61 après injection de broyat de têtes (br. têtes) et de broyat de queues (br. queues).

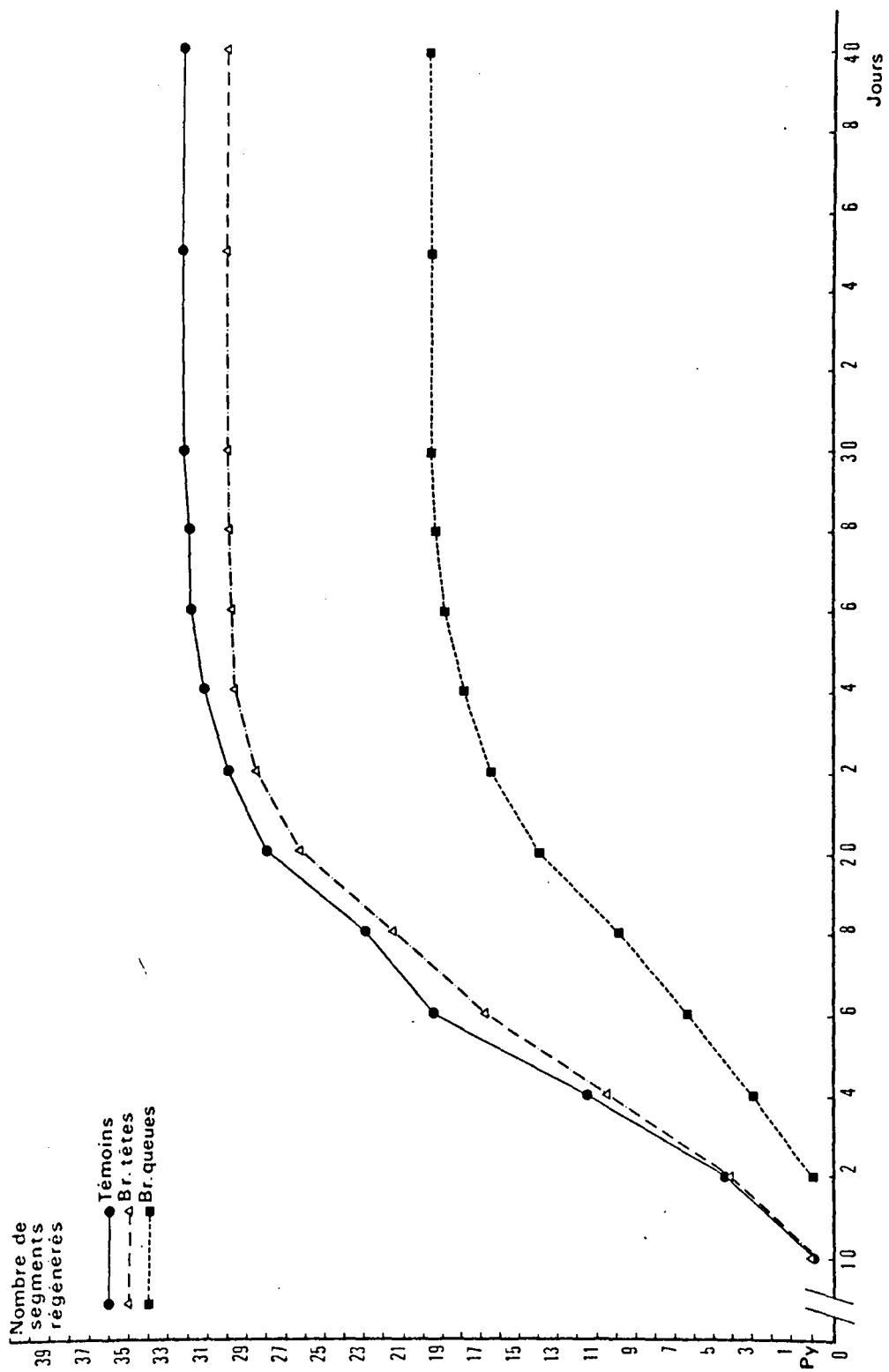


TABLEAU XII  
ACTION DES BROYATS DE QUEUES ET DE TETES AU NIVEAU DE L'INTERSEGMENT 60/61

	Temps en jours	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	40
1	TEMOINS (19)	0	Py	4,5 ± 2,8	11,7 ± 5,3	19,6 ± 4,8	23,2 ± 4,9	28,3 ± 6,1	30,2 ± 5,9	31,4 ± 5,3	32,2 ± 5,7	32,3 ± 4,5	32,6 ± 5,7	32,6 ± 5,7
2	SIGNIFICATION par rapport aux témoins 50/51			-	-	-	-	-	+*	+**	+**	+**	+**	+**
3	BROYAT DE QUEUES (17)	0	0	Py	3,1 ± 3,3	6,4 ± 5,2	10,0 ± 6,1	14,2 ± 7,4	16,7 ± 7,9	18,1 ± 8,3	19,2 ± 8,3	19,6 ± 8,4	19,8 ± 8,5	19,8 ± 8,5
4	SIGNIFICATION 3 par rapport à 1				+**	+**	+**	+**	+**	+**	+**	+***	+**	+**
5	INDICE D'INHIBITION			4,50	3,77	3,06	2,32	1,99	1,81	1,73	1,68	1,65	1,64	1,64
6	BROYAT DE TETES (16)	0	Py	4,3 ± 0,6	10,7 ± 2,0	17,0 ± 5,7	21,7 ± 4,2	26,5 ± 4,2	28,8 ± 3,5	29,9 ± 3,8	30,0 ± 3,5	30,2 ± 3,5	30,3 ± 3,3	30,3 ± 3,3
7	SIGNIFICATION 6 par rapport à 1				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Observations : Tailles des régénérats en nombres de segments ± écart-type.  
Le signe + indique un écart significatif, le signe - un écart non-significatif.  
\* : Test de "t", risque inférieur à 2 %  
\*\* : Test de "t", risque inférieur à 1%.  
\*\*\* : Test "U", risque inférieur à 1 %



## 2 - Régénération au niveau de l'intersegment 60/61

Les résultats des expériences pratiquées sur des vers amputés en arrière du 60° segment sont consignés dans le Tableau XII. Les courbes de croissance des régénérats sont tracées d'autre part sur la Figure 16.

Les témoins reforment un pygidium (Py en ordonnée) 10 jours après l'amputation. L'augmentation du nombre de métamères se fait à une vitesse comparable à celle des témoins de la série précédente jusqu'au 16° jour (point d'inflexion de la courbe). A cette date, la moyenne est de 19,6 segments. La vitesse décroît par la suite et le plateau est atteint 26 jours après l'opération avec une longueur moyenne de 32,2 métamères.

Le broyat de têtes ne paraît pas avoir d'action sur la régénération bien que la courbe correspondante se situe constamment au dessous de celle des témoins. A aucun moment, en effet, la différence entre les moyennes n'est significative (signe - sur le Tableau XII).

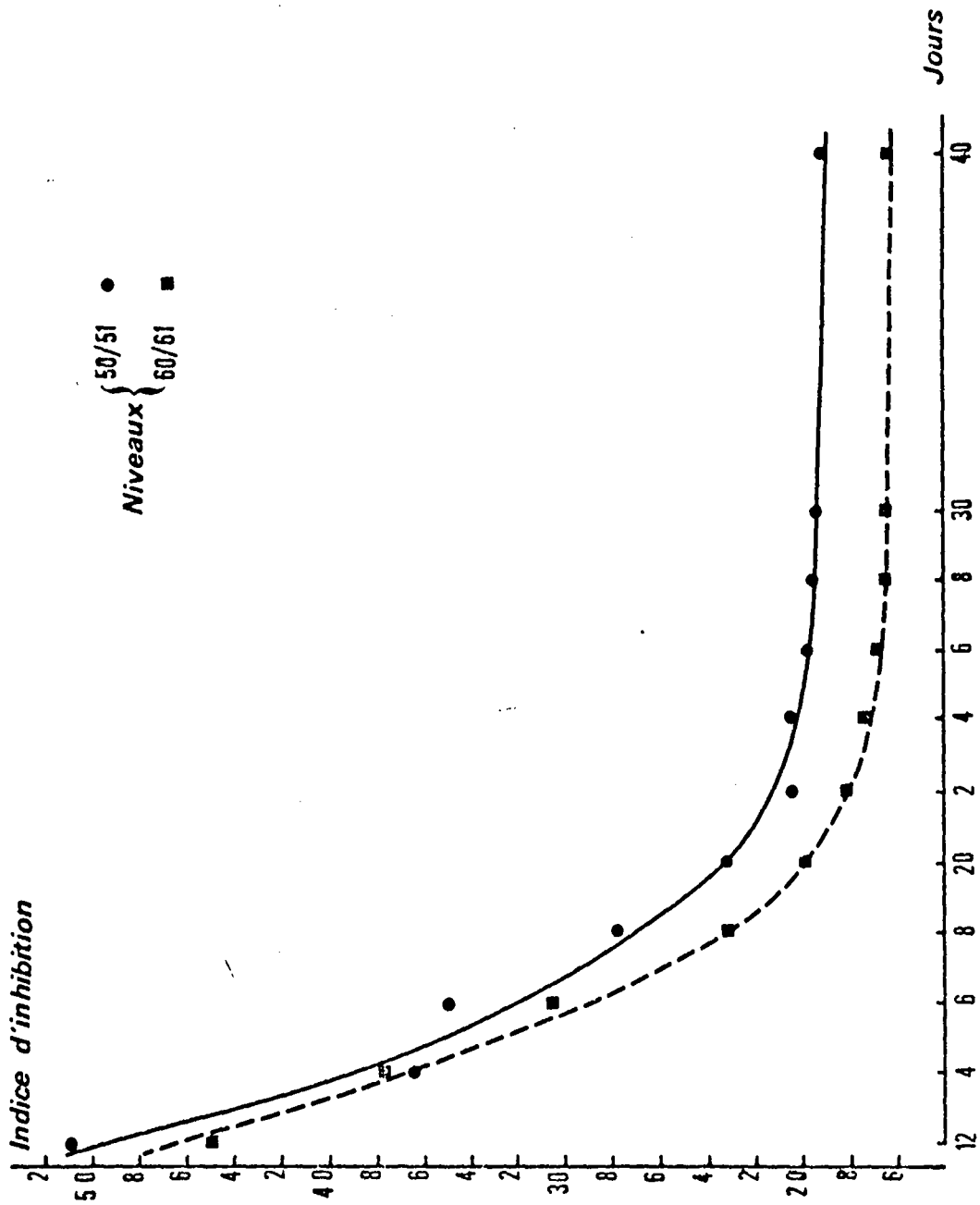
L'action du broyat de queues est par contre évidente. La régénération débute 2 jours après celle des témoins (Pygidium formé le 12° jour). Le plateau est atteint 26 jours après le début de l'expérience. A cette date, les régénérats mesurent en moyenne 19,2 segments. L'indice d'inhibition est de 1,68 (ligne 5 sur le Tableau XII). Par la suite, la croissance est insignifiante : la taille définitive du régénérat est atteinte dès le 30° jour, avec 19,8 segments. L'indice d'inhibition est alors de 1,61 ce qui signifie que la régénération est plus d'une fois et demie plus faible que dans le cas des témoins. Le calcul du test de "t" montre que les différences entre les moyennes des témoins et celles des vers traités par le broyat de queues sont constamment significatives.

### Discussion et Conclusion

Les résultats de nos observations sur les témoins amputés au niveau des intersegments 50/51 (42,8 segments régénérés) et 60/61 (32,6 segments) sont tout à fait comparables à ceux obtenus par MOMENT (1946) chez le même Eisenia foetida. Cet auteur compte en fin d'expérience 39,5 métamères pour une section au niveau 50 et 29,6 au niveau 60, nombres très peu modifiés à la suite de recherches plus récentes (MOMENT, 1950). L'écart entre les moyennes de nos deux séries est significatif à partir du 22° jour. Au 28° jour, aux longueurs respectives des souches (50 et 60 segments), correspond une différence corrélative (10 segments) entre les métamères des régénérats..

Figure 17 - Variations des indices d'inhibition pour les deux niveaux 50/51 (courbe continue) et 60/61 (courbe en tirets).

L'indice d'inhibition  $i$  est égal au rapport du nombre de segments régénérés chez les témoins ( $N$ ) au nombre de nouveaux métamères chez les opérés ( $n$ ) :  $i = \frac{N}{n}$ .



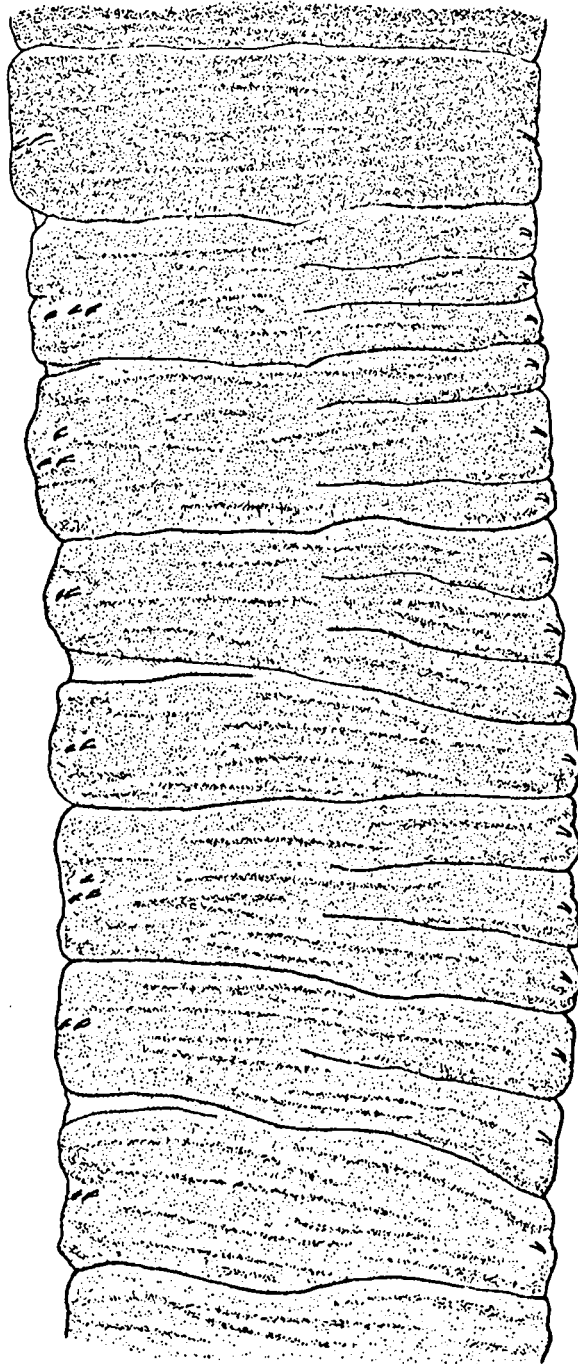
Aux deux niveaux où sont pratiquées les amputations, l'injection répétée de broyats de queues inhibe la régénération de la partie homologue. Toutefois, dans les deux cas, l'inhibition n'est pas complète car une queue régénère presque toujours mais celle-ci comporte un nombre de segments très inférieur à celui des témoins. Ces résultats correspondent d'ailleurs à ceux obtenus précédemment dans le cas de la régénération céphalique où, malgré la présence d'un tronçon céphalique greffé (CHAPRON, 1969 a, 1970 c) ou d'un homogénat de têtes (chapitre 4), une région céphalique se forme presque toujours mais constituée d'un petit nombre de segments. L'explication que nous avons proposée au chapitre 4 reste valable : la substance inhibitrice injectée se dilue dans le liquide coelomique et est éliminée tandis que celui-ci se renouvelle. On peut aussi noter que les écarts-types, et donc les variances, sont plus grands que ceux relatifs aux témoins. Cela traduit une distribution relativement plus étendue des régénérats dans la population considérée. Cette remarque est surtout valable au niveau de l'intersegment 50/51 où les variances des témoins et des opérés diffèrent significativement à partir du 26<sup>e</sup> jour.

D'autre part (Fig. 17), la variation des indices d'inhibition, déterminés précédemment, montre que l'influence de l'homogénat caudal se fait sentir surtout dans les premiers jours et s'atténue progressivement par la suite, au fur et à mesure que la substance inhibitrice est vraisemblablement évacuée. Toutefois, le déficit en segments reformés chez les vers injectés n'est jamais comblé, ce qui montre bien que le facteur inhibiteur agit dans les tout premiers stades de la morphogénèse.

Enfin, il faut noter que les vers ayant reçu du broyat caudal ne présentent, en fin d'expérience, qu'une différence de 2,5 segments entre les deux séries (50/51 et 60/61), contrairement aux deux lots témoins qui montrent entre eux un écart de 10 métamères. De plus, les indices d'inhibition au 60<sup>e</sup> segment sont constamment inférieurs à ceux relatifs au 50<sup>e</sup> (Fig. 17). Il y a donc un comportement différent vis à vis du facteur inhibiteur pour ces deux niveaux dès le début de la régénération. L'interprétation de cette observation est évidemment délicate et toute explication sera par suite une simple hypothèse à vérifier. On peut vraisemblablement éliminer d'emblée une action endocrine des ganglions cérébroïdes. Au 60<sup>e</sup> segment en effet JUBERTHIE a montré que la régénération était entièrement indépendante des neurosécrétions cérébrales. L'hypothèse

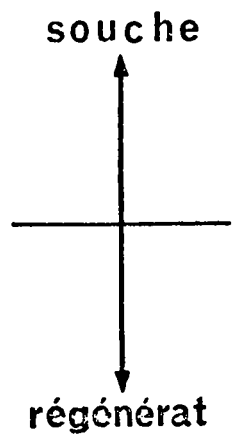
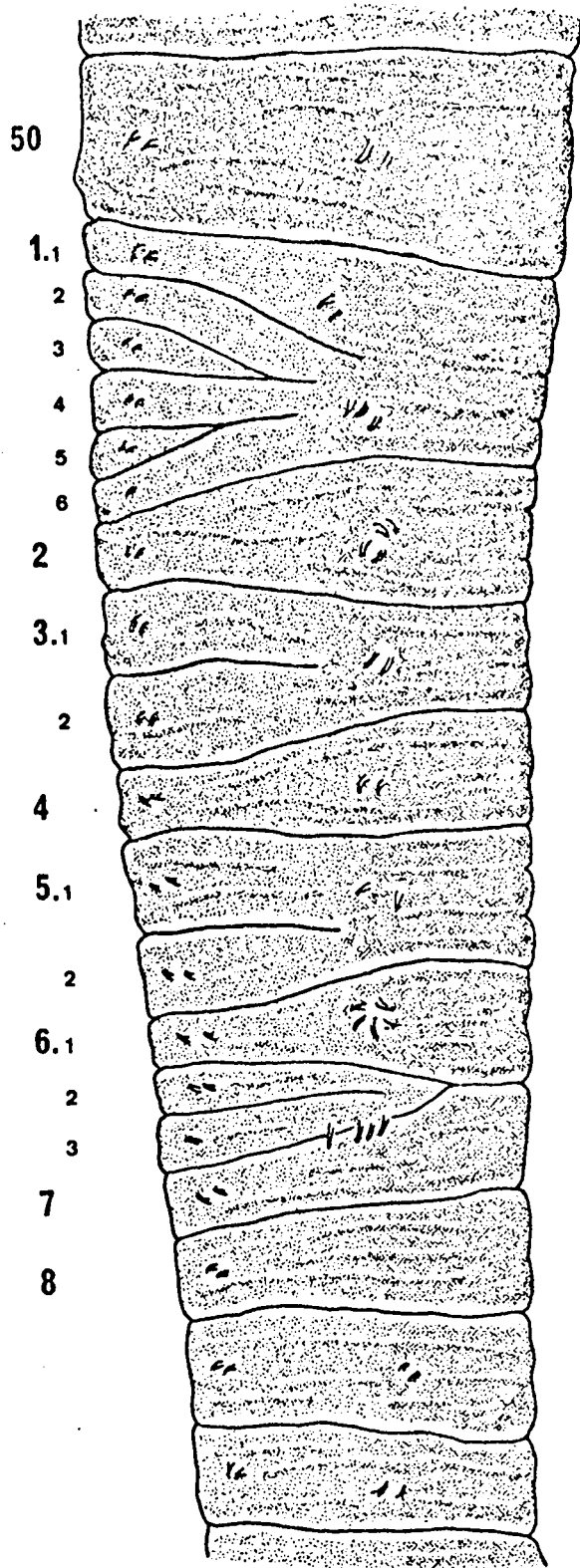


Figure 18 - Régénérat caudal dissymétrique (vue dorsale).  
Remarquer les subdivisions des métamères sur le  
côté droit.



BUS  
SILE

Figure 19 - Régénérat caudal dissymétrique (vue latérale gauche).  
Noter les nombreuses subdivisions de segments ainsi  
que l'implantation anormale de certaines soies.



que nous proposons fait intervenir les gradients de territoire. On sait que le territoire caudal débute chez Eisenia foetida au 19° segment. Plus on se déplace en direction postérieure, plus le territoire aurait une intensité "caudalisante" importante. Le "système mésodermique" prédominerait le système "ecto-neural" (ABELOOS, 1955). Cette prédominance serait plus grande au 60° segment qu'au 50° et par conséquent l'inhibition y serait moins aisée.

L'injection de broyats de têtes ne modifie en rien la régénération caudale. Or une expérience équivalente, consistant à injecter des broyats de queues au cours de la régénération céphalique, a montré que ceux-ci avaient une influence trophique nette (chapitre 4). Il semble donc que la région céphalique (cerveau et premiers neuromères) ne possède pas de propriété trophique, vis à vis de la régénération caudale à ces deux niveaux. Toutefois, un ver ayant reçu du broyat céphalique a présenté un régénérat très dissymétrique. Aux 7 métamères proximaux comptés du côté droit, correspondaient 16 segments du côté gauche et ventralement (Fig. 18 et 19). Ce régénérat était par ailleurs dans sa partie distale tout à fait normal et comportait une quarantaine de segments (MARCEL, 1970 d). On sait (MORGAN, 1895 ; SAUDAIN, 1968) que les anomalies de la segmentation ne sont pas rares chez Eisenia et nous avons pu en observer un certain nombre. Mais ces cas n'ont jamais montré un développement aussi dissymétrique. Peut-être faut-il mettre cette anomalie au compte d'une action trophique du système nerveux antérieur.



TABLEAU XIII

VARIATIONS DU COEFFICIENT D'INHIBITION  $c$  ET DU COEFFICIENT TROPHIQUE  $t$  EN FONCTION DU NIVEAU DES METAMERES

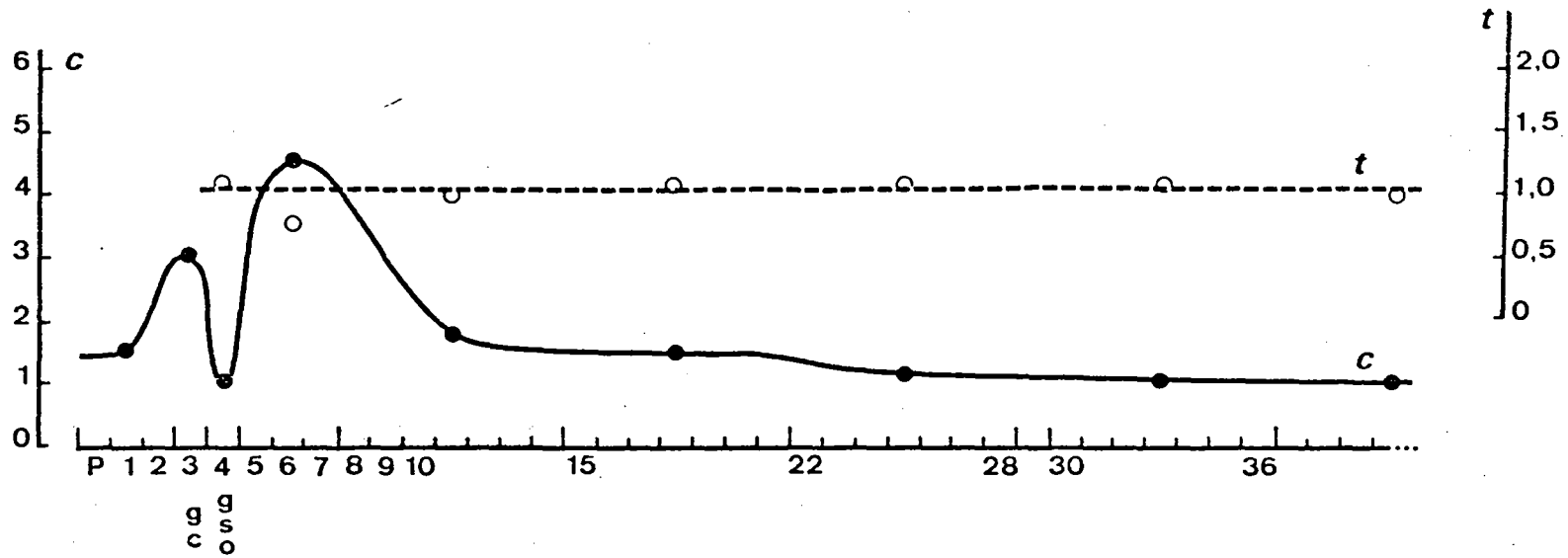
	Tête dénervée	Cerveau	GSO	G 5-7	G 8-14	G 15-21	G 22-28	G 30-36	Queue	Témoin
Coeff. d'inhibition $c = \frac{\text{Nb rég. té.}}{\text{Nb rég. obs}}$	1,5	3,1	1,0	4,6	1,8	1,5	1,2	1,1	1,0	1,0
Coeff. trophique $t = \frac{\text{Nb norm} + \text{Nb an}}{\text{Nb té.}}$			1,1	0,8	1,0	1,1	1,1	1,1	1,0	1,0

Figure 20 - Variations du coefficient d'inhibition c (trait continu) et du coefficient trophique t (trait interrompu) en fonction du niveau des métamères.

$$c = \frac{\text{Nombre de régénérats chez les témoins}}{\text{Nombre de régénérats chez les opérés}}$$

$$t = \frac{\text{Nombre de régénérats normaux + nombre de régénérats anormaux}}{\text{Nombre de régénérats chez les témoins}}$$

Remarquer la coïncidence entre le territoire tête et la répartition de l'inhibiteur.



Territoire tête





III

DISCUSSION ET CONCLUSION

DE LA PREMIERE PARTIE

L'étude des séries expérimentales effectuée dans cette première partie nous a permis d'observer les faits suivants.

Il existe chez l'Oligochète E. foetida, comme chez les autres vers étudiés, un système inhibiteur de la régénération céphalique ou caudale. C'est donc un processus très général qui règle le mécanisme de la régénération. Ce facteur, susceptible d'être extrait des tissus par homogénéisation, est soluble dans l'eau. Il est localisé, dans le cas d'Eisenia, dans le système nerveux central et vraisemblablement aussi périphérique.

Sa répartition semble se faire suivant un gradient. En effet, si l'on calcule, pour chaque tronçon, homogénéisé le rapport :

$$c = \frac{\text{Nombre de régénérats chez les témoins}}{\text{Nombre de régénérats chez les opérés}}$$

que l'on peut appeler "coefficient d'inhibition" on remarque (Tableau XIII) que à partir de la région céphalique où il est maximum, il décroît jusqu'au niveau des neuromères 22 à 28 (Fig. 20). La décroissance est très rapide d'abord, puis un palier est visible entre les neuromères 8 à 22. Au-delà le coefficient d'inhibition se rapproche de 1, valeur correspondant aux témoins. Or, si l'on trace en regard l'étendue du territoire tête on s'aperçoit que l'extrémité de ce champ correspond à la fin du palier du coefficient  $c$ . Il est possible que l'une des propriétés de ce champ céphalique soit justement de posséder ce pouvoir inhibiteur de la régénération céphalique. Ce champ pourrait donc être traduit par la distribution de cette substance inhibitrice.

Son absence au niveau du ganglion sous-oesophagien est difficilement explicable. On sait que celui-ci résulte de la coalescence des ganglions 1 à 4, par suite du recul du cerveau chez les Oligochètes supérieurs. Il serait logique qu'il possède les mêmes propriétés que les autres neuro-mères. Toutefois le ganglion sous-oesophagien semble servir de relai entre le cerveau d'une part et les autres ganglions de la chaîne ventrale d'autre part. D'après les observations de HUBL (1956), l'action endocrine du cerveau sur la régénération caudale s'exercerait par l'intermédiaire du ganglion sous-oesophagien. Il est donc possible que ce ganglion soit spécialisé dans l'élaboration d'une neurosécrétion: les cellules décelables par les colorants habituels des neurosécrétions y sont en effet nombreuses. Réduit au rôle de relai endocrine, il aurait perdu le pouvoir d'élaborer la substance inhibitrice.

L'expérimentation "in vivo" nous a aussi permis de retrouver un facteur inhibiteur de la régénération caudale, à des niveaux où le cerveau endocrine n'intervient pas (JUBERTHIE, 1965). Il existe par conséquent deux systèmes inhibiteurs, symétriques, qui règlent les possibilités de la régénération. Ces systèmes sont polarisés: l'inhibiteur céphalique ne modifie pas la régénération caudale et inversement. Il s'agit donc vraisemblablement de deux substances différentes liées respectivement au territoire "tête" et au territoire "queue".

L'effet trophique de la chaîne nerveuse, connu depuis longtemps, est dû à une substance soluble dans l'eau que l'on peut extraire par homogénéisation. Nos expériences et l'étude des variations du coefficient trophique (Fig. 20) permettent de déduire que ce facteur est réparti uniformément le long de la chaîne nerveuse. Il n'a pas de spécificité et agit indépendamment de la polarité, dans le cas de la régénération céphalique. C'est ainsi que la région caudale est capable de favoriser la régénération d'une tête au niveau du 8° segment.

Par contre, vis à vis de la régénération caudale, aux niveaux 50/51 et 60/61, nous n'avons pas pu mettre en évidence une telle action non polarisée. Il semble que dans ce cas, le facteur trophique, présent dans la région céphalique, n'ait pas d'effet sur la régénération postérieure. Les éléments mis en jeu dans les mécanismes de la morphogenèse caudale ne sont sans doute pas compétents pour la substance trophique d'origine antérieure.

De toute façon, le rôle du facteur trophique semble double. On note une action sur les tout premiers stades, au moment de l'édification du blastème. Pour CHAPRON (1969 b), le facteur agirait en détruisant le bouchon cicatriciel. Mais d'autre part, l'apport de substance trophique, tardivement, à partir du 9<sup>e</sup> jour après l'opération, influence nettement le profil de la courbe de croissance des régénérats. Ceux-ci ont une taille moyenne supérieure à celle des témoins. La substance trophique agit donc sur l'augmentation du nombre de métamères, donc la croissance du régénérat.

Cette action trophique est à distinguer nettement de l'induction. Nous avons pu mettre en évidence un tel phénomène au cours de la régénération du pharynx ; le cerveau est responsable de cette induction.

De nouveaux problèmes se posent. En particulier il faudrait savoir d'une part sur quels tissus du blastème les facteurs trophique et inhibiteur agissent, et d'autre part quelles cellules sont responsables de leur élaboration. C'est ce que nous allons envisager dans la seconde partie de notre travail.

DEUXIEME PARTIE

ACTION DES SUBSTANCES INHIBITRICES SPECIFIQUES

SUR LE BLASTEME DE REGENERATION

(Etude histologique)

Les substances inhibitrices spécifiques, dont nous venons de montrer l'existence, empêchent(in vitro) ou tout au moins retardent (in vivo) la formation d'un bourgeon de régénération. Le contrôle histologique des séries de culture nous a permis de constater, dans tous les cas où la régénération était inhibée, la présence d'un bouchon cicatriciel.

Le problème essentiel est donc de connaître non seulement la phase du mécanisme de la régénération sensible à l'action de cet inhibiteur, mais aussi de trouver quels éléments du blastème voient leur évolution entravée par cette substance. D'autre part, l'analyse expérimentale a bien montré le rôle d'une substance trophique d'origine nerveuse, au moins en ce qui concerne la régénération céphalique. Il importe donc aussi de rechercher quelles sont les phases qui dépendent de ce facteur.

Pour essayer de résoudre ces problèmes, il nous a semblé nécessaire, dans un premier temps, d'étudier plus en détail les différentes régions du bouchon cicatriciel, encore présent trois semaines ou un mois après la mise en culture. On a vu, au cours de l'étude in vivo, que si l'on fournit à un ver, plusieurs jours après l'amputation de la tête, la substance inhibitrice, ce facteur est inefficace. Il agit donc dans les tout premiers stades de la mise en place du blastème de régénération. Nous étudierons ensuite l'action des substances inhibitrices sur les premières phases de la régénération et nous la comparerons à celle des substances trophiques.

Chapitre 1

LE BOUCHON CICATRICIEL CHEZ LES VERS INHIBES

Etude histologique des tronçons 8-13 en culture

L'observation histologique a porté sur une quarantaine de tronçons 8-13, cultivés pendant 3-4 semaines en présence de l'inhibiteur céphalique et n'ayant pas régénéré.

Le plus souvent, le broyat de la région céphalique entière, ne permet pas de néoformation (1° partie, ch. 1), même très incomplète. Néanmoins, on note, dans tous ces cas, une cicatrisation de la plaie. Il se forme un bouchon cicatriciel (bc. Pl. VI, fig. a), constitué par un amas, souvent très épais (Pl. VI, fig. b) de coelomocytes (c) : leucocytes de différents types et chloragocytes (A.M. BOUC-LASSALLE, 1968). Mêlés à ces éléments, on trouve des sarcolytes (s) provenant de la musculature lésée par la section. Le tube digestif est généralement fermé par pincement de son front antérieur. La partie distale endodermique y est très amincie, formant un "épithélium interne" (CHAPRON, 1969 a). Dans quelques cas, l'oesophage ne s'est pas refermé (Pl. VI, fig. c, flèche) ; toutefois, un bouchon cicatriciel (bc) obture la plaie. La surface externe du bouchon cicatriciel est le plus souvent recouverte (Pl. VI, fig. a), mais pas toujours (Pl. VI, fig. b, flèche) par un épithélium cicatriciel (ec). Quand il existe, cet épithélium demeure peu épais, lâche, constitué par des cellules aplaties et allongées transversalement (Pl. VI, fig. d). Nous n'avons généralement trouvé que très peu de lacunes sanguines entre les éléments du bouchon. Lorsque ce bouchon cicatriciel est ainsi très primitif, la section de la chaîne nerveuse est assez nette, sans présenter de prolongements de fibres en direction du tissu cicatriciel (Pl. VI, fig. c). Dans les cas contraires, c'est-à-dire lorsque le bouchon semble plus évolué, avec un épithélium externe relativement haut, l'extrémité distale de la chaîne ventrale est amincie et dirige quelques faisceaux de fibres vers la base de l'empilement des coelomocytes.

Le bouchon cicatriciel obtenu dans ces conditions d'inhibition est tout à fait comparable à celui qui se forme lors de la régénération normale, à un stade très précoce, et décrit par CHAPRON (1964, 1969 a, 1970 a). On y trouve les mêmes constituants. Toutefois, en présence d'inhibiteur, on peut noter que l'épaisseur de coelomocytes est beaucoup moins constante que chez les témoins. De plus, la présence de sarcolytes (s, sur la Planche VI), pendant un temps aussi long, laisse penser que l'action phagocytaire des chloragocytes a été moins efficace que chez les témoins. Il se pourrait, bien sûr, que ces sarcolytes proviennent d'une dégénérescence secondaire de la musculature des tronçons. Mais aucun symptôme de nécrose n'est décelable par ailleurs dans les différents tissus des explants. Il semble donc que les processus de régénération demeurent bloqués au stade du bouchon cicatriciel, stade normalement transitoire.

D'autre part, le fait que les lacunes sanguines, indices d'une dégénérescence du bouchon, soient très rares laisse penser que l'histolyse des éléments cicatriciel ne s'effectue pas.

Il est donc nécessaire d'étudier la formation du bouchon cicatriciel et sa destinée en présence d'inhibiteur. Pour cela, il est évidemment indispensable de s'adresser à l'expérimentation "in vivo" qui, nous l'avons vu précédemment (1<sup>o</sup> Partie, Ch. 4), retarde le processus de la régénération sans l'empêcher totalement. Les phénomènes risquent donc de pouvoir être analysés plus commodément grâce à ce "ralenti".

L'étude histologique a été faite sur de jeunes régénérats, fixés à intervalles réguliers. Ausitôt après l'opération - décapitation ou amputation à l'intersegment 50/51 -, les vers reçoivent une injection intracoelomique de l'homogénat contenant le facteur inhibiteur. Les injections sont répétées toutes les 24 heures.

TABLEAU XIV

CHRONOLOGIE DES DIFFERENTS STADES DE LA REGENERATION  
CHEZ LES TEMOINS (D'après CHAPRON, 1969 a)

STADE	Temps après l'opération	Caractéristiques histologiques	Remarques (Observations personnelles)
I	0 - 5 h	Contraction du front de section. Retrait du tube digestif.	Nos observations ont été faites à 6 h et 12 h. Ce léger décalage ne change rien à la chronologie des stades I et II.
II	5 - 10 h	Formation d'un anneau cicatriciel. Epiderme et épithélium digestif se prolongent en formant respectivement un "épithélium superficiel" et un "épithélium interne"	
III	10 - 48 h	L'anneau cicatriciel se transforme en bouchon cicatriciel. Le front de section est entièrement recouvert par l'épithélium superficiel, tandis que le tube digestif se ferme en cul de sac.	
IV	2 - 3 j	Début de l'histolyse du bouchon cicatriciel. Des fibres nerveuses apparaissent, en continuité avec la chaîne nerveuse ancienne.	
V	3 - 5 j	Dégénérescence du bouchon cicatriciel. Flaque sanguine dans le blastème.	Apparition des premières mitoses
VI	5 - 7 j	Différenciations de cellules nerveuses à partir de l'épithélium superficiel. Invasion du stomodeum.	Mitoses dans l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme.
VII	7 - 9 j	Système nerveux différencié. Apparition des fibres musculaires circulaires et longitudinales. Accolement du fond du stomodeum contre l'extrémité du tube digestif aveugle. La solution de continuité disparaît par la suite.	Très nombreuses mitoses dans tous les tissus.
VIII	9 - 11 j	Organisation du pharynx. L'épiblaste se subdivise.	
IX	11 - 13 j	Les trois premiers métamères sont formés. Cerveau en position définitive dans le 3 <sup>e</sup> segment.	
X	à partir du 13 <sup>e</sup> jour	Pharynx fonctionnel. Le régénérat s'accroît rapidement.	



Chapitre 2

LES PREMIERS STADES DE LA REGENERATION ANTERIEURE

(Etude in vivo)

Trois lots de vers sont constitués. Ils sont tous décapités, c'est-à-dire amputés de leurs sept premiers métamères. Les vers du premier lot reçoivent chacun la dose de 5  $\mu$ l d'homogénat de têtes ; ceux du second, 5  $\mu$ l de broyat de queues. Le troisième lot sert de témoin. Plusieurs individus (4 à 7) de chaque lot sont fixés aux temps suivants après l'opération : 3, 6, 12, 18, 24, 36 heures, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 15 jours. Les coupes sont colorées au glychémalun de Mayer ou suivant la technique de Clark.

1 - Chronologie des différentes phases de la régénération chez les témoins

CHAPRON (1969 a) a décrit le développement des régénérats normaux au niveau 8/9. Nous rappelons brièvement les caractéristiques des 10 stades qu'il a déterminés dans le Tableau XIV.

Nos observations microscopiques des vers témoins, fixés à intervalles réguliers, bien qu'amputés à l'intersegment 7/8 au lieu du 8/9, confirment les constatations de CHAPRON. Aussi utiliserons-nous sa chronologie comme référence, en envisageant les modifications subies par les régénérats à la suite de l'action de la substance inhibitrice d'origine céphalique.

On peut remarquer, avec cet auteur, que durant les trois premiers jours, la mise en place du blastème s'effectue uniquement par des déplacements de tissus, sans aucune division cellulaire. Nous n'avons observé, en effet, de mitoses qu'à partir du 4<sup>e</sup> jour (stade V) ; leur nombre ne devient important qu'aux stades suivants (VI et surtout VII). Au cours de ce dernier stade nous avons distingué des figures mitotiques dans le feuillet ecto-neural, l'endoderme (tube digestif ancien) et le mésoderme.

Sur la base de cette chronologie des différents stades de la régénération normale, nous pouvons étudier l'évolution des blastèmes lorsqu'ils sont soumis à l'action de l'inhibition céphalique.

Figure 21 - Régénération céphalique. Concordances entre les stades de la régénération chez les témoins (au milieu), les vers ayant reçu du broyat de têtes (en haut : Br. têtes) et ceux ayant reçu du broyat de queues (~~en bas~~ : Br. queues). En abscisses, le temps en jours.

On peut noter que les deux premiers stades ont constamment la même durée. Le broyat de têtes provoque un allongement de la durée des stades III, IV et V, tandis que l'homogénéat de queues raccourcit les stades V et VI.

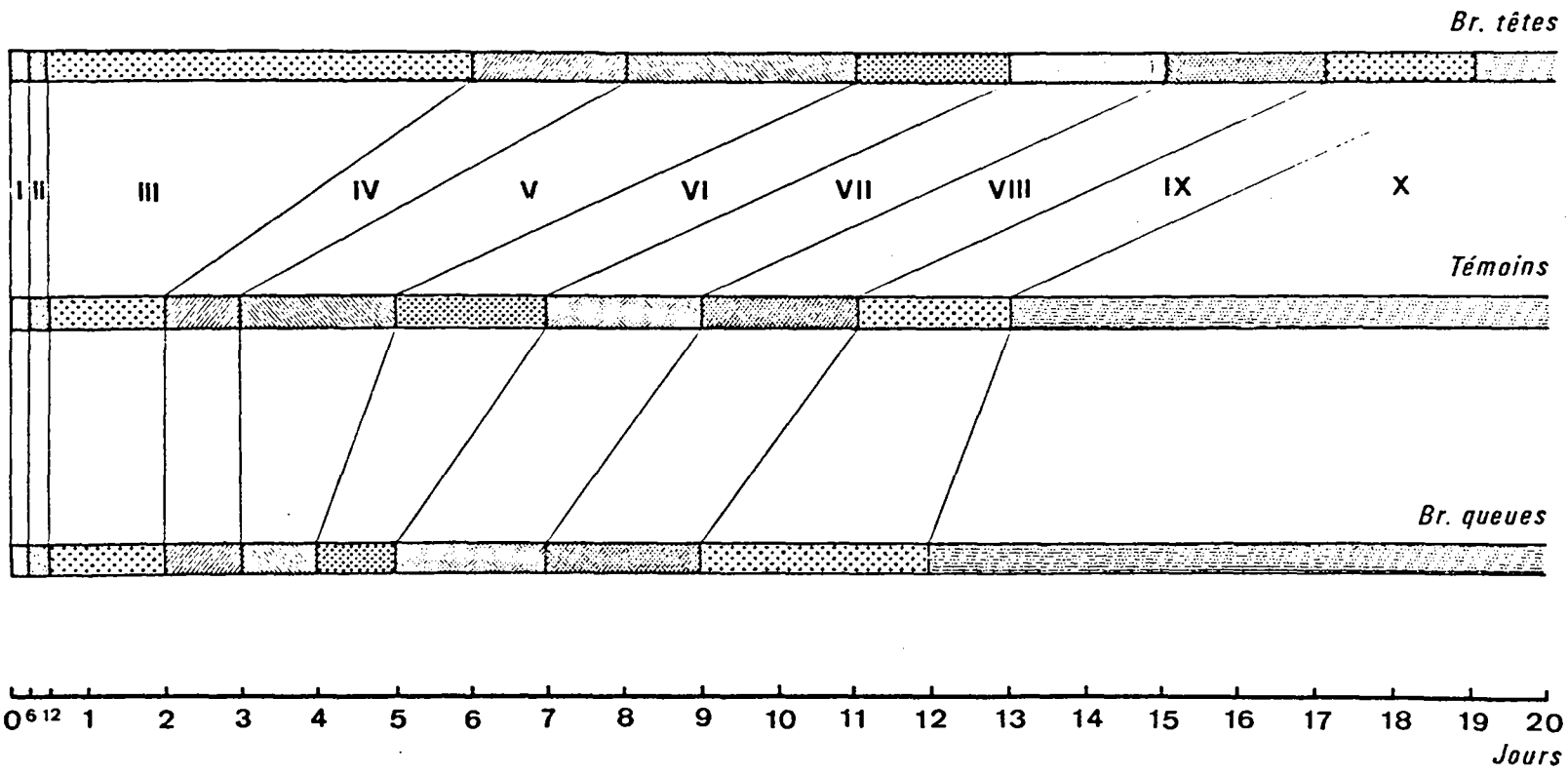




TABLEAU XV

COMPARAISON ENTRE LES EVOLUTIONS CHRONOLOGIQUES EN PRESENCE  
OU EN L'ABSENCE (TEMOINS) D'HOMOGENATS DE TETES OU DE QUEUES

STADES	Age chez les témoins	Broyat de têtes		Broyat de queues	
		Age	Remarques	Age	Remarques
I	0 - 6 h <sup>(1)</sup>	0 - 6 h <sup>(1)</sup>	Formation du bouchon cicatriciel. Le tube digestif demeure souvent ouvert. Le bouchon cicatriciel ne montre aucune évolution pendant longtemps.	0 - 6 h	Evolution synchrone avec les témoins.
II	6 - 12 h <sup>(1)</sup>	6 - 12 h <sup>(1)</sup>		6 - 12 h	
III	12 - 48 h	12 h - 6 j		12 - 48 h	
IV	2 - 3 j	6 - 8 j	2 - 3 j		
V	3 - 5 j	8 - 11 j	Début de l'histolyse du bouchon cicatriciel.	3 - 4 j	Durée de chacun des stades deux fois plus courte que chez les témoins. Mitoses plus précoces.
VI	5 - 7 j	11 - 13 j		4 - 5 j	
VII	7 - 9 j	13 - 15 j		5 - 7 j	
VIII	9 - 11 j	15 - 17 j	Subdivision de l'épiblaste.	7 - 9 j	
IX	11 - 13 j	17 - 19 j	Formation des trois premiers métamères, visibles à la loupe.	9 - 12 j	Léger ralentissement de la vitesse de régénération.
X	à partir du 13° j	à partir du 19° j	Croissance du régénérat. Taille définitive inférieure à celle des témoins.	à partir du 12° j	Taille définitive supérieure à celle des témoins.

(1) : La différence entre les âges des témoins et ceux de la référence du tableau précédent provient du décalage dans les heures de nos fixations. Elle ne modifie toutefois en rien l'évolution chronologique générale.

## 2 - Mise en place et évolution du bourgeon de régénération en présence de broyat de têtes

Nous avons établi dans le Tableau XV une comparaison entre l'évolution de ces vers et celle des témoins. Le graphique (Fig. 21) montre la concordance entre les durées de chacun des stades pour les témoins et les vers injectés.

La Planche VII présente quelques étapes de la régénération chez les vers témoins. Chez les vers injectés, dès les premières heures (12 h à 48 h) après l'opération un bouchon cicatriciel obture la plaie. Il est constitué, comme chez les témoins, par les différents éléments figurés du liquide coelomique et par les sarcolytes résultant de la lésion des fibres musculaires, circulaires et longitudinales, au cours de l'opération. Ce bouchon, formation normalement provisoire, persiste sous cette forme pendant 6 ou 7 jours (Pl. VIII, figs b et c), mais peut demeurer plus longtemps. L'épithélium cicatriciel qui le recouvre n'est souvent qu'un mince liseré de cellules et cela pendant plusieurs jours (jusqu'à 6 jours). Dans quelques cas, nous avons pu observer un décollement de cet épithélium (Pl. VIII, fig. b).

Le tube digestif se referme normalement au bout de 24 à 48 h (stade III). Or nous avons souvent rencontré des vers, opérés depuis 4, 5, ou 6 jours dont l'oesophage demeurerait ouvert (Pl. VIII, figs a, c et e).

La chaîne nerveuse présente (Pl. VIII, figs a, c, d) un front de section encore net le 4<sup>o</sup> ou même le 6<sup>o</sup> jour, alors que chez les témoins (Pl. VII, fig. d), dès le stade IV (2 à 3 jours après l'opération), des fibres nerveuses la prolongent en direction du bouchon cicatriciel. D'autre part, du 2<sup>o</sup> au 4<sup>o</sup> jour, un certain nombre de vers injectés présentent des modifications de structure. Les neurones, dans quelques segments distaux tendent à s'arrondir et à s'isoler tandis que le neuropile devient plus ou moins lacuneux (Pl. VIII, fig. f). Nous sommes donc en présence d'un phénomène de dégénérescence. Nous pouvons toutefois remarquer que cette dégénérescence n'est visible qu'au niveau du tissu nerveux ventral. Les autres tissus ne montrent aucun signe de pycnose. A partir du 5<sup>o</sup> ou 6<sup>o</sup> jour, on ne retrouve plus de tels aspects et la chaîne nerveuse conserve son intégrité. Vers le 7<sup>o</sup> ou le 8<sup>o</sup> jour apparaissent les fibres prolongeant la chaîne nerveuse ancienne en direction du bourgeon, cependant que débute l'histolyse du bouchon cicatriciel. La phase de dégradation est

nettement plus longue que chez les témoins. En effet, les premières mitoses, qui marquent le début de la prolifération des tissus du régénérat, et par là même la fin de la phase de "prérégénération", suivant la terminologie de CHAPRON, n'apparaissent que vers le 10<sup>e</sup> jour. Il s'agit donc d'un retard d'environ une semaine dans le déroulement des phénomènes de cette prérégénération.

Cette étude de l'action de l'inhibiteur demande toutefois à être complétée par l'observation des effets de la substance trophique d'origine caudale. On a vu en effet (1<sup>e</sup> Partie, Chapitre 4) que cette substance permet une accélération de la régénération.

### 3 - Evolution du blastème en présence du broyat de queues

Le Tableau XV résume cette évolution en regard de celle des témoins. Les durées de chaque stade sont d'autre part reportées sur la Figure 21.

Les quatre premiers stades se déroulent d'une façon rigoureusement synchrone avec les témoins. Dès le cinquième stade, on peut noter une accélération du processus d'histolyse du bouchon cicatriciel. Celui-ci dégénère environ deux fois plus vite que chez les témoins. D'autre part, un nombre important de mitoses apparaît plus précocement.

Les stades VII et VIII paraissent avoir la même durée que chez les témoins. Mais, par suite de l'histolyse plus rapide du bouchon cicatriciel, le blastème a gagné deux jours sur les témoins. Un fait, qu'il est intéressant de souligner, se produit au cours du stade IX : la vitesse de régénération semble un peu ralentir. Les subdivisions de "l'épiblaste" amenant la formation des trois premiers métamères sont légèrement plus lentes en moyenne à se former. Ce stade dure trois jours au lieu de deux. Le régénérat conserve toutefois une avance de un jour par rapport aux témoins.

A partir du 12<sup>e</sup> jour, le régénérat va croître rapidement et les tailles définitives seront en moyenne plus importantes que chez les témoins, ainsi que nous l'avons noté dans la première partie.

### Conclusion

L'étude comparative de l'évolution des différents lots montre que certains stades sont particulièrement sensibles à l'action des substances injectées. En particulier, les durées des stades III, IV et V sont allongées en présence du facteur inhibiteur. En revanche, les stades V et VI sont plus courts lorsqu'on soumet les opérés à l'influence de la substance trophique, présente dans les queues. Or, si l'on se réfère au Tableau XIV, on voit que le stade V correspond à l'histolyse du bouchon cicatriciel. L'extrait de tête paraît donc retarder nettement cette histolyse : la durée plus grande des stades III et IV, caractérisés par la présence de cette formation particulière, le prouve. L'histolyse, au stade V, s'effectue tout de même, mais plus lentement que chez les témoins. Au contraire, l'extrait de queue réduit la durée de l'histolyse (stade V).

Ces observations confirment donc les expériences de CHAPRON (1969 a) qui en concluait que la chaîne nerveuse -et donc la substance trophique- agirait sur la régénération "par l'intermédiaire de l'histolyse du bouchon cicatriciel".

Cependant le rôle de la substance trophique ne doit pas se borner à cette histolyse. Le fait que la taille moyenne des régénérats soit plus grande dans ce cas que chez les témoins laisse penser que ce facteur agit aussi plus tard, en particulier au stade X, au cours duquel s'effectue l'accroissement du nombre de métamères.

Par conséquent, l'inhibition semble porter sur la substance trophique et non pas directement sur les tissus du blastème. Les coelomocytes viennent, dans tous les cas, assurer l'étanchéité de la plaie : les stades I et II ont partout la même durée. Le facteur assurant la mobilisation des cellules coelomiques n'est donc pas contrarié par la substance inhibitrice.

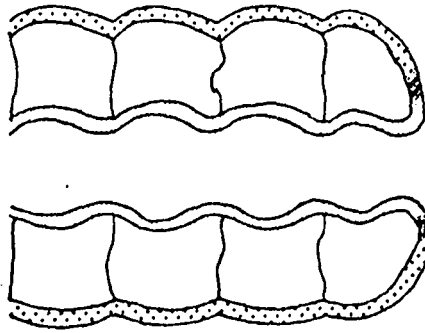
D'autre part, les mitoses, qui apparaissent à partir du 3<sup>e</sup> jour chez les témoins (stades V, VI et VII) ne semblent pas du tout bloquées par l'inhibiteur : la durée des stades VI et VII est la même dans tous les cas.

Au total, il semble donc bien que la substance inhibitrice aille contrarier le facteur trophique et par là-même empêcher, malgré une cicatrisation apparemment normale, le déroulement correct de la formation du blastème. Il faut aussi rappeler que la chaîne nerveuse paraît particulièrement sensible à l'action du broyat de têtes, justement pendant la période correspondant au début de l'histolyse.

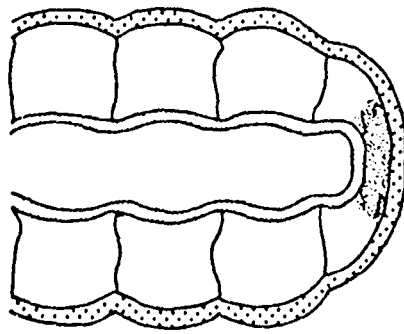
Le problème se pose alors de savoir à quel niveau sera inhibé le facteur trophique. C'est ce que nous envisagerons dans un chapitre ultérieur après avoir étudié la régénération caudale.



Figure 22 - Modalités de la fermeture de la plaie chez E. foetida, lors de la régénération caudale. Le type "clos" nécessite la formation d'un bouchon cicatriciel (en grisé), recouvert par un épithélium cicatriciel. Dans le type "ouvert", épiderme et épithélium intestinal s'affrontent, reformant un anus.



type "ouvert"



type "clos"

### Chapitre 3

#### LES PREMIERS STADES DE LA REGENERATION CAUDALE

Les expériences in vivo nous ont montré que la régénération caudale pouvait être inhibée, elle aussi, par un facteur contenu dans la queue (1° Partie, ch. 5). Il était donc intéressant d'étudier histologiquement les modifications que ce facteur apportait au déroulement des processus de mise en place et d'évolution du blastème, de façon à pouvoir les comparer avec celles obtenues dans la régénération antérieure.

Ces expériences sont donc homologues de celles réalisées au chapitre précédent. L'amputation de la queue est réalisée à l'intersegment 50/51. Un premier lot reçoit du broyat de queues toutes les 24 heures (5 µl à chaque injection). Au deuxième, est injecté l'homogénat de têtes dans les mêmes conditions. Le troisième lot groupe les vers témoins, régénérant normalement. Les fixations simultanées de plusieurs individus ont lieu aux mêmes intervalles de temps que précédemment (Chapitre 2).

##### 1 - Les différentes étapes de la régénération chez les témoins

A notre connaissance, aucune table chronologique des manifestations histologiques de la régénération postérieure n'a été publiée. Nous avons donc analysé les premières phases de cette régénération en observant, sur les préparations microscopiques, l'évolution du front de section à différents temps chez des vers n'ayant reçu aucune injection (témoins). Nous avons pu ainsi décrire 8 stades à peu près analogues à ceux observés au cours de la régénération céphalique.

On sait (AVEL, 1959) que, chez les Oligochètes, la fermeture de la plaie peut s'opérer suivant deux modalités (Fig. 22) :

- Type 1 : "clos" : Les coelomocytes s'accumulent au niveau de l'amputation et constituent un bouchon cicatriciel recouvert par un épithélium externe dont les cellules proviennent de l'épiderme ancien. Les lèvres de l'intestin se rapprochent, par contraction de la musculature propre de l'organe, tandis qu'un épithélium interne ferme en cul-de-sac le tube digestif. Ce type clos est donc analogue à celui observé au cours de la régénération céphalique.

Figure 23 - Schémas représentant les 8 stades du développement d'un régénérat caudal au niveau 50/51.

La figure du haut représente l'animal au moment de la section.

Sur la partie gauche, sont représentés les stades (I à VI) de la régénération dans le type "clos". La succession de ces stades est indiquée par des flèches en trait continu.

Sur la partie droite, se trouvent les stades correspondants dans le type "ouvert". La succession est alors indiquée par des flèches en pointillé.

Les deux derniers stades (VII et VIII), communs aux deux modalités, sont dessinés au bas de la figure. La succession y est indiquée par deux flèches parallèles (trait continu et pointillé).

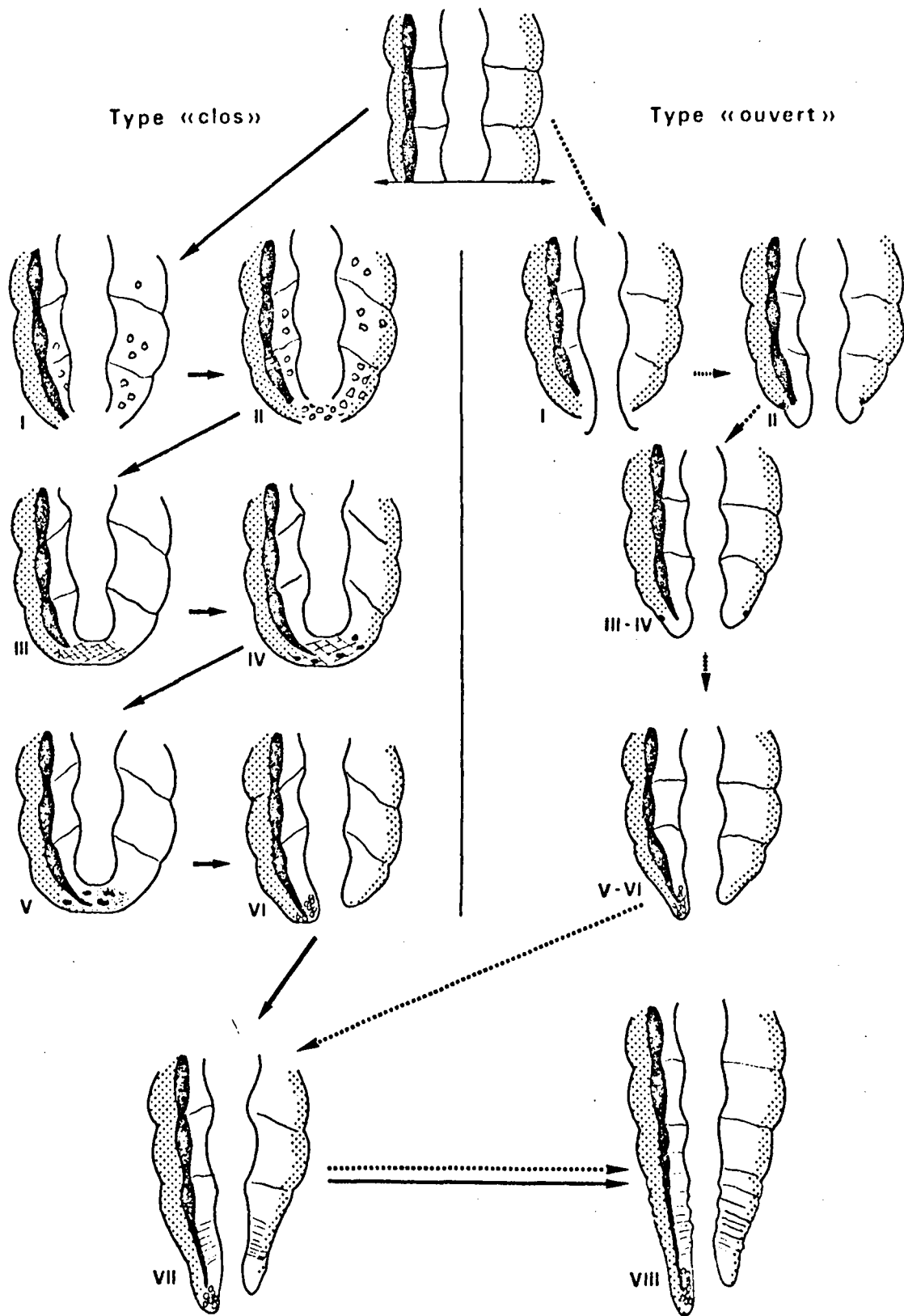


TABLEAU XVI

CHRONOLOGIE DES DIFFERENTS STADES DE LA  
REGENERATION CAUDALE (TEMOINS)

Stade	Temps après l'opération	Caractéristiques histologiques	
I	0 - 3 h	Contraction plus ou moins importante du front de section. Mobilisation des coelomocytes. Contraction et retrait du tube digestif.	Le tube digestif s'extorverse plus ou moins.
II	3 - 6 h	Formation d'un anneau cicatriciel. Glissement des cellules ecto et endodermiques.	Affrontement de l'épiderme et de l'épithélium intestinal. A ce niveau, formation d'un cal.
III	6 - 24 h	Bouchon cicatriciel complet recouvert par l'épithélium externe. Le tube digestif est complètement fermé par l'épithélium interne. Des fibres nerveuses apparaissent dans le prolongement de la CN ancienne vers le B.C.	Retrait progressif du tube digestif jusqu'au niveau du front de section. Un "anus" fonctionnel demeure.
IV	24 - 48 h	Début de l'histolyse du bouchon cicatriciel. Les fibres nerveuses sont nombreuses. Rares flaques sanguines en position latérale.	
V	2 - 5 j	Destruction du bouchon cicatriciel.	Epaississement de l'épithélium cicatriciel (dorsalement surtout)
VI	5 - 7 j	Invagination du proctodaeum. Ouverture de l'anus.  Formation du pygidium sous forme d'un bourrelet ectodermique rempli ventralement : massif cellulaire plein. Apparition des premières mitoses dans l'ectoderme. Quelques cellules méso face ventrale.	
VII	7 - 10 j	Organisation de la zone subterminale d'allongement. Le bourgeon a grandi en taille et des dissépiments néoformés sont visibles. Cette métamérisation n'est pas encore visible généralement de l'extérieur.	
VIII	à partir du 10 <sup>e</sup> j.	Formation des nouveaux segments.	



- Type 2 : "ouvert" : Le tube digestif ne se contracte pas et, au contraire, à tendance à s'extroverser. Ses bords se soudent directement à l'épiderme. Il n'y a donc pas formation d'un bouchon cicatriciel.

Nous avons rencontré les deux types d'oblitération du front de section, chez Eisenia foetida au niveau de l'intersegment 50/51. Dans les deux cas, il y a la même formation d'un pygidium, précédé d'une zone subterminale d'accroissement qui bourgeonne les nouveaux segments. Ce résultat est atteint, quel que soit le mode de cicatrisation, dix jours en moyenne après l'amputation.

a) Chronologie des différents stades de la régénération dans le type "clos" (Fig. 23)

Dans les trois heures qui suivent l'amputation en arrière du 50° segment, on note une contraction plus ou moins importante du front de section (Pl. IX, fig. a), diminuant ainsi la surface de la plaie. Le tube digestif est, dans un premier temps, pincé par les lèvres de la paroi du corps (Pl. IX, fig. a) ; puis il se rétracte en direction proximale (Pl. IX, fig. b). Simultanément on observe une mobilisation des coelomocytes (Pl. IX, fig. c) qui apparaissent de plus en plus nombreux dans les métamères proches de la blessure (stade I).

Au cours des trois heures suivantes (3h à 6h après l'opération) les coelomocytes se placent au niveau de la section déjà resserrée en formant un bouchon cicatriciel (Pl. IX, fig. b). Simultanément des cellules épidermiques de la paroi du corps glissent au-dessus de ce bouchon pour former un "épithélium externe" (Pl. IX, fig. d), analogue à celui décrit lors de la régénération céphalique. De même, les lèvres de l'intestin se rejoignent, par contraction des fibres de la musculature de cet organe, et se soudent. Le tube digestif se ferme ainsi en cul-de-sac (Pl. X, fig. a, flèche). Quelquefois sa fermeture est assurée par un glissement des cellules intestinales formant un "épithélium interne" analogue à celui observé dans la régénération antérieure. Nous avons appelé cette période : stade II.

Entre la 6° et la 24° heure après la résection de la "queue", se situe le stade III. Il est caractérisé par l'épaississement du bouchon cicatriciel : les coelomocytes, de plus en plus nombreux, sont tassés, donnant un aspect de feutrage à la cicatrice (Pl. X, fig. b). Entre les cellules coelomiques, on peut retrouver d'assez nombreux sarcolytes pro-

venant de la désorganisation de la musculature pariétale, lésée par la coupure. L'épithélium externe sécrète une nouvelle cuticule, assurant la fermeture complète de la blessure. A l'extrémité distale de la chaîne nerveuse, apparaissent des fibres nerveuses, dans le prolongement des fibres anciennes, et en direction du bouchon cicatriciel.

A partir de la 24<sup>o</sup> heure et jusqu'à la 48<sup>o</sup>, les fibres nerveuses sont de plus en plus nombreuses et atteignent le bouchon cicatriciel. La chaîne ventrale prend une forme conique (Pl. X, fig. c). L'irrigation du bouchon cicatriciel est assurée par de fins capillaires de plus en plus nombreux, tandis que quelques rares flaques sanguines sont visibles à la périphérie de ce bouchon (ls sur la Pl. X, fig. d). Cette phase représente le stade IV.

Deux jours après la section, commence la résorption du bouchon cicatriciel. Cette phase (Stade V) est assez longue et dure jusqu'au 5<sup>o</sup> jour (Pl. XI, figs a et b). Le bouchon diminue progressivement d'épaisseur tandis que se multiplient les lacunes et les flaques sanguines.

Entre le 5<sup>o</sup> et le 7<sup>o</sup> jour va se former le pygidium : Stade VI. Le bouchon cicatriciel est presque complètement résorbé. Un proctodæum, très court, constitué par l'épithélium externe s'invagine et s'abouche au tube digestif. Les cellules épithéliales se tassent davantage à la face ventrale qu'à la face dorsale. Il en résulte que le pygidium est constitué par un petit bourrelet (Pl. XI, fig. c) plus épais ventralement. Au dessous de cet épithélium et à la face ventrale, parmi les restes du bouchon cicatriciel se mettent en place des cellules mésodermiques assez volumineuses, ovoïdes, à noyau globuleux contenant un gros nucléole (Pl. XI, fig. d). A la fin de ce stade (7<sup>o</sup> jour) apparaissent les premières mitoses dans l'ectoderme (épithélium pygidial essentiellement).

Le stade VII est caractérisé par la mise en place de la zone subterminale d'allongement. Il dure du 7<sup>o</sup> au 10<sup>o</sup> jour. Le bourgeon a grandi en longueur et des dissépiments de néoformation sont visibles dans le régénérat sur coupes histologiques. Toutefois cette métamérisation n'est pas encore repérable généralement de l'extérieur sur l'animal vivant. Des mitoses peuvent être observées dans tous les feuillets.

A partir du 10<sup>o</sup> jour, les nouveaux segments se forment régulièrement et peuvent alors être comptés in vivo. C'est la dernière phase de la régénération : stade VIII.



b) Chronologie de la régénération suivant le type "ouvert"  
(Figure 23)

Stade I : (0-3 h) Comme précédemment on note une contraction de la paroi du corps allant jusqu'à pincer le tube digestif. Celui-ci fait saillie à l'extérieur et son épithélium s'extroverse légèrement (Pl. XII, figs a et b). Des coelomocytes sont visibles en assez grand nombre dans les segments proches du front de section (Pl. XII, figs c et d).

Stade II : De 3 à 6 heures après la section, l'épiderme et l'épithélium intestinal s'affrontent et se soudent (Pl. XII, figs e et f). A ce niveau, il y a souvent, mais pas nécessairement, formation d'un petit cal cicatriciel, provenant du tassement des cellules (fig. f). Au niveau de l'affrontement s'accumulent des coelomocytes assurant un colmatage total de la plaie.

Stades III et IV : Entre la 6<sup>o</sup> heure et la 48<sup>o</sup> heure on remarque peu de changements au niveau de la section. Le tube digestif, qui faisait hernie à l'extérieur, se contracte et se retire progressivement à l'intérieur du corps, jusqu'au niveau du front de section (Pl. XIII, fig. a). Pendant toute cette période un "anus" fonctionnel demeure.

Stade V : Pendant ce laps de temps (2 à 5 jours), l'épithélium cicatriciel constitué au niveau de la soudure s'épaissit légèrement : les cellules deviennent plus hautes et plus serrées (Pl. XIII, fig. b). Aucune mitose n'est visible pendant ce stade, ce qui laisse supposer que ces cellules proviennent du glissement de celles de l'épithélium ancien.

Stade VI (5 à 7 j) : L'épithélium est plus épais, surtout ventralement, et donne un pygidium analogue à celui formé dans le type clos.

Les stades VII et VIII sont en tout point comparables à ceux observés dans le mode précédent.

c) Discussion

CHAPRON (1970 b) a donné une explication séduisante à ces deux modes de fermeture de la plaie. Pour cet auteur, en effet, la blessure serait fermée suivant le type clos lorsque l'intestin postérieur endodermique affleure au front de section. Le type ouvert interviendrait lorsque la section est effectuée dans le proctodeum, d'origine ectodermique, région tout à fait postérieure du corps. Or, bien que la longueur du

proctodeum soit très variable et, chez 80 % des vers supérieures à 10 segments, il ne semble pas que l'on puisse admettre sa présence à un niveau aussi antérieur que le 50° segment. Il est donc vraisemblable que d'autres facteurs interviennent pour déterminer le mode de cicatrisation, car nous avons rencontré les deux types à l'intersegment 50/51 avec 20 % environ de type ouvert.

Au cours de nos observations nous avons pu remarquer que, lorsque le dernier dissépiment (50/51) demeurait dans la partie postérieure excisée, ou lorsqu'il était lésé par le microscalpel, le 50° métamère était refermé suivant le type clos (Pl. XIII, fig. c : les flèches montrent les ruptures du dissépiment). Par contre, si la section était faite légèrement au-delà de ce dissépiment et si celui-ci conservait par conséquent son intégrité, la plaie était cicatrisée suivant le type ouvert (Pl. XIII, fig. d : les flèches indiquent ici les dissépiments intacts). Il est donc fort possible que le mode de fermeture de la blessure soit déterminé en fin de compte par un simple facteur mécanique : la présence ou l'absence du dernier dissépiment modifie la pression exercée par le liquide coelomique sur le tube digestif et sur la paroi du corps. Les dissépiments étant situés exactement au-dessous de la constriction intersegmentaire, la section a plus de chances de léser le dissépiment que de l'épargner. Ceci expliquerait le faible pourcentage de vers cicatrisant leur blessure suivant le type ouvert.

De toute façon l'examen comparé des différents stades que nous avons décrits dans les deux cas (Tableau XVI) montre que la durée de la régénération est identique, quelque soit le mode de fermeture de la plaie.

## 2 - La régénération chez les vers ayant reçu du broyat de queues

L'observation histologique des vers mis en présence de l'homogénat de queues permet de voir que les deux premiers stades sont tout à fait identiques à ceux de la régénération des témoins. Ils ont même durée (respectivement, de 0 h à 3 h et de 3 h à 6 h après l'amputation) et mêmes manifestations histologiques (contraction du front de section et mobilisation des coelomocytes) (Pl. XIV, fig. a). Notons aussi que, comme chez les témoins, il peut ne pas se former de bouchon cicatriciel, le tube digestif demeurant ouvert et plus ou moins extroversé (Pl. XIV, fig. b).

Le stade suivant (III) est nettement plus long que chez les témoins : il dure jusqu'au deuxième jour inclus. Il semble par ailleurs normal quant aux manifestations histologiques. Le bouchon cicatriciel est formé tandis que le tube digestif se ferme. Nous avons noté toutefois une différence importante : les fibres nerveuses issues de la chaîne ventrale n'apparaissent pas durant cette période (Pl. XIV, fig. c : la flèche montre le front de section de la chaîne nerveuse). Ce n'est qu'au début du stade suivant que ces fibres seront visibles au niveau du front de section.

Le stade IV est lui aussi plus long que chez les témoins : il s'étend du 2° au 4° jour (Pl. XIV, fig. d). L'histolyse du bouchon cicatriciel semble se faire très lentement. Elle paraît cependant normale bien que les flaquas sanguines soient très rares.

A partir du 4° jour débute le stade V. Quoiqu'il ait 48 heures de retard sur les témoins, il a une durée tout à fait normale. Il en est de même pour les stades VI, VII et VIII qui vont se succéder tout à fait régulièrement mais avec un décalage de 48 heures par rapport à l'échelle chronologique établie chez les témoins. Les mouvements histogénétiques qui caractérisent ces trois derniers stades sont observables et se manifestent d'une manière conforme aux témoins.

Il apparaît donc (Tableau XVII et Fig. 24), en présence du broyat de queues inhibiteur, un retard au cours du stade V pendant lequel devrait débiter l'histolyse du bouchon cicatriciel. Celle-ci commençant plus tardivement, il est normal que le stade IV paraisse plus long : le bouchon cicatriciel persiste plus longtemps qu'il ne devrait. Il s'ensuit donc que le phénomène sensible à l'inhibition est bien l'histolyse du bouchon cicatriciel. Mais lorsque le processus d'histolyse a réussi à s'engager, les mécanismes régénérateurs retrouvent leur activité normale sans arriver toutefois à rattraper le retard.

### 3 - La régénération en présence de broyat de têtes

Toutes nos observations histologiques effectuées sur des vers de ce lot montrent (Tableau XVII et Fig. 24) un synchronisme parfait avec l'évolution des individus témoins (Pl. XV). Il semble donc que dans ce cas, on retrouve au niveau histologique nos observations effectuées in vivo (1° Partie, chapitre 5) au cours desquelles nous avons noté que le broyat de têtes n'avait aucune influence favorisante sur la régénération caudale.



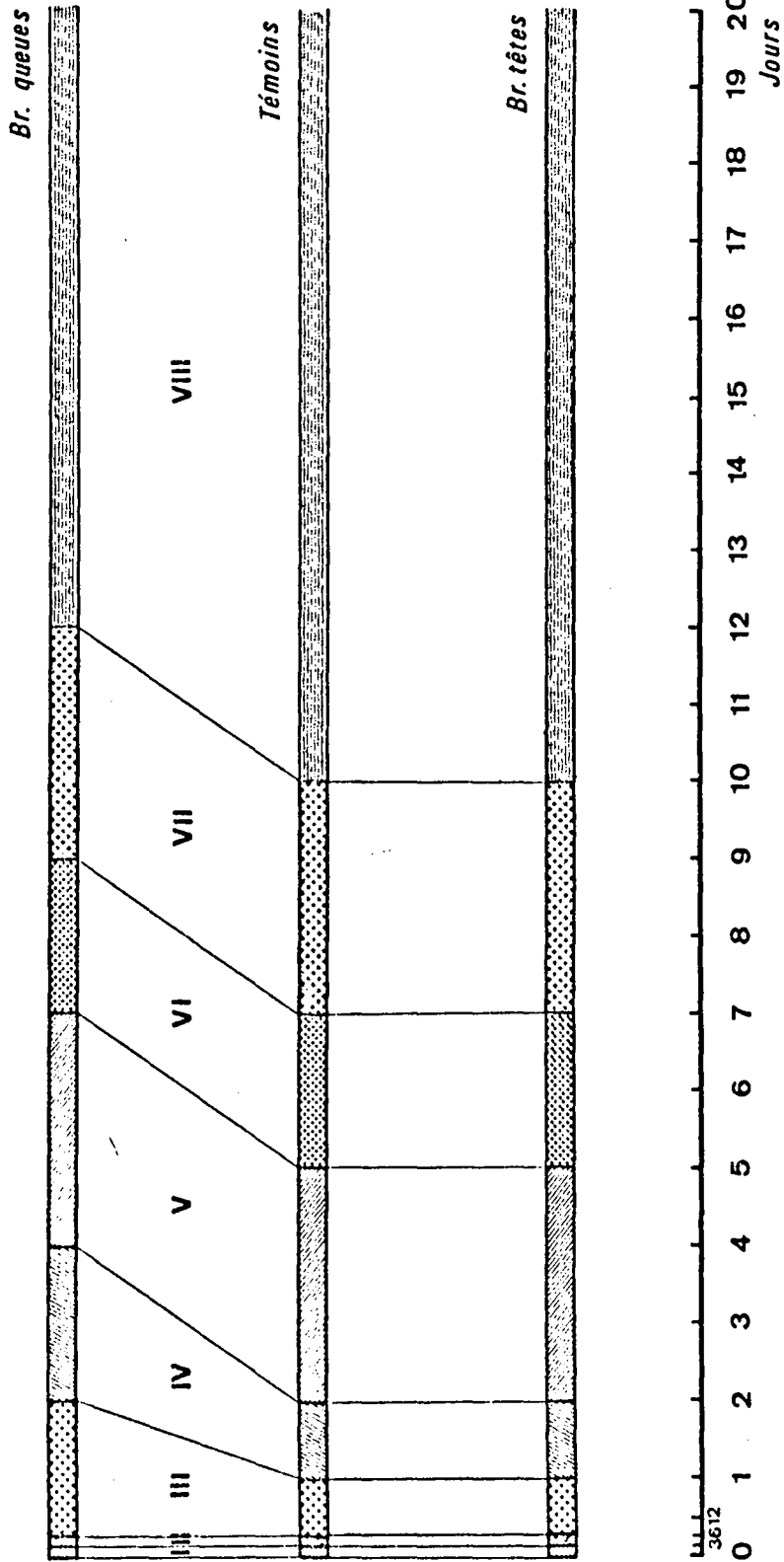
TABLEAU XVII

COMPARAISON ENTRE LES EVOLUTIONS CHRONOLOGIQUES EN PRESENCE  
OU EN L'ABSENCE (TEMOINS) D'HOMOGENATS DE TETES OU DE QUEUES

STADES	Age chez les témoins	Broyat de queues		Broyat de têtes	
		Age	Remarques	Age	Remarques
I	0 - 3 h	0 - 3 h	Identique aux témoins.	0 - 3 h	Identique aux témoins.
II	3 - 6 h	3 - 6 h	Identique aux témoins.	3 - 6 h	
III	6 - 24 h	6 - 48 h	Bouchon cicatriciel épais. Pas de fibres nerveuses prolongeant la chaîne ventrale.	6 - 24 h	
IV	24 - 48 h	48 h - 4 j	Début de l'histolyse qui semble très lente. Les fibres nerveuses apparaissent le 3 <sup>e</sup> jour.	24 - 48 h	
V	2 - 5 j	4 - 7 j	Identique aux témoins.	2 - 5 j	
VI	5 - 7 j	7 - 9 j		5 - 7 j	
VII	7 - 10 j	9 - 12 j		7 - 10 j	
VIII	à partir de 10 j	à partir de 12 j		à partir de 10 j	

Figure 24 - Régénération caudale. Concordances entre les stades de la régénération chez les témoins (au milieu), les vers ayant reçu du broyat de queues (Br. queues, en haut) et ceux ayant reçu du broyat de têtes (Br. têtes, en bas). En abscisses, le temps en jours.

On peut remarquer que seul le broyat de queues modifie la durée de certains stades (les stades III et IV sont allongés).



### Conclusion

L'étude histologique nous a permis de déterminer chez les vers témoins une série chronologique de 8 stades au cours desquels s'effectue la régénération. Cette évolution est symétrique de celle du régénérat céphalique. On peut d'ailleurs remarquer que la formation d'un bourgeon caudal est aussi rapide que la régénération d'une tête. En effet, la reformation du pygidium et de la zone subterminale d'allongement, correspondant aux sept premiers stades, demande 10 jours pour se réaliser. De même, pour qu'apparaisse l'équivalent dans la régénération de la région céphalique amputée, c'est-à-dire la subdivision de l'épiblaste, il faut aussi attendre 10 jours après l'opération.

La régénération postérieure est permise suivant deux modalités à l'intersegment 50/51. Le plus souvent, se forme un bouchon cicatriciel analogue à celui qui se met en place lors de la régénération céphalique. L'apparition du bouchon cicatriciel semble due à la rupture du dissépinement 50/51 ; l'ouverture accidentelle de la cavité générale nécessite son oblitération par des cellules coelomiques libres. Par contre, lorsque le dissépinement est épargné par l'amputation, la régénération peut s'effectuer suivant le type ouvert, ce qui se produit d'ailleurs dans un petit nombre de cas seulement.

L'étude des lots en régénération soumis à un broyat inhibiteur nous a permis de montrer que l'influence inhibitrice s'exerçait sur l'histolysse du bouchon cicatriciel. En effet, la présence d'inhibiteur augmente la durée des stades III et IV, c'est-à-dire respectivement la formation et l'histolysse du bouchon cicatriciel. Dans ce cas, par conséquent, le tissu cicatriciel demeure présent plus longtemps. Ces observations confirment donc les résultats que nous avons précédemment obtenus au sujet de la régénération céphalique.

Mais, contrairement à ce que nous avons pu observer lors de la reformation de la tête en présence de broyat de queues, il n'y a aucune influence favorisante de la part de l'homogénat de têtes. Le facteur trophique qu'il contient, et que nous avons mis en évidence expérimentalement par son action sur la régénération antérieure (1<sup>o</sup> partie, chapitre 4), ne semble pas être efficace dans la régénération caudale. Il y a donc une différence assez notable entre les deux types de régénération, pour ce qui concerne tout au moins l'action du facteur trophique.

## Discussion et Conclusion de la deuxième partie

Le problème posé au début de cette seconde partie était de savoir quand et à quel niveau du blastème s'exerçaient d'une part l'influence de l'inhibiteur spécifique et d'autre part l'action de la substance trophique.

Un premier élément de réponse a pu être fourni par l'analyse histologique. Au cours de la régénération antérieure ou caudale, le bouchon cicatriciel se forme malgré la présence d'inhibiteur. Par contre sa destruction n'a pas lieu in vitro ou est très lente in vivo. C'est donc le stade de l'histolyse de ce tissu qui est sensible à l'inhibiteur. Les stades suivants, au cours desquels se mettent en place et se divisent les éléments du blastème de régénération, ne sont aucunement affectés par cette substance.

Si l'on augmente la concentration en facteur trophique, provenant d'un homogénat de queues, au front de section antérieur, la destruction du bouchon cicatriciel est accélérée. Il semble donc que la substance trophique élaborée par le tissu nerveux ventral agisse sur cette histolyse. Cette observation confirme les résultats de CHAPRON (1969 a, b). Cet auteur a noté en effet au microscope électronique, au stade de l'histolyse du bouchon cicatriciel, dans les fibres issues de la chaîne nerveuse la présence de granules de taille moyenne identique à celle des granules qui existent dans certaines catégories de neurones. Il en avait déduit que ces granules représentaient un neurohumeur à rôle trophique, responsable de la destruction du bouchon cicatriciel.

AVEL (1961) empêche toute régénération céphalique chez Eisenia foetida unicolor, par résection de la chaîne nerveuse. La plaie se ferme par un bouchon cicatriciel à peu près typique qui demeure définitivement sous cette forme, et n'est pas remplacé par un blastème. Chez les vers de la variété typica, cet auteur obtient les mêmes résultats mais dans les 3/4 des cas seulement. De toute façon, les phénomènes produits par ces opérations sont tout à fait comparables à ceux que nous avons obtenus : arrêt du développement au stade du bouchon cicatriciel.

Plus récemment A.M. BOUC-LASSALLE (1968) montre qu'en l'absence d'innervation les plaies de la paroi du corps se cicatrisent mal. Le bouchon cicatriciel se forme lentement et persiste plus longtemps que chez les témoins. L'épiderme et la musculature pariétale régénèrent très mal.



Dans nos expériences, tout se passe donc comme si l'addition de substance inhibitrice équivalait à la suppression de l'innervation de la région du front de section.

Un problème reste cependant en suspens : le facteur trophique apporté par un homogénat d'origine céphalique, capable pourtant d'accélérer la régénération antérieure, n'a aucune action décelable à l'observation microscopique ou in vivo sur la régénération caudale. On constate donc une différence<sup>nette</sup> entre les deux directions de régénération. Il est possible que les tissus de la base du régénérat, au niveau du 50° segment, ne soient pas compétents vis à vis de cette substance stimulatrice.

Toujours est-il que le facteur trophique intervient, dans le déroulement de la régénération normale, sur l'histolyse du bouchon cicatriciel, au moins en cas de régénération céphalique, et que l'inhibition intervient sur cette action.

Le problème se pose donc de savoir maintenant si cet inhibiteur exerce son influence antagoniste directement sur la substance trophique, comme un "poison" chimique, ou si au contraire il agit sur l'organe où s'élabore cette substance, c'est-à-dire sur la chaîne nerveuse et plus précisément sur les neurones, sources, d'après CHAPRON, de ce facteur. Et dans ce cas, on peut se demander aussi si la synthèse est bloquée ou au contraire si seule la décharge est empêchée.

Dans la première hypothèse, le cycle sécrétoire de ces cellules ne doit pas être modifié. Dans les autres, au contraire, les cellules sécrétrices de la chaîne, au niveau du front de section, verront leur activité modifiée par la présence de l'inhibiteur.

Pour essayer de choisir parmi ces hypothèses, nous avons donc étudié le rythme sécrétoire des neurones de la chaîne ganglionnaire ventrale, dans un premier temps, au cours de la régénération normale (témoins), puis en présence des substances inhibitrices spécifiques et trophiques.

TROISIEME PARTIE

ACTION DES SUBSTANCES INHIBITRICES SPECIFIQUES  
SUR LES CELLULES SECRETRICES DE LA CHAINE NERVEUSE



## TABLEAU XVIII

## RECHERCHES SUR LA "NEUROSECRETION" DANS LA CHAÎNE NERVEUSE DES OLIGOCHETES

## a) Microscopie photonique

Auteurs	Année	Espèces	Observations
<u>TERRICOLES</u>			
B. SCHARRER	1937	<i>Lumbricus terrestris</i>	Mise en évidence de cellules "neurosecrétrices" dans les ganglions ventraux.
W.R. HARMS	1948	<i>Lumbricus sp.</i>	Dans GSO et 2 premiers ganglions.
J. BRANDENBURG	1956	<i>Lumbricus terrestris</i>	Cheminement de la sécrétion le long de la chaîne.
H. HÜBL	1956	<i>Lumbricus terrestris</i> <i>Allolobophora longa</i> <i>Allolobophora (= Eisenia) foetida</i>	"U-zellen" dans GSO à la suite de section postérieure (absentes en temps normal).
J. MICHON et F. ALAPHILIPPE	1959	<i>Allolobophora chlorotica</i> <i>Dendroboena subrubicunda</i> <i>Eisenia rosea</i>	Cellules a et b dans le GSO (cell. d chez <i>A. chlorotica</i> ) rares cellules b dans les premiers ganglions.
P. OTREMBA	1961	<i>Lumbricus sp.</i>	"U-zellen" dans GSO. Ressemblance avec cell. a du cerveau.
B. AROS et B. VIGH	1961	<i>Lumbricus rubellus</i> <i>Allolobophora (= Eisenia) foetida</i> <i>Lumbricus herculeus (= terrestris)</i>	Cellules "neurosecrétrices" dans tous les ganglions de CN "Petites et grandes cellules".
H. HERLANT-MEewis et N. VAN DAMME	1962	<i>Eisenia foetida</i>	4 espèces de cellules sécrétrices sont mises en évidence : type "a" et "c".
C. JUBERTHIE et M. MESTROV	1962	<i>Pelodrilus leruthi</i>	Existence de cellules sécrétrices médioventrales et latérales en assez petit nombre dont certaines ressemblent aux cellules a du cerveau.
J. MICHON, J. MAISSIAT et A. ANGEVAIN	1964	<i>Eseniella tetraedra</i> $\epsilon$ . <i>typica</i>	Dans GSO deux types de cellules dont l'un apparaît lors de la régénération caudale.

N. TAKEUCHI	1965	<i>Pheretima communissima</i> <i>P. hilgendorfi</i>	Cellules assimilables aux "U" dans le G S O.
C. JUBERTHIE et M. MESTROV	1965	<i>Eophila pyrenaica</i>	4 groupes de cellules sécrétrices. Variations en cas de régénération postérieure.
H. HERLANT-MEEWIS et S. GALLARDO	1965	<i>Eisenia foetida</i>	Modifications au cours de la régénération d'1 type de cellules N.S.
AROS, VIGH et I. TEICHMANN	1965	<i>E. foetida</i> , <i>Lumbricus rubellus</i> , <i>L. herculeus</i> (= <i>terrestris</i> )	Dans GSO "U" ≡ "A". Dans CN : 6 groupes de cell. sécrétrices.
H. HERLANT-MEEWIS	1966	<i>Eisenia foetida</i>	Description de 4 groupes de cell. NS appelées suivant leur localisation C 1, C 2, C 3, C 4.
H. HERLANT-MEEWIS et RAMU	(1966) <sup>(1)</sup>	<i>E. foetida</i>	2 cell. ant. ventrales, 2 cell. postérieures en plus des 4 précédentes (C.P.A. et C.P.P.).
H. HERLANT-MEEWIS, PILLART et RAMU	(1966) <sup>(1)</sup>	<i>E. foetida</i>	C 1-C 2 actives immédiatement après la section chez les jeunes. C 1 - C 2 actives pendant que se forme le bouchon cicatriciel chez adultes.
I. TEICHMANN, B. AROS et B. VIGH	1966	<i>L. herculeus</i> (= <i>terrestris</i> ) <i>E. foetida</i>	Matériel sécréteur de la CN est identique à celui des A 1 du cerveau.
G. ROSI	1968	<i>Allolobophora caliginosa</i>	Rares cell. NS dans la CN comparables aux "petits neurones" du cerveau.
<u>LIMICOLES</u>			
R. DEUSE-ZIMMERMANN	1960	<i>Enchitraeus albidus</i> <i>Tubifex tubifex</i> <i>Naïs communis</i>	Deux cell. sécrétrices dans GSO. Très nombreuses cell. sécrétrices dans C. nerveuse. 2 à 8 cell. sécrétrices dans ganglions ventraux.

(1) Cité par H. HERLANT-MEEWIS, J. NAISSE et J. MOUTON (1967).





TABLEAU XIX

RECHERCHES SUR LA "NEUROSECRETION" DANS LA CHAINE NERVEUSE DES OLIGOCHETES (suite)

b) Microscopie électronique

Auteurs	Année	Espèces	Observations
E. SCHARRER et S. BROWN	1961- 1962	<i>Lumbricus terrestris</i>	Formation de granules de neurosécrétion.
A. PELLEGRINO DE IRAL- DI et E. DE ROBERTIS	1962	<i>Lumbricus (terrestris ?)</i>	Identification de 3 ou 4 types de cellules sécrétrices.
B. AROS, P. ROHLICH et B. VIGH	1963	<i>Lumbricus terrestris</i>	Destinée des granules élémentaires.
H. PETZOLD	1963	<i>Lumbricus terrestris</i>	Etude de cellules nerveuses de la chaîne ventrale et du GSO.
C. CHAPRON	1969	<i>Eisenia foetida</i>	Description de 4 types cellulaires.



TABLEAU XX

CORRESPONDANCES ENTRE LES DENOMINATIONS DES CELLULES "NEUROSECRETICES" DE LA CHAINE NERVEUSE

	HÜBL	OTREMBA	MICHON et ALAPHILIPPE	AROS et Coll.	HERLANT-MEEWIS et Coll.	CHAPRON	Observations
G.S.O.	U	U	a b d	U ≡ A	} Cellules N.S. du G.S.O. ...		
Chaîne nerveuse ventrale			b	"Gros neurones"  A 1	C 1 C 4 ≡ a  C 2 } ≡ c C 3 }  Cellules de remplacement C.P.A. (1) C.P.P. (1)	1  2 3  4	(1) Cellules phloxinophi- les antérieu- res et posté- rieures.

Depuis que B. SCHARRER (1937) a décrit la présence de cellules neurosécrétrices dans la chaîne nerveuse des Oligochètes, de nombreux auteurs se sont attachés à leur étude morphologique. Nous avons reporté sur les tableaux XVIII (microscopie optique) et XIX (microscopie électronique) la liste chronologique de ces travaux. Il faut remarquer que, bien que la plupart de ceux-ci concernent les Lombriciens, la dénomination des cellules ainsi repérées varie avec les auteurs et la confusion est devenue extrême. Nous avons tenté d'établir (Tableau XX) une correspondance entre les types cellulaires décrits dans les principaux travaux de HÜBL (1956), MICHON et ALAPHILIPPE (1959), OTREMBA (1961), AROS et Coll. (1961, 1963, 1965, 1966), HERLANT-MEEWIS et Coll. (1962, 1965, 1966, 1967), CHAPRON (1969). Ces équivalences sont élaborées uniquement d'après les observations effectuées par les différents auteurs. Pour que ces correspondances soient certaines, il faudrait, évidemment, nous appuyer sur des critères morphologiques et histochimiques, en reprenant par un même ensemble de techniques tous ces résultats.

Il semble que l'on doive séparer le ganglion sous-oesophagien, résultant de la coalescence des trois premiers ganglions, des autres neurones. Les cellules, dont la chromophilie permet d'envisager une fonction sécrétoire, y sont en effet assez différentes dans les deux cas.

En ce qui concerne le ganglion sous-oesophagien, les cellules "U" de HÜBL et de OTREMBA sont les mêmes que celles que MICHON et ALAPHILIPPE nomment "a" et que AROS et Coll. rapprochent des cellules "A" du cerveau.

Dans les ganglions de la chaîne, il semble que les cellules de type "1" (CHAPRON) correspondent aux "gros neurones" nommés ainsi par AROS.

Les cellules de type "2" correspondent aux C 4 de HERLANT-MEEWIS, qui sont analogues aux "a" du cerveau et que AROS appelle A 1.

Les cellules de type "3" (CHAPRON) paraissent devoir être comparées aux neurones de type "b" (MICHON).

Les cellules de type "4" (CHAPRON) pourraient correspondre à ce que HERLANT-MEEWIS appelle "cellules de remplacement". Les autres cellules observées par cet auteur (C 1, C 3, C 4, cellules phloxinophiles antérieures et postérieures) ne semblent pas avoir été décrites précédemment.

CHAPRON, étudiant au microscope électronique les neurones de la chaîne ventrale, observe dans certaines catégories cellulaires des granulations de plusieurs tailles, caractéristiques de différentes sécrétions. On sait que, selon la définition de KNOWLES et BERN (1966), il existe deux types de fibres nerveuses : peptidergiques et aminergiques. Les premières sont caractérisées par la présence de granules denses de taille supérieure à 1 000 Å ; elles correspondent aux neurones responsables de l'élaboration de neurohormones (= cellules neurosécrétrices), d'après la classification de B. SCHARRER (1969). Les secondes (GERSCHENFELD, 1966) possèdent des granules denses de diamètre égal ou inférieur à 1 000 Å. Ces cellules sécrètent des neurotransmetteurs ou neurohumeurs (B. SCHARRER, 1969). Il faut d'ailleurs, semble-t-il, considérer cette distinction comme provisoire ; la frontière entre les deux activités est quelquefois floue (B. SCHARRER et M. WEITZMAN, 1970). Et récemment, KNOWLES (1971) propose de reprendre le terme de neurosécrétion pour tous les produits de sécrétion aussi bien peptidergiques qu'aminergiques.

L'un des quatre types que CHAPRON définit (type 3) élabore des granulations de 800 à 1 100 Å. Des granules de cette taille se retrouvent dans les fibres nerveuses issues de la chaîne ancienne au niveau du bouchon cicatriciel. Ces granules représentent, pour cet auteur, un neurohumeur, responsable du déclenchement de l'histolyse du bouchon cicatriciel.

HERLANT-MEEWIS et GALLARDO (1965) et HERLANT-MEEWIS (1971), ont observé des variations de la chromophilie de certains neurones sécréteurs de la chaîne nerveuse en relation avec la cicatrisation et la régénération chez E. foetida. De leur côté, JUBERTHIE et MESTROV (1965) ont remarqué des modifications du cycle de cellules neurosécrétrices chez Eophila pyrenaica au cours de la régénération.

Avant d'étudier les modifications apportées par l'inhibiteur, nous avons voulu vérifier qu'un cycle sécrétoire pouvait effectivement être mis en évidence dans la chaîne nerveuse, au cours des premières phases de la régénération chez des vers témoins.



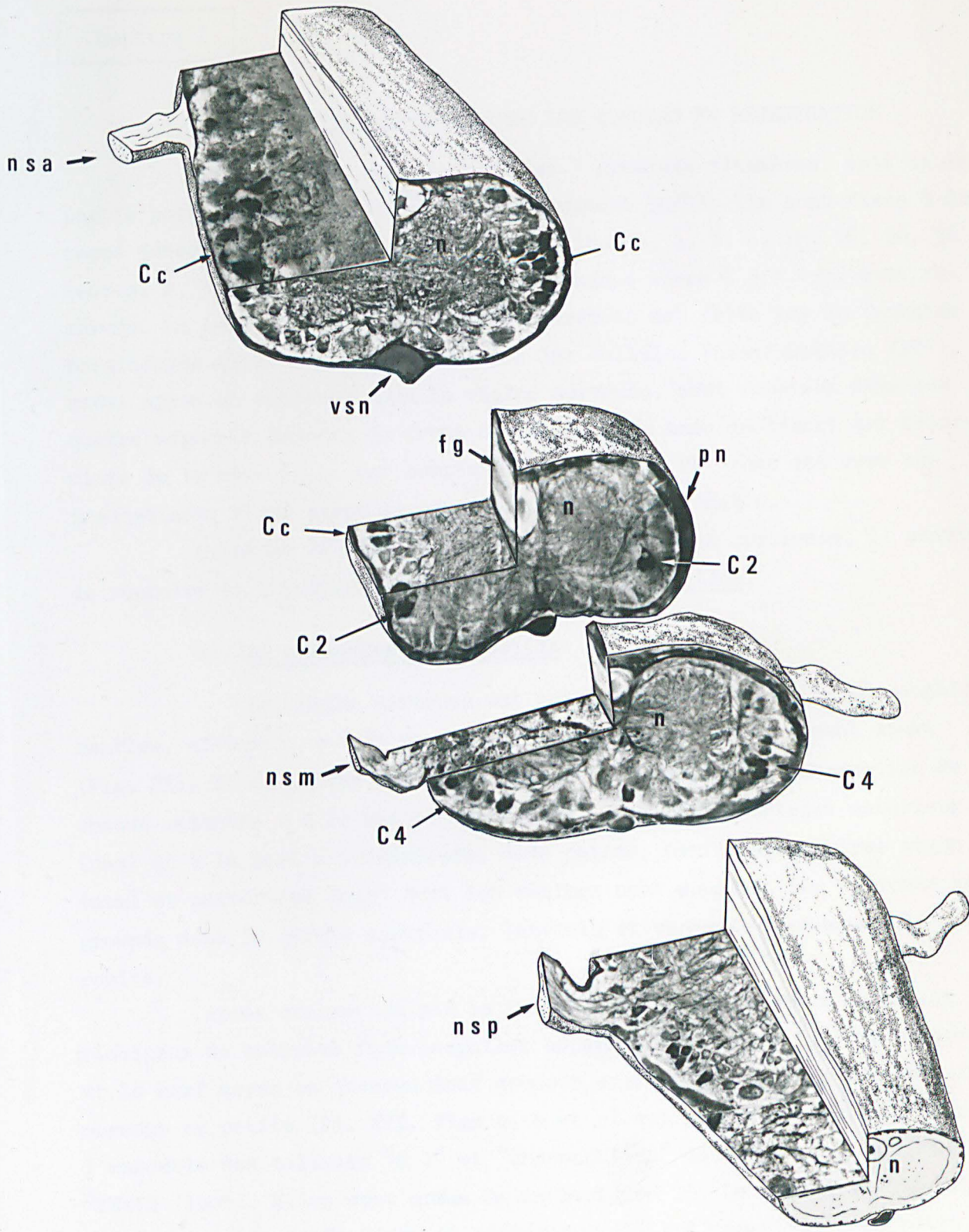
Figure 25 - Le neuromère typique d'Eisenia foetida (photo-montage)

Ce bloc-diagramme d'un ganglion nerveux ventral est découpé en quatre tronçons de façon à montrer, par des sections frontales et transversales, la position des cellules  $FP^+$ . Entre les nerfs segmentaires antérieurs (nsa) et moyens (nsm) existent deux groupes pairs de "cellules chromophiles" (Cc). Entre les nerfs segmentaires moyens (nsm) et postérieurs (nsp) se trouvent deux groupes pairs de "cellules C 4". Au niveau des nerfs segmentaires moyens (nsm) on met en évidence une paire de grosses cellules très fuchsinophiles (cellules C 2).

---

Cc : cellules chromophiles, C 2, C 4 : cellules  $FP^+$  de type 2 et 4, fg : fibres géantes,  
n : neuropile, nsa, nsm, nsp : nerfs segmentaires antérieur, moyen et postérieur, pn : périneurium, vsn : vaisseau sous-nervien.





Chapitre 1

CYCLES NEUROSECRETOIRES CHEZ LES TEMOINS EN REGENERATION

Les vers sont amputés soit des 7 premiers métamères, soit de la partie postérieure au niveau de l'intersegment 50/51. Ils sont fixés à des temps déterminés après l'opération : 10 minutes, 1, 3, 6, 12, 18, 24, 36 heures, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 jours. Pour chaque temps 4 à 7 vers sont observés. La coloration des substances sécrétées est faite par la fuchsine paraldéhyde selon GABE (1953). Toutes les cellules fuchsinophiles (FP<sup>+</sup>), ainsi mises en évidence dans la chaîne nerveuse, sont comptées dans les quatre segments proches du front de section. La base de départ est déterminée de la même façon par comptage des cellules FP<sup>+</sup> chez des vers non traumatisés, fixés avant la coupure au niveau convenable.

Avant de décrire les variations numériques observées, il convient de rappeler la topographie d'un neuromère d'E. foetida.

1 - Le neuromère d'E. foetida

La chaîne nerveuse est constituée par une suite de ganglions renflés, allongés, reliés par un connectif unique, relativement court (Fig. 25). Trois paires de nerfs segmentaires assurent l'innervation de chaque métamère : à la partie antérieure, le nerf segmentaire antérieur (nsa) et à la partie postérieure, deux paires, nerfs segmentaires moyen (nsm) et postérieur (nsp) dont les racines sont soudées. Les neurones sont groupés dans la partie corticale, latérale et ventrale, entourant le neuropile.

Après coloration par la fuchsine paraldéhyde, deux ensembles principaux de cellules fuchsinophiles apparaissent. Entre le nerf antérieur et le nerf moyen on observe deux groupes symétriques de neurones de taille moyenne ou petite (Pl. XVI, figs a, b et c) qui pourraient correspondre à l'ensemble des cellules "C 1" et "chromophiles" décrites par HERLANT-MEEWIS (1966). Elles sont notées Co sur la figure 25. Le second massif est situé entre les nerfs moyen et postérieur. Il est constitué d'un petit nombre de cellules de taille moyenne, en position latéroventrale (C 4 sur la fig. 25). Une paire de neurones identiques est localisée près du plan

TABLEAU XXI

EVOLUTION DU NOMBRE DES CELLULES FP<sup>+</sup>  
CHEZ DES VERS DECAPITES (TEMOINS)

TEMPS	G 8	G 9	G 10	G 11	MOYENNE
0	21	19	22	17	19,7
10 mn	10	11	14	10	11,2
1 heure	7	6	7	7	6,7
3	6	4	5	4	4,7
6	11	14	11	13	12,2
12	17	23	18	19	19,2
18	23	20	18	19	20,0
24	18	19	19	17	18,2
36	13	15	17	14	14,7
48	11	16	18	18	15,7
3 jours	16	15	16	15	15,5
4	18	14	17	16	16,2
5	16	16	15	17	16,0
6	17	15	16	17	16,2
7	16	15	17	15	15,7

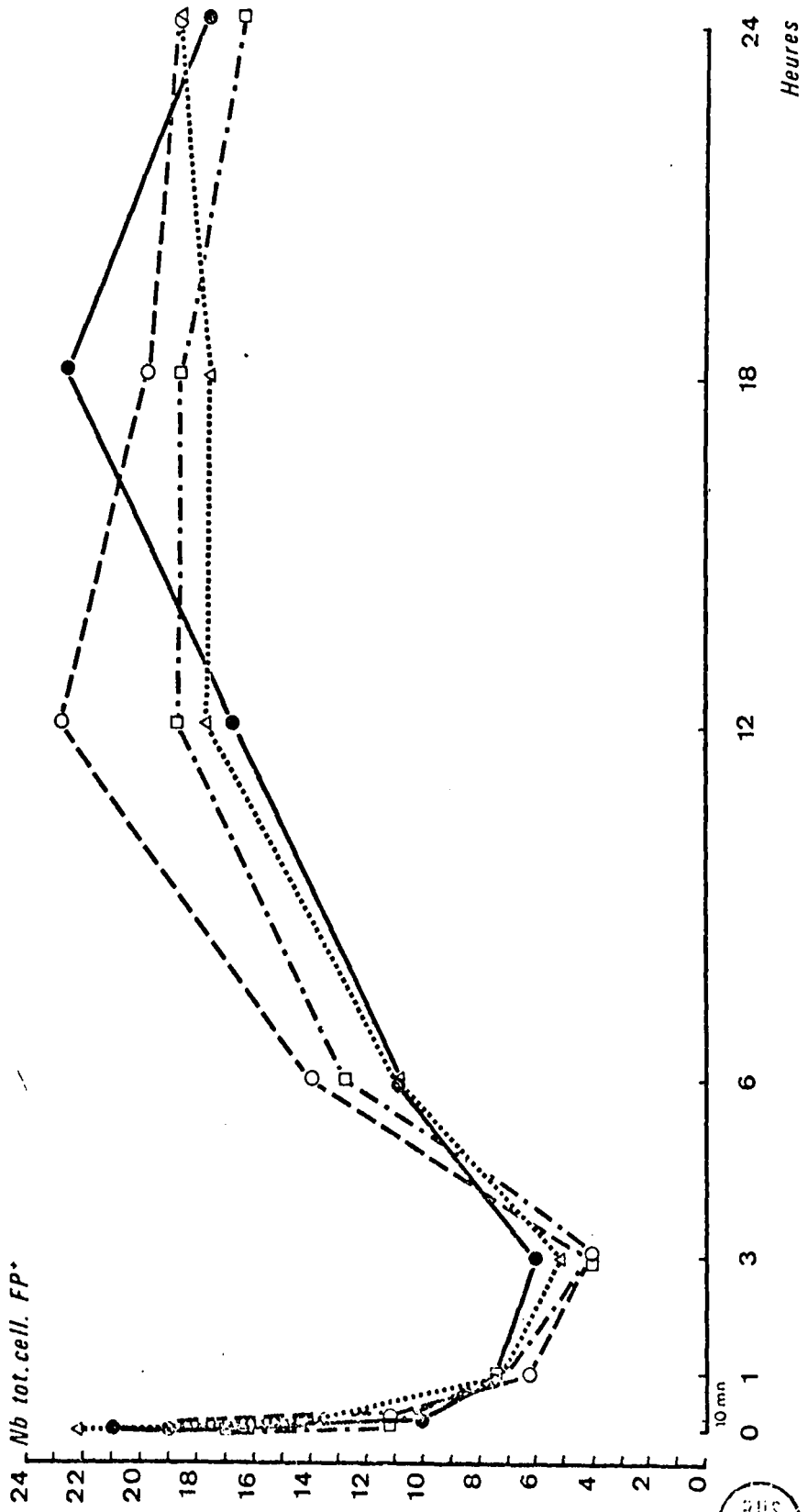


Figure 26 - Cycle sécrétoire au cours de la régénération antérieure.

Evolution du nombre des cellules FP<sup>+</sup> dans les 8<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> et 11<sup>o</sup> ganglions, au cours des 24 heures suivant l'amputation.

(Nombre total de cellules FP<sup>+</sup> en ordonnées, temps en heures en abscisses).

- G 8
- G 9
- △ G 10
- G 11



BIUS  
CELLS

sagittal, un peu en avant du nerf segmentaire postérieur. Les cellules de ce massif correspondent à celles qu'HERLANT-MEEWIS a appelées "C 4" et CHAPRON "type 2". Elles sont vraisemblablement du type "A 1" (AROS et Coll.).

Dans nos préparations, nous avons retrouvé les autres catégories cellulaires décrites par HERLANT-MEEWIS : une paire de C 2 (Pl. XVI, fig. a), à la base du nerf segmentaire moyen, de grande taille, très fuchsino-philés et une paire de C 3, volumineuses, situées entre les racines des nerfs segmentaires moyens et postérieurs et possédant, au pôle opposé à l'axone, une vacuole pleine de granules.

Les préparations effectuées sur des vers non amputés nous ont permis de compter les cellules fuchsino-philés dans les ganglions 8, 9, 10 et 11 (Tableau XXI) : respectivement 21, 19, 22 et 17. Ces valeurs sont très proches les unes des autres et permettent de calculer la moyenne pour ces quatre neuromères, soit : 19,7. La même technique nous a permis d'obtenir pour les segments 47, 48, 49 et 50 les valeurs suivantes (Tableau XXII) : 22, 25, 17 et 22, avec une moyenne de 21,5. Les valeurs moyennes pour les neuromères antérieurs et médians sont donc très semblables. L'observation microscopique d'autre part ne montre pas de grosses différences dans la topographie de ces neuromères.

## 2 - Cycle sécrétoire au cours de la régénération antérieure

Sur le tableau XXI ont été reportés les nombres de cellules fuchsino-philés comptés dans les quatre ganglions proches du front de section (G 8 à G 11). Dans chaque colonne les nombres représentent les moyennes des nombres enregistrés chez les différents individus observés, arrondis au nombre entier le plus proche. Seules les moyennes entre les quatre ganglions, pour chaque temps, ont été calculées avec une décimale.

Les graphiques de la figure 26 montrent l'évolution du nombre des cellules fuchsino-philés dans les 8°, 9°, 10° et 11° ganglions, au cours des 24 heures suivant l'amputation.

On peut noter dès l'abord une parfaite similitude dans l'allure de ces 4 courbes. Pendant les 10 premières minutes, le nombre des cellules FP<sup>+</sup> diminue considérablement (en moyenne dans le rapport 1 : 1,75). Une heure après, ces cellules se sont encore raréfiées. Le minimum est atteint 3 heures après la décapitation ; à ce moment on retrouve en moyenne 4 fois moins de cellules FP<sup>+</sup> chargées qu'avant l'opération. Ces variations sont

Figure 27 - Cycle sécrétoire au cours de la régénération antérieure.

Evolution du nombre des cellules FP<sup>+</sup> dans les ganglions 8 à 11, au cours des 7 jours suivant l'amputation.

(Seule la moyenne des 4 valeurs a été reportée pour les 24 premières heures).



- G 8
- -○ G 9
- △····△ G10
- -□ G11
- ▲- -▲  $\bar{m}$

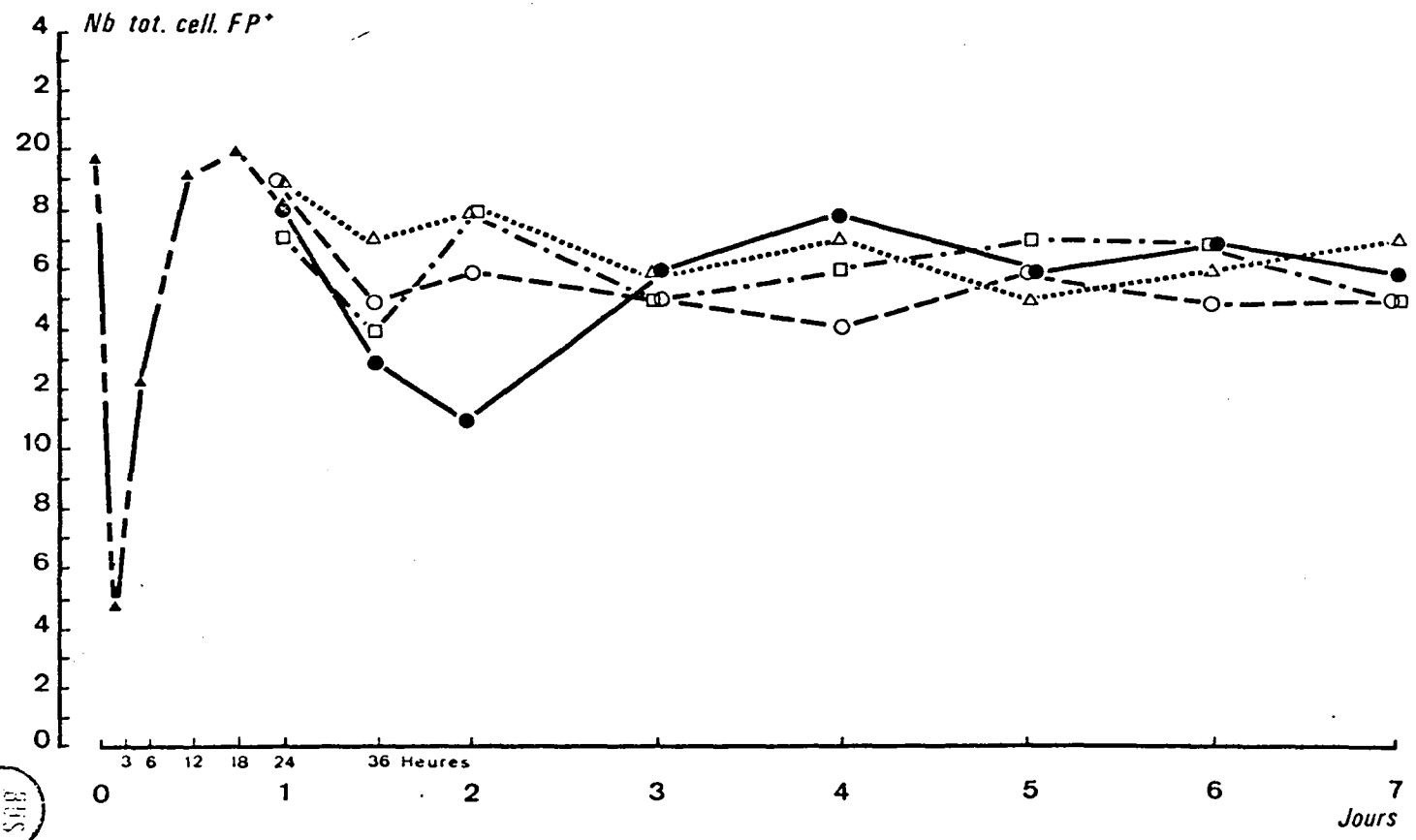
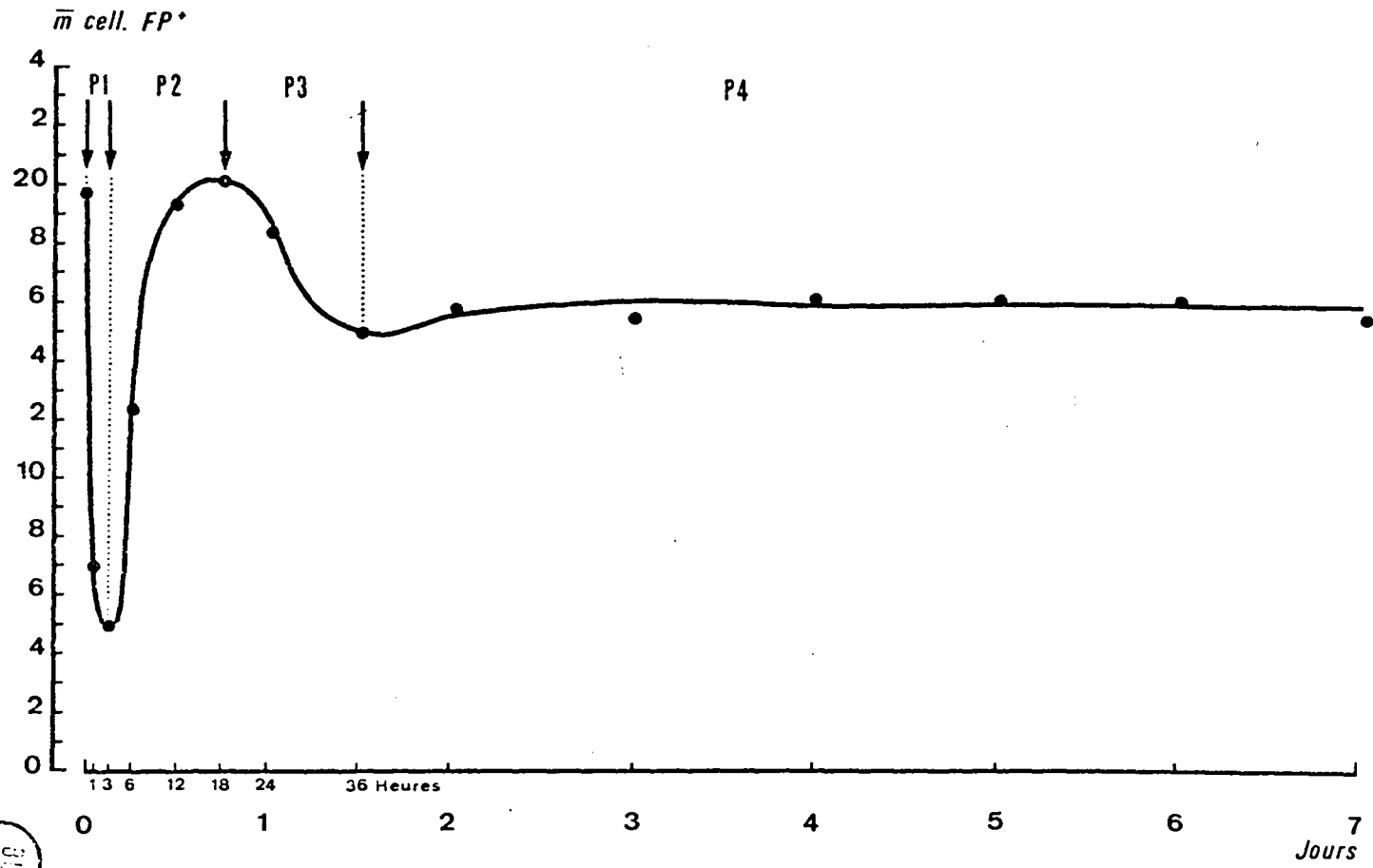


Figure 28 - Cycle sécrétoire au cours de la régénération antérieure.

Courbe des valeurs moyennes ( $\bar{m}$ ) des quatre ganglions tracée pour la période de 0 à 7 jours. Quatre phases séparées par des flèches verticales, peuvent être déterminées : dénommées respectivement P 1, P 2, P 3 et P 4.



rigoureusement semblables dans les quatre ganglions proches du front de section. A partir de la fin de la 3<sup>e</sup> heure après la résection de la tête, le nombre des cellules fuchsinophiles s'accroît jusqu'à un maximum aux environs de la 18<sup>e</sup> heure. De 12 h à 18 h on peut remarquer quelques différences entre les quatre ganglions étudiés. Le maximum du nombre des cellules sécrétrices est obtenu à 12 h pour le second ganglion (G 9), tandis que le 1<sup>o</sup> (G 8) a son maximum de cellules FP<sup>+</sup> 6 heures plus tard (soit 18 h après l'opération).

Les deux ganglions suivants, G 10 et G 11, conservent leurs nombres de neurones sécréteurs au cours de cette même période. Vingt quatre heures après l'intervention, les nombres des cellules fuchsinophiles des quatre neuromères considérés sont très voisins les uns des autres.

Sur la Figure 27, nous avons reporté les valeurs correspondant aux temps suivants jusqu'à 7 jours, après changement de l'échelle des abscisses. La courbe des moyennes des premières 24 heures y a d'autre part été tracée. Entre 1 et 7 jours, on peut remarquer une simple fluctuation des valeurs, sauf peut-être pour le point 48 h où le nombre des cellules FP<sup>+</sup> du ganglion G 8 indique un minimum. Les autres valeurs sont très voisines les unes des autres.

Cette étude des variations des nombres de cellules fuchsinophiles nous a montré une très bonne ressemblance entre les quatre ganglions proches du front de section. On peut donc en déduire qu'il existe un cycle sécrétoire au niveau de la chaîne nerveuse au cours des premiers stades de la régénération céphalique. La courbe des moyennes, calculées entre les quatre ganglions considérés (Fig. 28), montre bien ce cycle dans lequel, au cours de la première semaine, on peut distinguer quatre phases.

La première phase recouvre les trois premières heures. Elle pourrait correspondre à une vidange des cellules fuchsinophiles déclenchée par le stress dû à la coupure : la rapidité (10 minutes) avec laquelle le nombre des cellules colorées par la fuchsine diminue de moitié en est la preuve. D'autre part, des figures de vidange ont pu être observées (Pl. XVI, fig. d) dans ces cellules fuchsinophiles : la photographie d montre un grain de sécrétion engagé dans l'axone d'une cellule du groupe antérieur (flèche). Le péricaryon de certains neurones est moins fuchsinophile mais contient des grains fortement colorés à l'intérieur d'une petite vacuole (Pl. XVI, figs e, f, g).

Entre 3 h et 18 h, une seconde phase peut être décelée ; elle correspondrait à la recharge des cellules. 18 heures après la section, le nombre des neurones fuchsinophiles a retrouvé son niveau initial. On peut observer à 6 h de petits massifs de telles cellules, en particulier dans le groupe antérieur (C 1 et cellules chromophiles, suivant la nomenclature d'HERLANT-MEEWIS), (Pl. XVII, figs a et b), mais aussi dans le groupe postérieur (cellules C 4 selon ce même auteur) (Pl. XVII, fig. c, en bas). A 12 h (Pl. XVII, figs d et e), les cellules du groupe antérieur deviennent très nombreuses. Les photographies (Pl. XVIII, figs b et c), prises 18 heures après la section, montrent, sur coupes parasagittales pratiquées respectivement sur les ganglions G 10 et G 8, cette augmentation au niveau du groupe antérieur.

Entre 18 et 36 h, on note une nouvelle diminution du nombre de cellules sécrétrices (Phase P 3), au niveau du groupe antérieur, (Pl. XVII, fig. f) et du groupe postérieur (Pl. XVIII, fig. a). Le minimum, beaucoup moins marqué que celui qui termine la phase P 1, se situe 36 heures après la décapitation.

Enfin débute la quatrième phase, correspondant à un plateau, période d'état, au cours de laquelle le nombre des cellules sécrétrices reste élevé (16 environ en moyenne par ganglion). Certaines se déchargent tandis que d'autres synthétisent le matériel sécrétoire ; on aboutit de la sorte à une grande stabilité dans le nombre des cellules colorées par la fuchsine, jusqu'au 7<sup>e</sup> jour. On peut noter d'autre part qu'apparaissent dans la chaîne nerveuse, en particulier au niveau de son front de section, à proximité du bouchon cicatriciel, des grains fortement fuchsinophiles (Pl. XVIII, fig. d). Ceux-ci pourraient correspondre à des amas des granules observés par CHAPRON au microscope électronique. Une telle présence de produits de sécrétion à ce niveau de la chaîne nerveuse a déjà été remarquée par JUBERTHIE et MESTROV (1965) chez Eophila pyrenaica en régénération.

On peut penser que la première phase correspond à la décharge par certains neurones d'un agent responsable de la mobilisation des coelomocytes, donc de la toute première étape de la cicatrisation.

A la troisième phase, pourrait correspondre une action sur la lyse du bouchon cicatriciel, action mise en évidence par CHAPRON.

TABLEAU XXII

EVOLUTION DU NOMBRE DES CELLULES FP<sup>+</sup> CHEZ DES VERS  
AMPUTES DE LA QUEUE A L'INTERSEGMENT 50/51 (TEMOINS)

TEMPS	G 50	G 49	G 48	G 47	MOYENNE
0	22	25	17	22	21,5
10 min	12	15	10	13	12,5
1 heure	8	6	6	7	6,8
3	7	8	6	7	7,0
6	4	4	3	4	3,8
12	2	2	2	2	2,0
18	4	5	4	6	4,8
24	6	10	6	8	7,5
36	13	11	10	14	12,0
48	13	15	14	17	14,8
3 jours	12	11	17	19	14,8
4	12	9	12	14	11,8
5	12	10	12	14	12,0
6	14	12	13	16	13,8
7	17	15	20	18	17,5

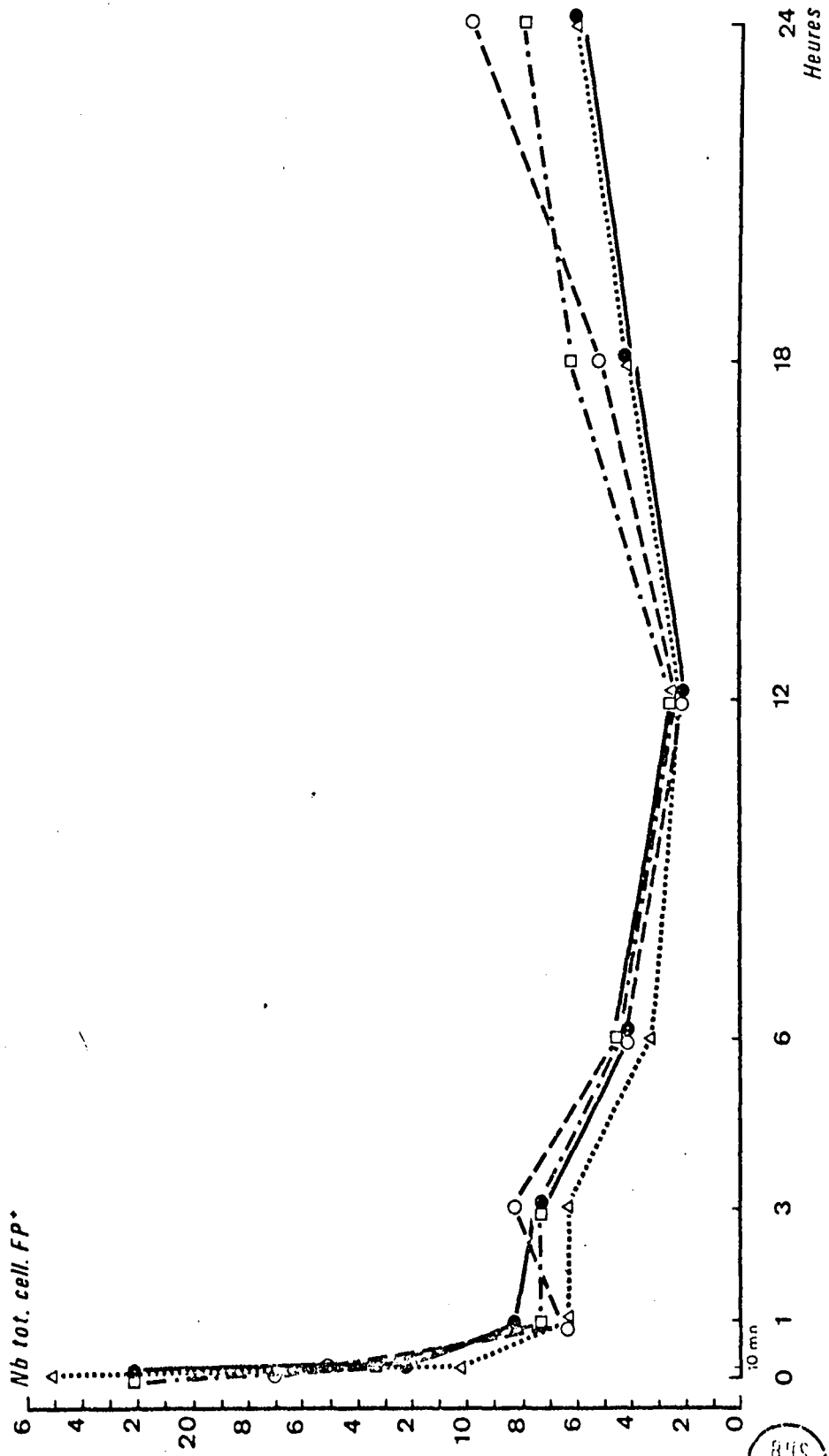
RUS  
LILLE

Figure 29 - Cycle sécrétoire au cours de la régénération caudale.

Evolution du nombre des cellules  $FP^+$  dans les quatre derniers ganglions (47, 48, 49 et 50), au cours des 24 heures suivant l'amputation.

(Nombre total de cellules  $FP^+$  en ordonnées, temps en heures en abscisses).

- G50
- G49
- △ G48
- G47





Quant à la quatrième, elle pourrait représenter la phase de sécrétion nécessaire à la suite du développement du régénérat.

Nos observations ne permettent toutefois pas de conclure que les mêmes cellules sont impliquées dans ces phases de sécrétion. De même, nous ne pouvons pas savoir si la chaîne nerveuse élabore une seule substance ayant plusieurs influences successives, différentes selon le stade auquel elles interviennent, ou bien si ces actions correspondent à des facteurs différents.

### 3 - Cycle sécrétoire pendant la régénération caudale

La technique décrite au paragraphe précédent nous a permis d'obtenir les résultats suivants, au cours de la régénération caudale après section à l'intersegment 50/51.

Sur le Tableau XXII, ont été reportées les valeurs correspondant aux différents temps pour les quatre ganglions : 47, 48, 49 et 50. Les courbes du graphique (Fig. 29) représentent les variations des nombres de cellules sécrétrices pendant les premières 24 heures après l'opération, pour chacun des quatre ganglions étudiés. On peut remarquer tout d'abord que ces quatre courbes sont très semblables. Elles montrent une chute rapide de la quantité de cellules fuchsinophiles au cours des premières heures. Dix minutes après l'opération, ce nombre a diminué en moyenne dans le rapport 1 : 1,7. Une heure après l'opération, il reste trois fois moins de neurones  $FP^+$  qu'avant l'amputation (Pl. XIX, figs a et b). Entre 1 h et 3 h, on peut noter la présence d'un palier dans les courbes (Pl. XIX, figs c, d, e). Puis le nombre de cellules continue de diminuer jusqu'à la 12<sup>e</sup> heure, où se situe le minimum (Pl. XIX, fig. f). A ce stade, il reste seulement 1/10 des cellules contenant du matériel fuchsinophile. On peut remarquer qu'à ce moment chaque ganglion contient seulement deux cellules de ce type : ce sont les neurones appelés C 2 par HERLANT-MEEWIS. A cette phase du cycle, le cytoplasme est peu chromophile et des granulations fuchsinophiles sont visibles dans de petites vacuoles (Pl. XIX, fig. g). D'autre part, dans le neuropile, de nombreux trajets axonaux sont colorés par la fuchsine (Pl. XIX, 4 flèches). Entre 12 h et 24 h le nombre des cellules sécrétrices augmente progressivement. Une coupe parasagittale pratiquée à 12 h montre (Pl. XIX, fig. f) une absence totale de cellules  $FP^+$  dans le groupe antérieur. A 24 h, par contre, à un niveau comparable, une même section (Pl. XX, fig. a) permet de mettre en évidence quelques cellules à cytoplasme fuchsinophile.

Figure 30 - Cycle sécrétoire au cours de la régénération caudale.

Evolution du nombre des cellules  $FP^+$  dans les ganglions 47 à 50, au cours des 7 jours suivant l'amputation.

(Seule la moyenne,  $\bar{m}$ , des quatre valeurs a été reportée pour les 24 premières heures).

- G50
- - -○ G49
- △·····△ G48
- · - ·□ G47
- ▲- - -▲  $\bar{m}$

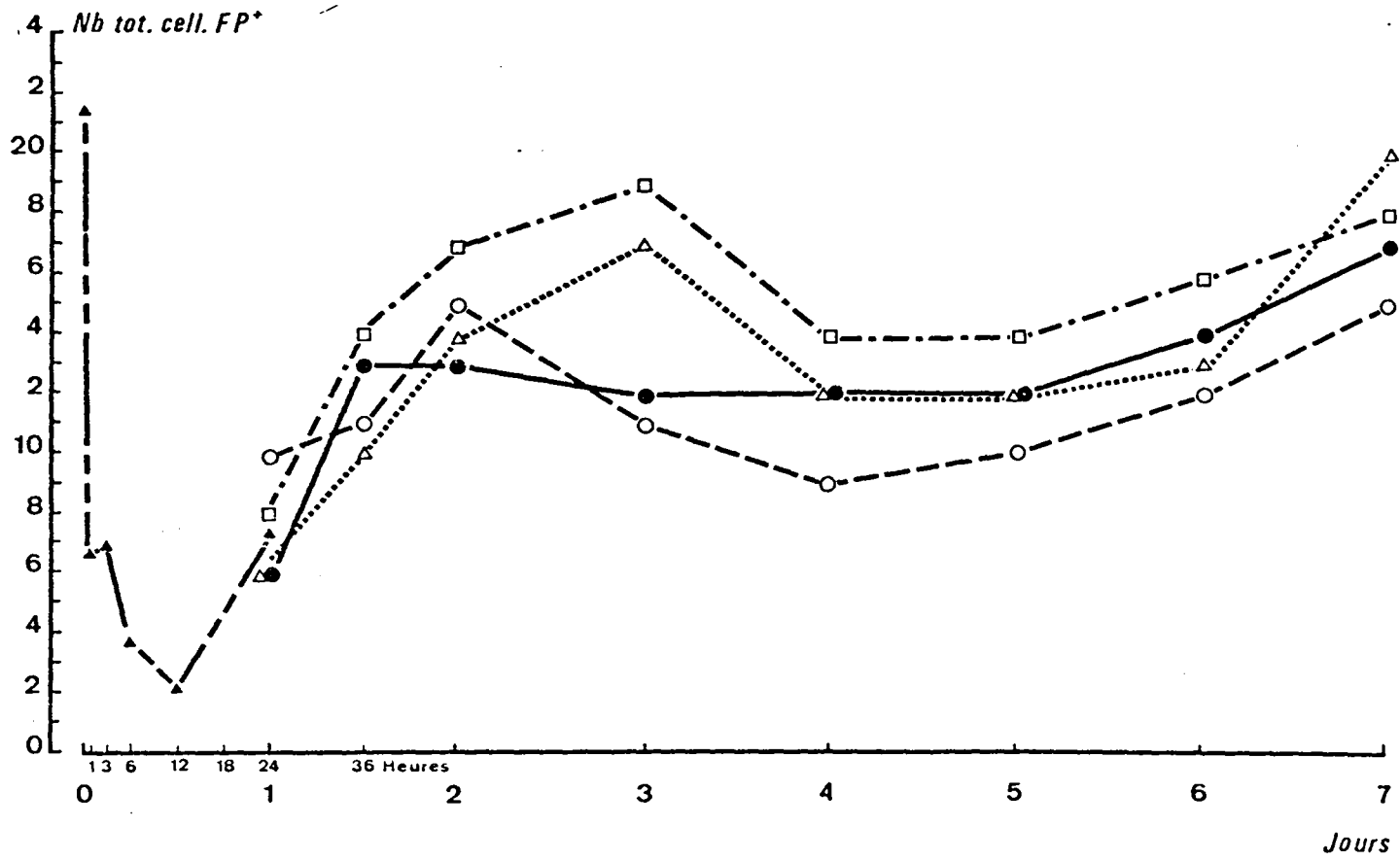
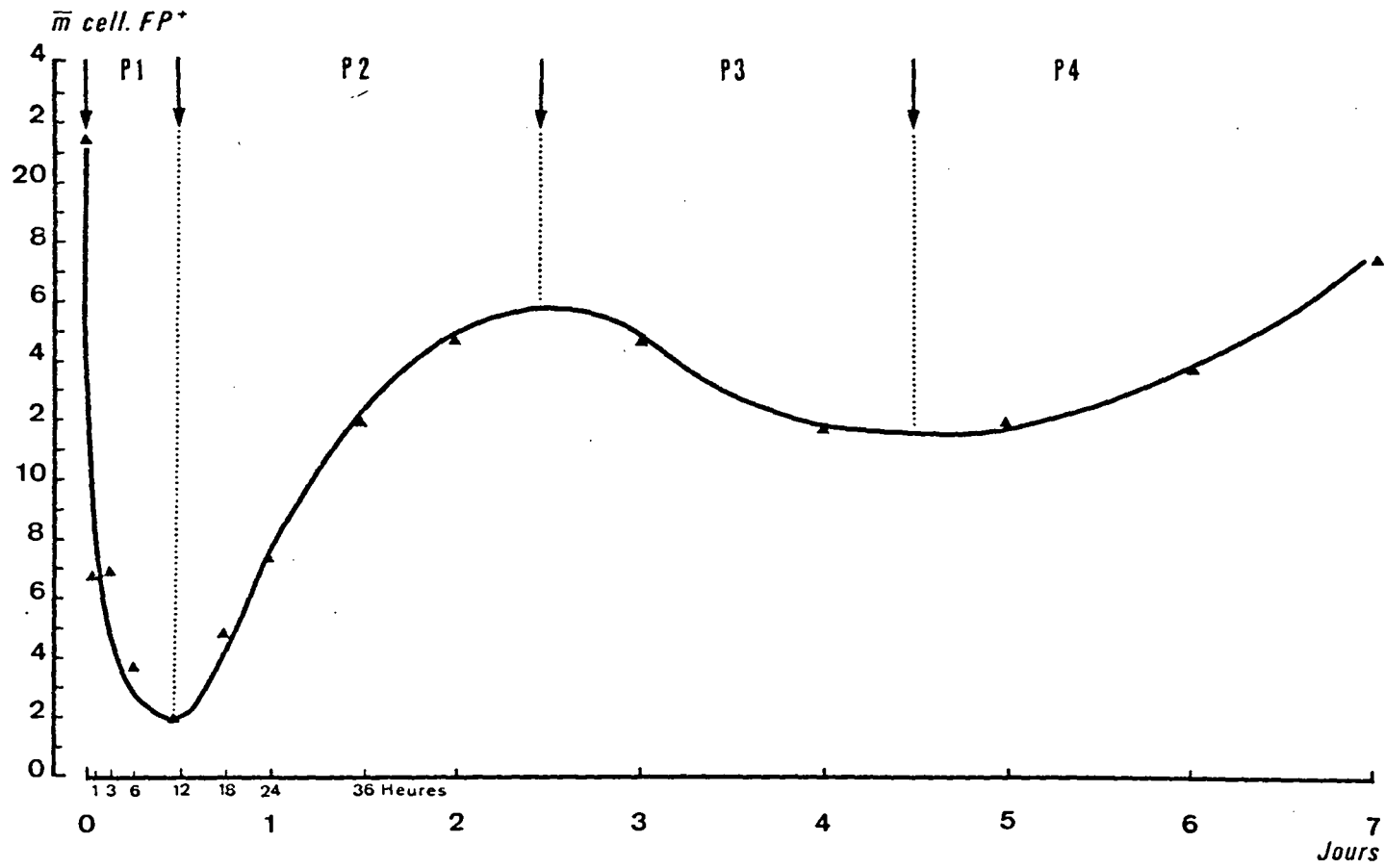


Figure 31 - Cycle sécrétoire au cours de la régénération caudale.

Courbe des valeurs moyennes ( $\bar{m}$ ) des quatre ganglions tracée pour la période de 0 à 7 jours.  
Quatre phases (P 1 à P 4), séparées par des flèches verticales, peuvent être déterminées.



Pendant la deuxième journée suivant l'opération (Fig. 30), les courbes relatives aux ganglions des segments 47 à 50 continuent de monter, d'une façon approximativement parallèle. Mais, à partir de 48 h, on note une disjonction entre les ganglions 49 et 50 d'une part, et 47 et 48 d'autre part. Les premiers, en effet, possèdent, à cette époque, un nombre maximum de cellules fuchsinophiles ; pour les seconds, au contraire, ce maximum n'est atteint que 24 heures plus tard, soit le 3<sup>e</sup> jour après l'amputation. Les quatre valeurs se regroupent d'ailleurs le 4<sup>e</sup> jour et, par la suite, leur variation est comparable jusqu'à la fin de l'expérience. Les photos b et c, Pl. XX représentent des coupes pratiquées sur des vers fixés 5 jours après la décapitation. Des cellules très fuchsinophiles sont visibles dans les ganglions 49 et 50. Ces cellules ne sont pas toutes au même niveau de charge.

Au total, si l'on trace la courbe des moyennes entre les quatre métamères (Fig. 31) on peut, ici encore, observer la présence de quatre phases successives au cours du cycle sécrétoire. La première (P 1) correspond à la décharge des cellules fuchsinophiles, rapide pendant la 1<sup>re</sup> heure, plus lente jusqu'à la 12<sup>e</sup>. Suit une phase (P 2) de recharge jusqu'à 2 ou 3 jours. La troisième (P 3) correspond à la diminution du nombre des cellules colorées par la fuchsine jusqu'à un minimum qui se situe vers 4-5 jours. Durant la quatrième phase (P 4), les cellules se rechargent. Mais, à aucun moment, la quantité de neurones fuchsinophiles n'atteint le nombre initial, observé au temps 0. Il semble donc que, là encore, il y ait simultanément des cellules en état de vidange et d'autres en cours de synthèse.

#### 4 - Discussion et Conclusion

Les courbes des figures 28 et 31, représentant les variations des moyennes des nombres de cellules  $FP^+$  respectivement dans la régénération céphalique et dans la régénération caudale, montrent une grande similitude entre elles, traduisant donc une grande ressemblance entre les cycles sécrétoires. Ceci nous a permis, dans les deux cas, de déterminer quatre phases relativement semblables. Mais deux différences importantes apparaissent entre ces courbes.

L'une réside dans la durée des phases. Au cours de la régénération postérieure, en effet, les phases du cycle sont plus longues, en particulier la seconde (P 2) qui s'étend de 12 h à plus de 48 h et la phase P 3 (de 2-3 j à 4-5 j).

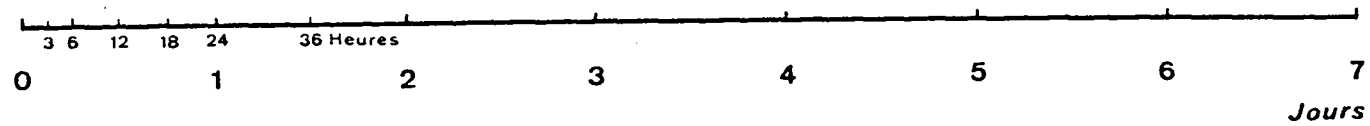
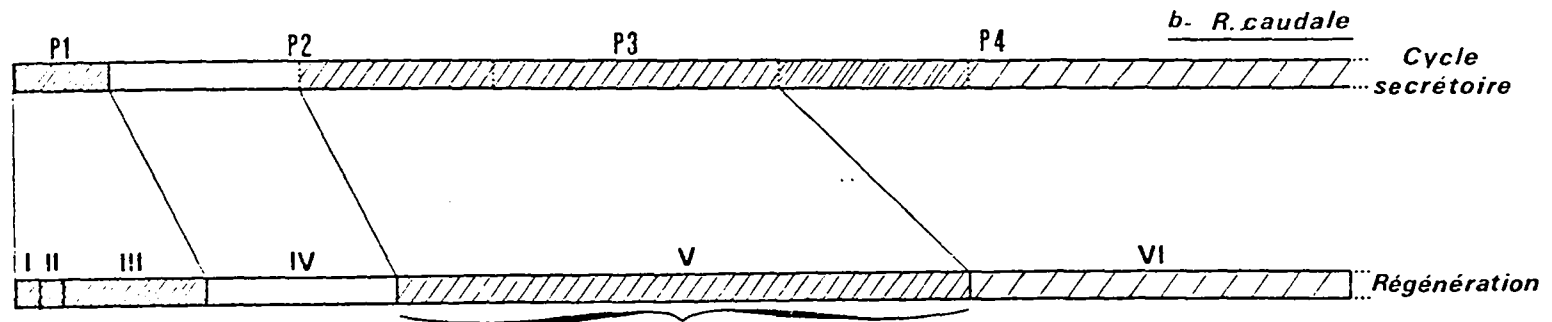
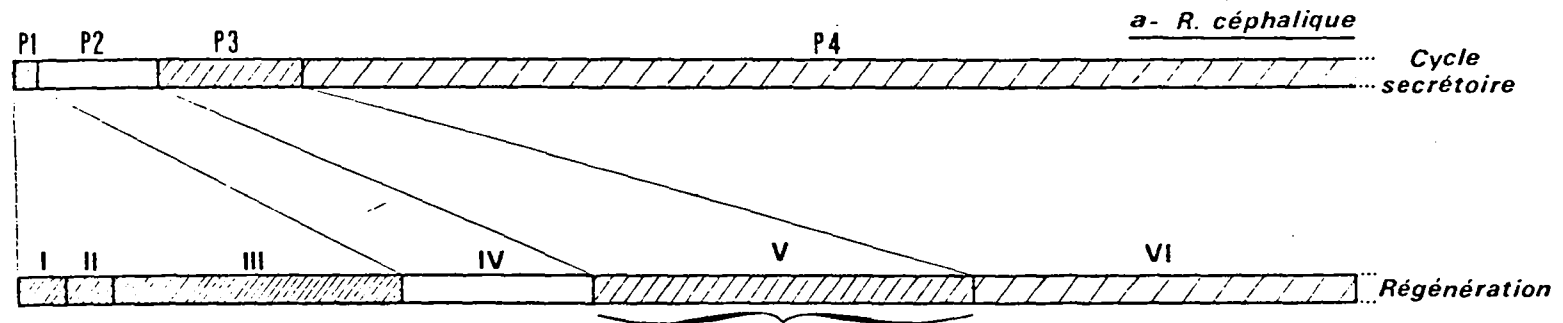
Figure 32 - Comparaison entre les stades de la régénération et les phases du cycle sécrétoire (en abscisses, temps en heures et jours).

a - Régénération céphalique.

La phase P 1 semble correspondre aux trois premiers stades de la régénération, c'est-à-dire à la mise en place des éléments du bouchon cicatriciel. Pendant la phase P 2 (recharge des cellules  $FP^+$ ) s'édifie le bouchon cicatriciel st. IV : accolade horizontale). A la phase P 3, correspondrait le stade V au cours duquel le bouchon cicatriciel est histolysé. Enfin les autres stades de la régénération seraient à mettre en relation avec la 4<sup>o</sup> phase (P 4).

b - Régénération caudale.

La phase P 1 et les trois premiers stades paraissent se correspondre. Le début de la phase P 2 semble devoir être mis en parallèle avec le stade IV. Le V<sup>o</sup> stade, au cours duquel s'effectue la destruction du bouchon cicatriciel (accolade horizontale), est plus long que dans la régénération céphalique. Il paraît correspondre à la fin de la phase P 2 et au début de la phase P 3, ces deux phases se chevauchant en partie. Comme précédemment les autres stades de la régénération pourraient être reliés à la 4<sup>o</sup> phase.





D'autre part, le maximum, obtenu à 2-3 j, ne représente que les 2/3 environ du nombre initial de neurones  $FP^+$ , alors que dans la régénération céphalique, ce maximum atteint le même nombre de cellules  $FP^+$  qu'avant l'opération. On peut interpréter ce phénomène en pensant que, dans la régénération céphalique, la décharge (phase P 3) ne commence que lorsque toutes les cellules se sont rechargées, tandis que pour la reformation d'une queue, certaines cellules commencent à se décharger pendant que d'autres synthétisent. De fait, on peut observer, au microscope, simultanément certaines cellules faiblement fuchsinophiles, des cellules à cytoplasme très fortement coloré par la fuchsine, d'autres enfin présentant des aspects de décharge. Par conséquent, la limite entre les phases P 2 et P 3 ne peut être tracée avec netteté.

Après avoir déterminé les différentes phases des cycles sécrétoires, il convenait de les comparer avec les stades de la régénération tels qu'ils ont été décrits dans les chapitres précédents (chapitres 2 et 3 de la 2<sup>e</sup> partie), et d'essayer d'en trouver les correspondances. Pour cela, nous avons représenté sur un même graphique (Fig. 32 a et b) les durées des stades de la régénération (céphalique et caudale) en regard des durées des phases du cycle correspondant, pendant les 7 jours qui suivent l'opération.

La phase P 1 de décharge est plus longue et la vidange est aussi plus complète (minimum plus bas sur la courbe de la Fig. 31) dans la régénération caudale que dans la régénération céphalique. Au total il y aura moins de substance sécrétée, lorsqu'il s'agit de régénération antérieure. Si donc cette substance intervient sur la mobilisation des coelomocytes, et partant sur la formation du bouchon cicatriciel, la durée de cette formation devra donc en être modifiée. On observe, en effet, en direction postérieure, que le bouchon cicatriciel se forme en 24 heures au lieu de 2 jours. Il semble donc bien que la phase P 1 corresponde à la mise en liberté d'une substance nécessaire aux stades I, II et III, pendant lesquels la plaie se cicatrise par accumulation de coelomocytes. La décharge étant extrêmement rapide, déclenchée vraisemblablement par une réponse de type influx nerveux au stress provoqué par la blessure, la mobilisation des éléocytes et des chloragocytes commence donc presque instantanément au cours des 3 à 6 premières heures.

La recharge des cellules au cours de la phase P 2 s'effectuerait alors que s'édifie le bouchon cicatriciel.

Le facteur sécrété pendant la phase P 3 agirait essentiellement au cours de stade V d'histolyse du bouchon cicatriciel, avec un délai de près de 2 jours à partir de son excrétion par les cellules, dans le cas de la régénération céphalique. Son activité histolytique s'étendrait ainsi sur une période de 2 jours (durée du stade V). Dans la régénération caudale, l'histolyse est plus longue (3 jours pour le stade V). Ceci s'explique si l'on admet que les phases P 2 et P 3 se chevauchent : toutes les cellules ne sécrètent pas en même temps. De plus la phase de sécrétion P 3 est plus longue. Il est possible que ce facteur histolytique soit éliminé par voie axonale, ce qui expliquerait cet assez long temps de latence. C'est d'ailleurs à ce stade que l'on observe les granulations à l'extrémité de la chaîne nerveuse.

Au cours de la phase P 4, s'effectueraient simultanément les synthèses et décharges d'un facteur trophique agissant sur la formation du régénérat proprement dit et son augmentation de taille.

En conclusion, on peut dire que les cellules des ganglions nerveux proches du front de section présentent un cycle sécrétoire net, lié aux différentes étapes de la régénération, aussi bien en direction céphalique que caudale. Bien que d'allures très voisines, ces cycles sont caractéristiques chacun d'un type de régénération.

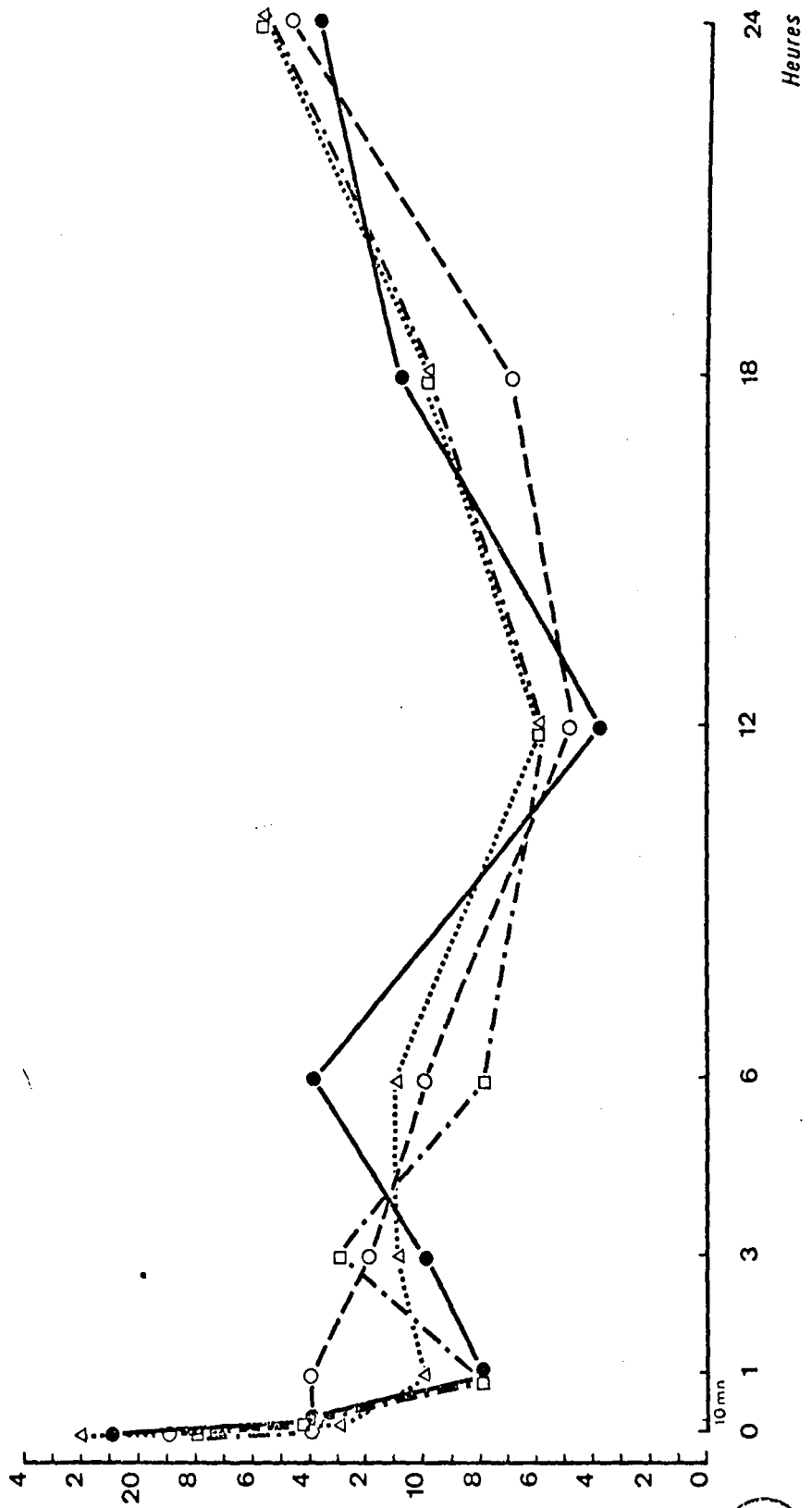
Figure 33 - Action de l'inhibiteur céphalique sur la régénération antérieure.

Evolution du nombre des cellules  $FP^+$  dans les quatre ganglions 8, 9, 10 et 11, au cours des 24 heures suivant la décapitation.

(Nombre total de cellules  $FP^+$  en ordonnées, temps en heures en abscisses).

- G 8
- G 9
- △..... G 10
- G 11

Nb tot. cell. FP\*



Chapitre 2

CYCLE SECRETOIRE EN PRESENCE D'INHIBITEUR CEPHALIQUE  
OU DE SUBSTANCE TROPHIQUE D'ORIGINE CAUDALE

Ayant mis en évidence un cycle bien particulier des cellules fuchsinophiles des ganglions ventraux au cours des premiers stades de la régénération normale, nous pouvons envisager ses modifications éventuelles lorsque l'on injecte des broyats à des vers décapités.

1 - Action de l'inhibiteur céphalique

Les comptages sont effectués aux mêmes temps après l'opération (résection des 7 premiers segments immédiatement suivie de l'injection du broyat de "têtes") que chez les témoins étudiés au chapitre précédent. Les résultats apparaissent dans le tableau XXIII (moitié gauche). Nous avons d'autre part tracé sur la Figure 33 les courbes des variations des nombres de cellules  $FP^+$  relevés dans les ganglions 8, 9, 10 et 11, pour la période de 0 à 24 h, en présence de l'inhibiteur céphalique.

Aussitôt après la section, on note une diminution du nombre des cellules colorées par la fuchsine analogue à celle que nous avons observée chez les témoins. Les photographies a et b de la Planche XXI sont relatives à des vers fixés 10 mn après l'opération : la comparaison avec la figure b de la Planche XVI (prise avant l'injection) permet d'apprécier cette diminution. Le minimum est cependant très vite atteint : 1 heure après l'opération. On peut d'ailleurs remarquer qu'au cours de cette période tous les ganglions ne se comportent pas de la même façon. Le ganglion G 9 (Figure c, Planche XXI) présente en effet un même nombre de cellules  $FP^+$  entre 10 mn et 1 h, tandis que les trois autres neuromères voient leur nombre continuer à diminuer. La photographie d de la Planche XXI, prise à 1 h, correspond à des cellules du ganglion G 8 dont le péricaryon possède des granulations plus ou moins denses (flèches). On remarque, dans le neuropile, d'assez nombreux trajets axonaux fuchsinophiles (Pl. XXI, fig. e).

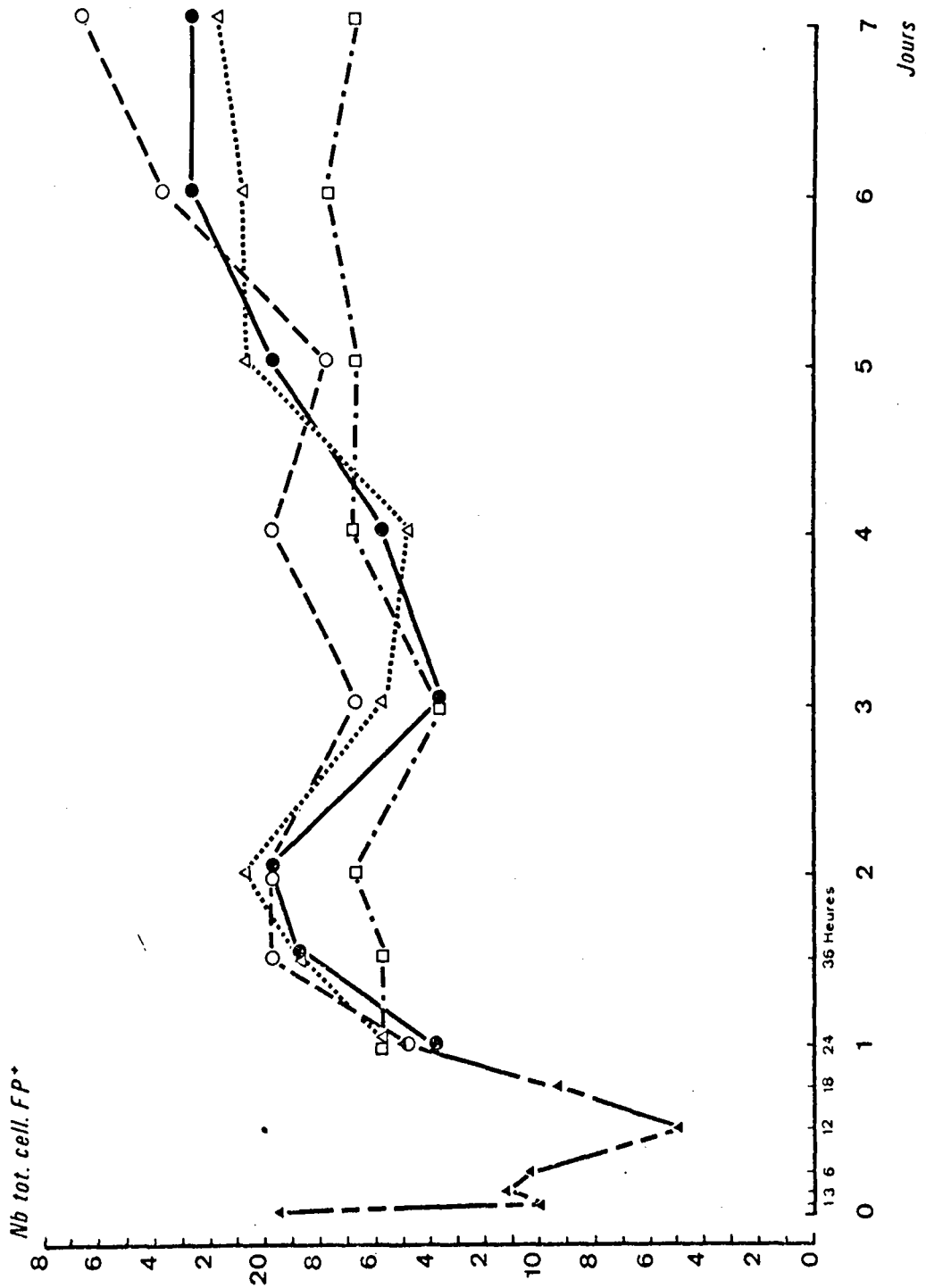
Entre 1 h et 6 h, l'ensemble des courbes présente manifestement un palier. Pendant cette période, il semble que le comportement sécrétoire de chaque ganglion soit perturbé. Dans le 9°, les cellules se déchargent

Figure 34 - Action de l'inhibiteur céphalique sur la régénération antérieure.

Evolution du nombre des cellules  $FP^+$  dans les ganglions 8 à 11, au cours des 7 jours suivant l'amputation.

(Seule la moyenne,  $\bar{m}$ , des quatre valeurs a été reportée pour les 24 premières heures).

- G 8
- G 9
- △ G 10
- G 11
- ▲  $\bar{m}$



régulièrement, mais lentement : la photographie a de la planche XXII montre bien cette diminution de la fuchsinophilie. Par contre, dans le G 8 le nombre de cellules  $FP^+$  du groupe antérieur (Cc) augmente (Pl. XXII, fig. b). L'état des cellules du 10° ganglion reste pratiquement stationnaire. Enfin, le nombre de neurones colorés par la fuchsine augmente de 1h à 3 h puis diminue fortement à partir de 3 h.

Dès la 6° heure, les courbes se régularisent et les 4 ganglions ont un comportement très comparable. On remarque une diminution du nombre des cellules jusqu'à un minimum atteint 12 heures après l'injection. A ce moment, les ganglions ont un nombre de cellules fuchsinophiles très voisin : entre 4 et 6 par neuromère. Un ganglion G 11 (photographie d sur la Planche XXII) montre en coupe parasagittale une cellule C 2 très fuchsinophile et un neurone (vraisemblablement une cellule C 3) dont le cytoplasme renferme quelques granules  $FP^+$  (flèches).

A partir de ce moment, le nombre des cellules en charge ne va cesser d'augmenter jusqu'à 48 h (Fig. 34), assez fortement pour les trois premiers ganglions, plus légèrement pour le quatrième. Les photographies c et e de la planche XXII et a de la Pl. XXIII ont été prises 24 heures après la section. Elles montrent un plus grand nombre de cellules sécrétrices. Certaines, cellules C 2 de la photo e, montrent un départ d'axone très fuchsinophile. On peut d'autre part observer dans le neuropile, des sections d'axones colorées par la fuchsine (photo a, Pl. XXIII, flèche). Les photographies prises 48 heures après l'opération montrent un nombre encore plus grand de cellules  $FP^+$  (Pl. XXIII, figs b et c par exemple) Certains neurones (Pl. XXIII, fig. d) présentent en outre des granules fuchsinophiles à l'intérieur de petites vacuoles (flèches).

Au-delà de ce maximum, obtenu 2 jours après l'opération, et pour lequel on relève des valeurs très proches de celles comptées avant la décapitation. (moyenne = 19,5 contre 19,7 au temps 0), l'ensemble des ganglions va présenter une décharge peu importante des cellules, le jour suivant.

Entre 3 et 7 jours, les cellules fuchsinophiles seront de plus en plus nombreuses dans les ganglions, sauf dans le 11° où leur nombre demeure à peu près stationnaire, voisin de 17. Le 7° jour, le comptage permet de constater un écart considérable entre les ganglions. En particulier, au niveau du 9° on enregistre une valeur très élevée que nous n'avons jamais observée chez les témoins (27 cellules fuchsinophiles) ; dans le 11°, par contre, le nombre des cellules fuchsinophiles reste à un niveau relativement moyen.



Figure 35 - Action de l'inhibiteur céphalique sur la régénération antérieure.

Courbe des valeurs moyennes ( $\bar{m}$ ) des quatre ganglions tracée pour la période de 0 à 7 jours.  
Quatre phases (P 1 à P 4), séparées par des flèches verticales, peuvent être déterminées.

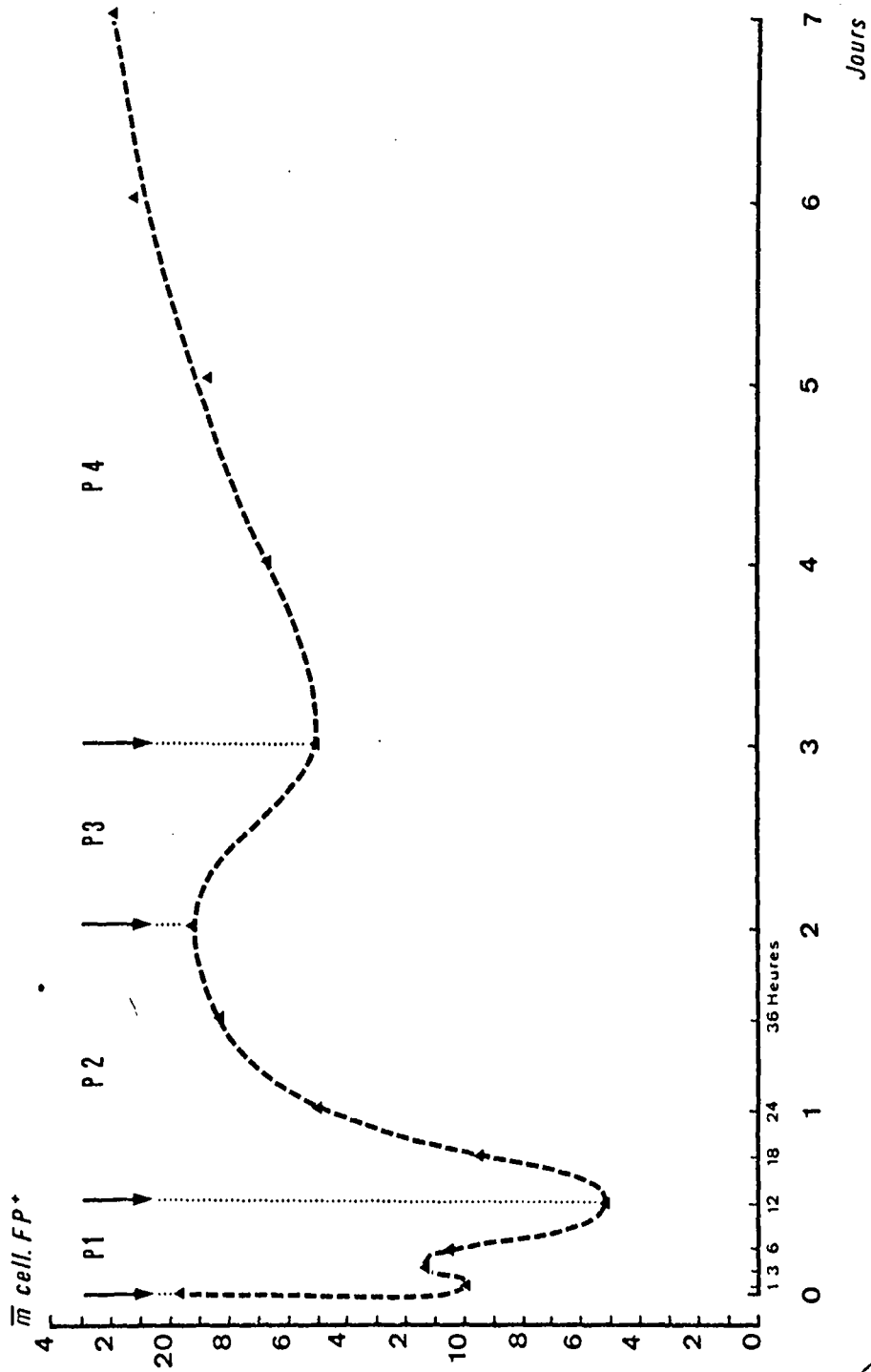




TABLEAU XXIII

EVOLUTION DU NOMBRE DES CELLULES FP<sup>+</sup> CHEZ DES VERS DECAPITES  
EN PRESENCE DE BROYATS DE TETES OU DE QUEUES

TEMPS	BROYAT DE TETES					BROYAT DE QUEUES				
	G 8	G 9	G 10	G 11	$\bar{m}$	G 8	G 9	G 10	G 11	$\bar{m}$
0	21	19	22	17	19,7	21	19	22	17	19,7
10 mn	14	14	13	14	13,7	15	20	17	17	17,2
1 heure	8	14	10	8	10,0	17	11	13	16	14,2
3	10	12	11	13	11,5	10	9	9	11	9,8
6	14	10	11	8	10,7	7	10	9	11	9,2
12	4	5	6	6	5,2	4	4	4	5	4,2
18	11	7	10	10	9,5	2	4	5	4	3,7
24	14	15	16	16	15,2	3	2	2	2	2,2
36	19	20	19	16	18,5	3	4	4	3	3,5
2 jours	20	20	21	17	19,5	3	4	4	4	3,7
3	14	17	16	14	15,2	6	5	4	7	5,5
4	16	20	15	17	17,0	12	10	10	11	10,7
5	20	18	21	17	19,0	16	11	13	15	13,8
6	23	24	21	18	21,5	18	17	16	15	16,5
7	23	27	22	17	22,2	18	19	16	17	17,5

Si l'on trace la courbe des valeurs moyennes (Fig. 35), on retrouve les 4 phases précédemment mises en évidence. Toutefois, ces phases du cycle sécrétoire sont nettement plus longues que chez les témoins (comparer avec la Figure 28, courbe des moyennes chez les témoins). La phase P 1, correspondant à la décharge du stock de cellules  $FP^+$ , s'étend jusqu'à 12 h au lieu de 3 h. D'autre part, au cours de cette phase, on peut remarquer que la quantité moyenne des cellules fuchsinophiles augmente légèrement entre 1 h et 3 h, avant de diminuer de nouveau jusqu'au minimum.

La phase P 2 dure 36 heures (de 12 h à 48 h), au lieu de 15 heures chez les témoins (de 3 h à 18 h). Par conséquent les cellules mettent plus de deux fois plus de temps pour se recharger en présence d'inhibiteur.

La phase P 3 est la moins perturbée : elle est à peine plus longue que chez les témoins (24 heures au lieu de 18 heures) ; la différence entre les points de départ et d'arrivée de cette phase ( $19,5 - 15,2 = 4,3$  cellules  $FP^+$ ) est du même ordre de grandeur que chez les témoins ( $20,0 - 14,7 = 5,3$ ). La substance trophique qui semble nécessaire pour histolyser le bouchon cicatriciel, étant libérée plus tardivement, l'histolyse subit de ce fait un retard, correspondant à celui que nous avons mis en évidence précédemment.

Contrairement à ce que l'on observe chez les témoins, la phase P 4 montre un accroissement du nombre des cellules  $FP^+$ . Ceci pourrait traduire une diminution de la libération de la substance trophique qui continuerait à être élaborée. Ce fait expliquerait d'une part le retard apporté à la formation du régénérat et d'autre part sa faible extension ultérieure en longueur.

Au total, par conséquent, la présence de substance inhibitrice modifie sensiblement le déroulement du cycle sécrétoire en augmentant la durée de chacune des phases, ce qui entraîne un ralentissement du processus de "prérégénération". Cette action se fait sentir dès la première phase (P 1) qui présente un blocage à partir de la première heure.

## 2 - Action de la substance trophique d'origine caudale

Les résultats des comptages des cellules fuchsinophiles des ganglions 8, 9, 10 et 11 de vers décérébrés et soumis à l'influence de la substance trophique d'origine caudale, sont transcrits dans la partie droite du tableau XXIII.

Figure 36 - Action d'un broyat de queues sur la régénération antérieure.

Evolution du nombre des cellules  $FP^+$  dans les quatre ganglions 8, 9, 10 et 11, au cours des 24 heures suivant la décapitation.

(Nombre total de cellules  $FP^+$  en ordonnées, temps en heures en abscisses).

- G 8
- G 9
- △ G 10
- G 11

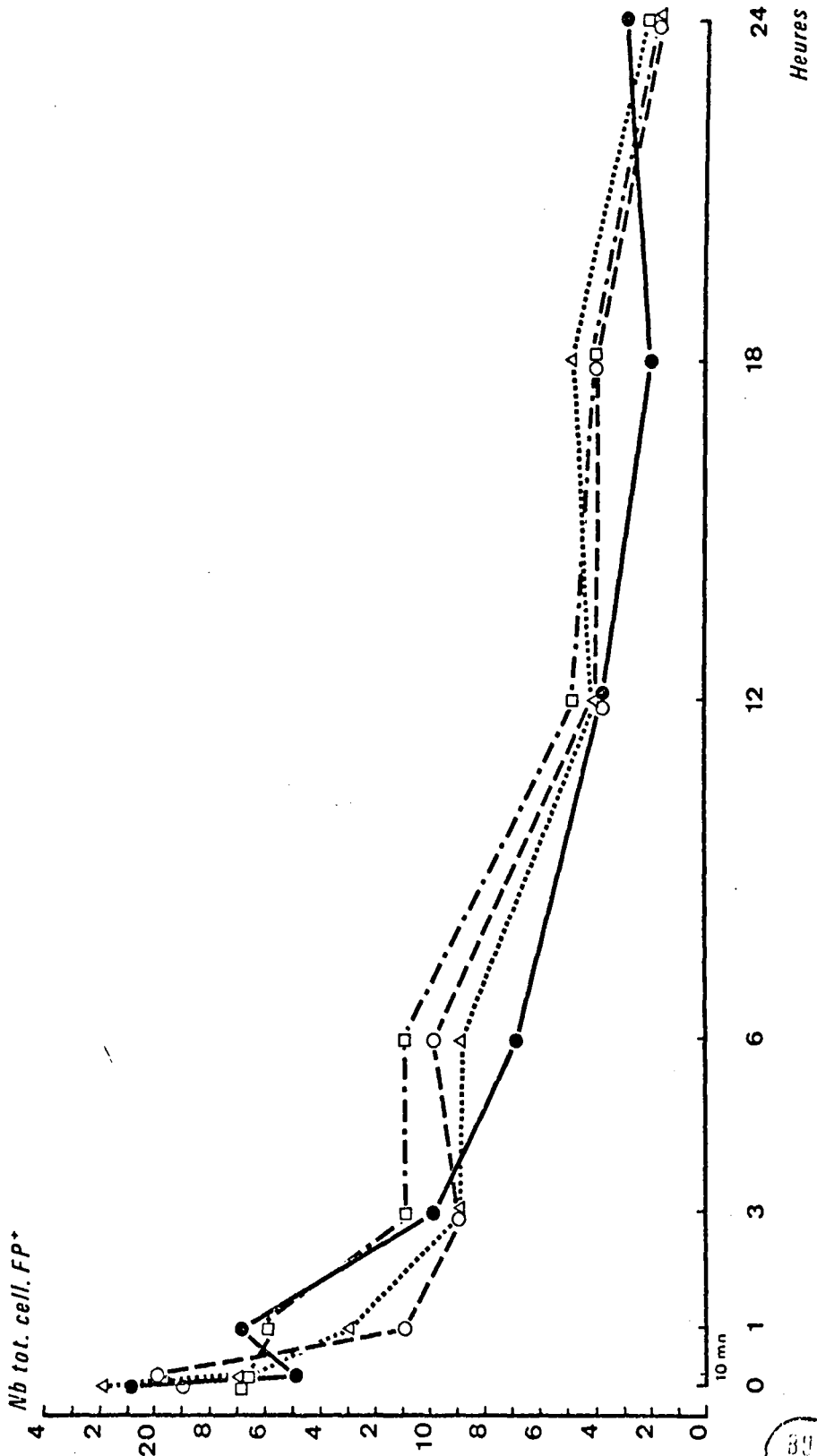


Figure 37 - Action d'un broyat de queues sur la régénération antérieure.

Evolution du nombre des cellules  $FP^+$  dans les ganglions 8 à 11, au cours des 7 jours suivant l'amputation.

(Seule la moyenne,  $\bar{m}$ , des quatre valeurs a été reportée pour les 24 premières heures).

- G 8
- G 9
- △ G 10
- G 11
- ▲  $\bar{m}$

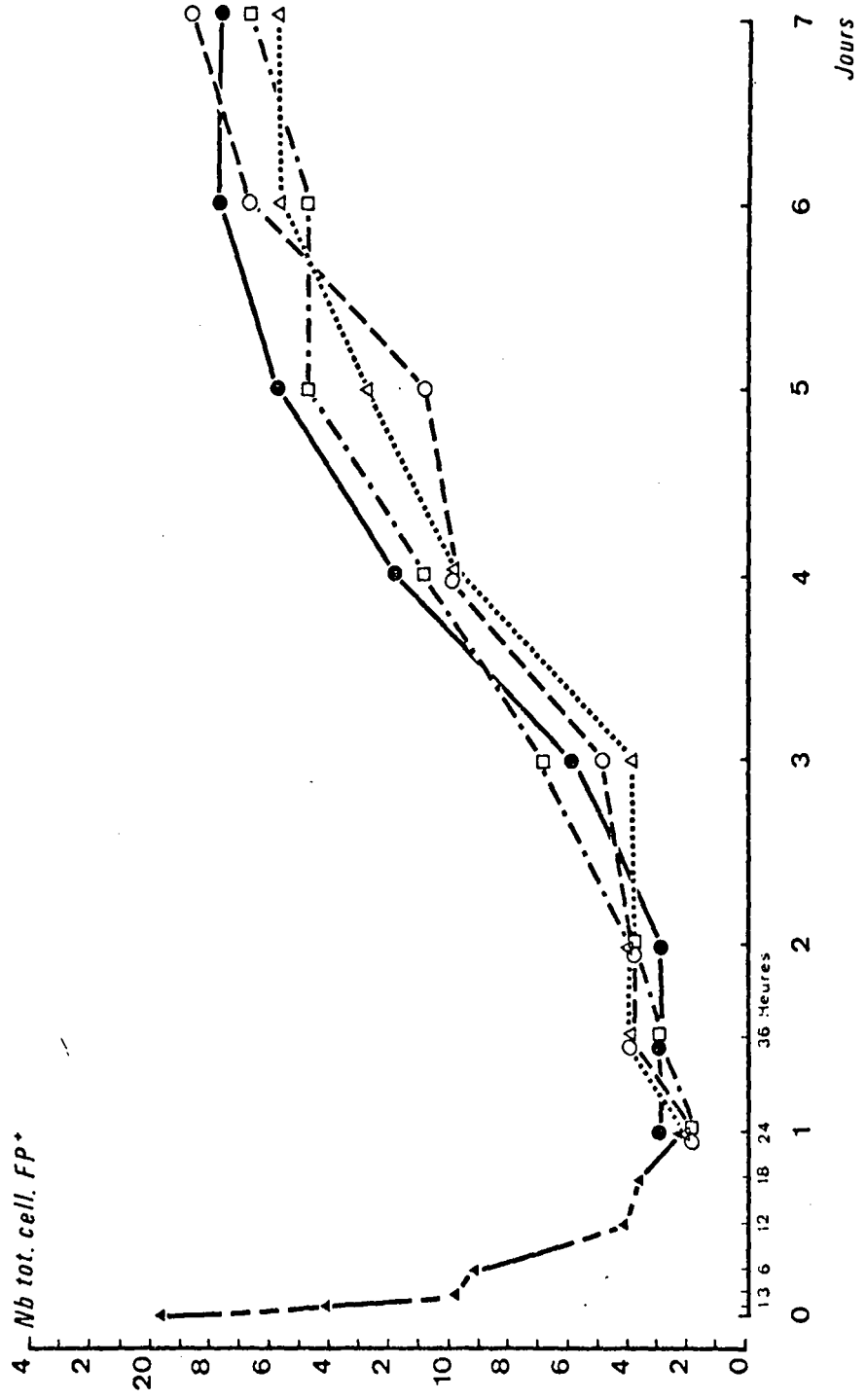
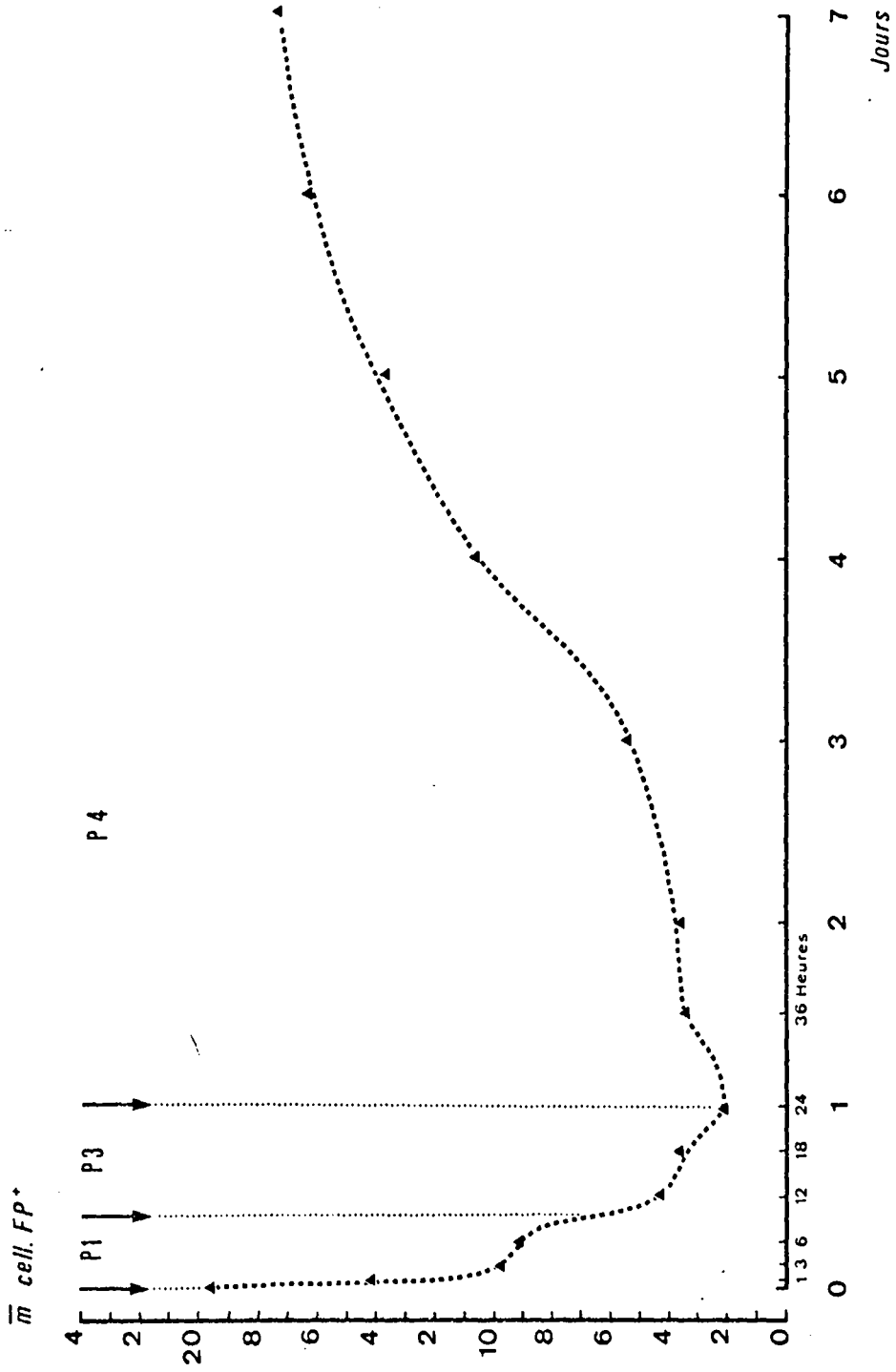




Figure 38 - Action d'un broyat de queues sur la régénération antérieure.

Courbe des valeurs moyennes ( $\bar{m}$ ) des quatre ganglions tracée pour la période de 0 à 7 jours. Trois phases seulement peuvent être déterminées. Les 2 phases de décharge P 1 et P 3 se font suite ; la phase P 2 de recharge des cellules sécrétrices n'existe pas. La phase P 4 est très longue.

Comparer avec les figures 28 (témoins) et 34 (action du broyat de têtes).



3778  
LILLE

Dix minutes après l'opération, le nombre des cellules FP<sup>+</sup> diminue légèrement (Fig. 36). Histologiquement, des cellules, par exemple celle de type C 2 photographiée en a et b sur la Pl. XXIV, présentent de petits granules dans des vacuoles cytoplasmiques. Au cours de la lère heure, cette diminution se ralentit beaucoup dans trois ganglions sur quatre. Le ganglion G 8 présente au contraire une augmentation nette du nombre de ces cellules, par exemple sur la photographie d où l'on voit de chaque côté un groupe de cellules de type C 4 et C 4 V. Des axones fuchsinophiles sont cependant visibles dans le neuropilè (flèches) et des granules sont présents dans certaines de ces cellules.

A partir de la première heure suivant l'opération, on constate un continuel et régulier amenuisement de la quantité de péricaryons FP<sup>+</sup>, jusqu'à la fin de la première journée. Les cytoplasmes ne sont plus uniformément fuchsinophiles mais renferment des granules (fig. c, Pl. XXIV). A ce moment, le niveau est extrêmement bas : à peine plus de deux cellules en moyenne par ganglion sont colorées par la fuchsine (par exemple fig. a, Pl. XXV). Il est remarquable, par ailleurs, que seuls demeurent visibles le plus souvent les gros neurones appelés C 2 par HERLANT-MBEWIS (Pl. XXV, fig. a). Une troisième cellule peut avoir une affinité pour la fuchsine. En position latéro-dorsale, au niveau du nerf segmentaire moyen, elle possède (Pl. XXV, fig. b) d'assez nombreuses granulations à l'intérieur de petites vacuoles (flèches). Dans certains cas, toutefois, le cytoplasme de ces cellules acquiert une affinité pour l'orangé G.

Dès le deuxième jour après l'opération, le nombre des cellules sécrétrices va de nouveau augmenter très régulièrement jusqu'au 7<sup>e</sup> jour. Les péricaryons se colorent alors uniformément par la fuchsine. Mais on peut aussi observer (Pl. XXV, fig. c) des cellules fuchsinophiles dont le cytoplasme renferme des granules.

Les courbes correspondantes tracées sur la Figure 37 montrent bien cette augmentation. Dans l'ensemble, les quatre ganglions évoluent d'une façon synchrone, et les nombres observés sont très voisins les uns des autres, à chaque comptage. Entre le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>e</sup> jour, l'augmentation est relativement discrète ; elle s'accroît nettement le jour suivant et le 5<sup>e</sup>, puis les 2 derniers jours, la courbe s'infléchit légèrement.

On peut donc tracer (Fig. 38) la courbe des variations chronologiques des moyennes. Elle s'éloigne considérablement des précédentes.

La comparaison avec la Figure 28, relative aux témoins et la Figure 35, présentant l'action du broyat de têtes, est significative. On ne retrouve absolument plus les quatre phases caractéristiques décrites précédemment. On peut toutefois essayer d'interpréter cette courbe de la manière suivante.

Le point d'inflexion situé entre 6 h et 12 h correspond à un changement de phase. Antérieurement à celui-ci se situe donc une phase P 1, analogue aux précédentes. Elle représente la décharge de cellules sécrétrices sous l'action du stress. La présence de substance trophique injectée, à laquelle s'ajoute le facteur sécrété, augmente considérablement son taux dans le liquide coelomique. Cette quantité importante de substance trophique, réagissant sur les neurones pourrait les empêcher de se recharger. Par suite, la phase suivante, P 2, serait sautée. Mais à partir de ce point, situé entre 6 h et 12 h, on note une nouvelle décharge de cellules, différentes par conséquent des précédentes. Elle correspond à la phase P 3 des témoins au cours de laquelle est mise en liberté la substance nécessaire à l'histolyse du bouchon cicatriciel. Cette phase se termine 24 heures après l'opération. Sa précocité par rapport aux témoins, ainsi que la présence de cette substance dans le broyat injecté, expliqueraient sa rapidité d'action et la plus grande vitesse d'histolyse du bouchon cicatriciel.

La majeure partie des cellules sécrétrices étant déchargées, débute la phase P 4 durant laquelle le stock de neurones fuchsinophiles se reconstitue jusqu'à atteindre, le 7<sup>e</sup> jour, un niveau voisin de celui des témoins. Cette remontée est lente : elle demande 6 jours. Il est vraisemblable qu'elle comporte simultanément une synthèse et une mise en liberté de substance trophique. Tout au long de cette phase, par conséquent, la quantité de ce facteur, constitué par l'apport expérimental auquel s'ajoute sa sécrétion, est élevée. Ceci expliquerait non seulement la plus grande vitesse de régénération, mais aussi la plus grande taille des régénérats obtenus.

### 3 - Conclusion

La comparaison de la courbe des moyennes, comptées chez les témoins (Fig. 28), avec celle des valeurs obtenues en présence d'inhibiteur céphalique (Fig. 35) est révélatrice d'une action indubitable de ce facteur sur le cycle sécrétoire des cellules de la chaîne ventrale. Bien

sûr, l'allure générale de ces cycles est comparable, ce qui est normal puisque la régénération n'est généralement pas empêchée par l'injection du broyat de têtes.

L'injection de substance trophique permet d'observer aussi (Fig. 38) une modification caractéristique du cycle sécrétoire.

On peut donc retenir de ces expériences les faits suivants :

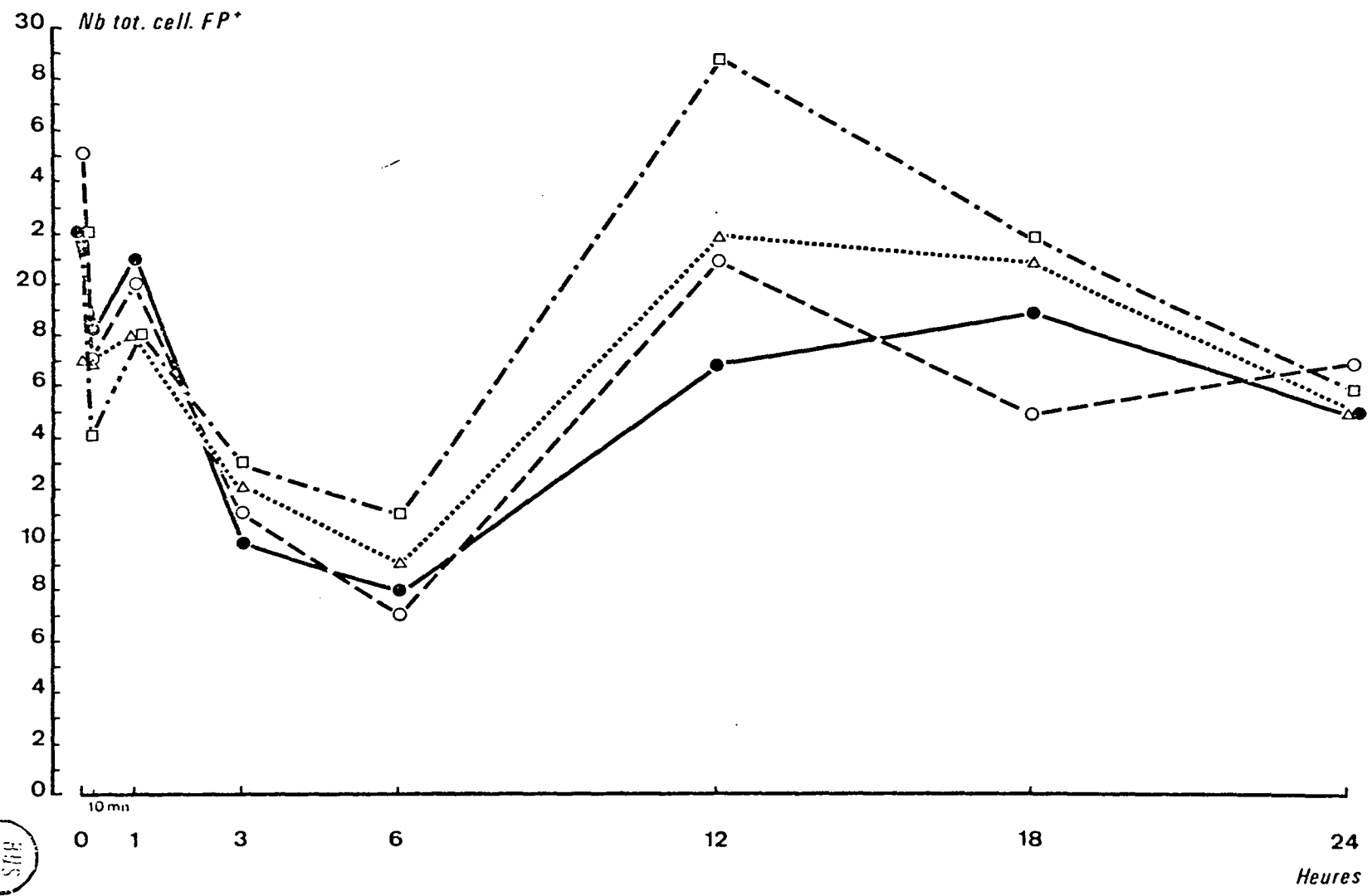
- 1 - Dans tous les cas, au tout début de la première phase, on note une diminution brutale et rapide du nombre des cellules fuchsinophiles. Cette décharge est, selon nous, imputable au stress provoqué par la blessure. Elle correspondrait à l'élimination, peut-être par voie humorale, d'une substance qui pourrait être responsable de la mobilisation des coelomocytes ; ceux-ci viendraient ainsi obturer la plaie, quelle que soit sa situation.
- 2 - La substance inhibitrice freine, par la suite, la décharge des neurones, ce qui se traduit par un ralentissement de la diminution du nombre des cellules colorées par la fuchsine. On observe alors des variations d'épaisseur du bouchon cicatriciel et des différences dans la nature des cellules libres impliquées.
- 3 - La seconde phase de décharge des cellules (P 3) qui suit une phase de synthèse dans les précédents neurones (P 2), semble intéresser une autre catégorie de cellules fuchsinophiles : ceci ressort de l'analyse de la courbe obtenue sous l'action du broyat de queues. La synthèse, qui s'effectue au cours de la phase P 2, semble être réglée par l'intermédiaire d'une rétro-action du taux de substance trophique dans le coelome sur les cellules de la chaîne nerveuse. Au cours de cette phase, la substance responsable de l'histolyse du bouchon cicatriciel serait sécrétée par des cellules qui pourraient être les neurones décrits par CHAPRON sous le nom de "type 3". La décharge se ferait par voie axonale jusqu'au niveau du bouchon cicatriciel ; la substance ne passerait que secondairement dans le liquide coelomique.
- 4 - Au cours de la 4<sup>e</sup> phase serait simultanément élaboré et sécrété un facteur intervenant sur la croissance du régénérat. Cette sécrétion s'arrête plus précocement en présence d'inhibiteur : au 6<sup>e</sup> jour, en effet, on relève dans ce cas un nombre de cellules fuchsinophiles voisin de celui compté avant l'amputation. Au contraire, ce nombre se situe, à partir du 6<sup>e</sup> jour, chez les témoins et chez les vers ayant reçu des injections de broyat de queues, à un niveau inférieur à celui obtenu avant l'opération. Les nombres relevés sont, d'autre part, identiques dans ces deux derniers cas.

Figure 39 - Action de l'inhibiteur caudal sur la régénération postérieure.

Evolution du nombre des cellules  $FP^+$  dans les quatre ganglions 47, 48, 49 et 50, au cours des 24 heures suivant l'opération.

(Nombre total de cellules  $FP^+$  en ordonnées, temps en heures en abscisses).

- G50
- -○ G49
- △····△ G48
- ·-□ G47



Chapitre 3

CYCLES SECRETOIRES EN PRESENCE D'INHIBITEUR ET DE  
SUBSTANCE TROPHIQUE AU COURS DE LA REGENERATION CAUDALE

Après avoir mis en évidence des différences significatives dans les cycles sécrétoires, sous différentes conditions expérimentales, au cours de la régénération céphalique, il convient d'envisager les résultats d'expériences similaires effectuées lors de la régénération postérieure.

1 - Action de l'homogénat de régions caudales

Dans cette première expérience, l'inhibiteur spécifique est apporté par un broyat de régions caudales, injecté dans les mêmes conditions que lors des séries expérimentales précédentes. .

Les nombres de cellules fuchsinophiles sont reportés dans le Tableau XXIV (partie gauche). Sur la Figure 39 ont d'autre part été tracées les courbes obtenues pendant les premières 24 heures. On peut remarquer une diminution du nombre des cellules colorées par la fuchsine dans les 10 premières minutes après l'opération (Pl. XXVI, fig. a), suivie aussitôt (à 1 h) par une légère augmentation de ce nombre. Les valeurs trouvées pour chaque ganglion sont très comparables entre elles. On peut néanmoins observer à ce stade des aspects de décharge (Pl. XXVI, fig. b). La cellule, de type C 2 (d'après la nomenclature d'HERLANT-MEEWIS), représentée sur la photographie, montre une substance fuchsinophile engagée dans la partie de l'axone proche du péricaryon, sur une longueur de 25  $\mu$  environ (flèche). Entre 1 h et 6 h après l'injection, le nombre des neurones fuchsinophiles diminue beaucoup dans chaque neuromère, jusqu'à atteindre en moyenne, à 6 h, les 2/5 de sa valeur initiale. La photographie c (Pl. XXVI) a été prise sur un animal fixé 3 heures après l'opération et montre, dans le groupe antérieur du ganglion 49, un petit nombre de cellules colorées par la fuchsine. Des granules FP<sup>+</sup> apparaissent au centre de petites vacuoles à contenu plus clair (figs d et e, Pl. XXVI). On peut aussi remarquer que, entre 1 h et 3 h, les ganglions les plus proches du front de section ont un moins grand nombre de cellules colorées. Ce qui semble traduire une décharge d'autant plus grande que ces cellules sont situées dans un neuromère plus proche de la blessure.

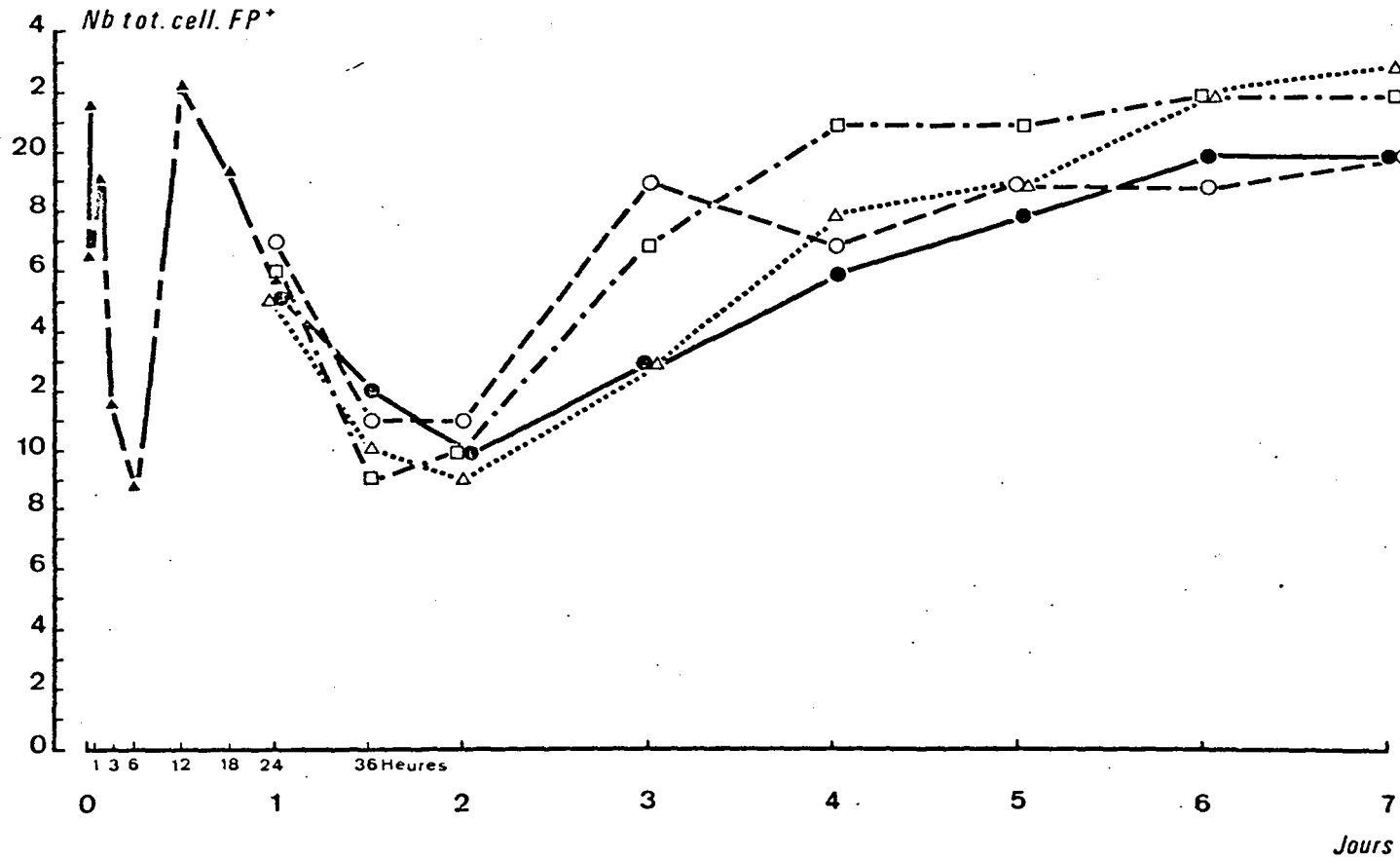


Figure 40 - Action de l'inhibiteur caudal sur la régénération postérieure.

Evolution du nombre des cellules  $FP^+$  dans les ganglions 47 à 50, au cours des 7 jours suivant l'amputation.

(Seule la moyenne  $\bar{m}$  des quatre valeurs a été reportée pour les 24 premières heures).

- G 50
- - - ○ G 49
- △·····△ G 48
- · - · □ G 47
- ▲- - - ▲  $\bar{m}$



A partir de ce minimum, qui se situe donc 6 heures après l'amputation et l'injection, le nombre des cellules fuchsinophiles va augmenter, d'une manière extrêmement rapide. En effet, douze heures après l'opération, ce nombre est légèrement supérieur en moyenne au nombre initial. Ces augmentations ne sont d'ailleurs pas identiques dans les quatre ganglions étudiés : le ganglion 47 par exemple atteint le chiffre considérable de 29 cellules  $FP^+$ , tandis que le G 50 n'arrive qu'à 17 cellules de ce type. La photographie f de la Planche XXVI montre une coupe parasagittale pratiquée dans le 47° ganglion. On peut remarquer la présence d'un flot de petites cellules fuchsinophiles en avant du nerf segmentaire moyen (groupe antérieur). Ces cellules mesurent environ 8  $\mu$  de long, alors que la cellule C 2 voisine atteint 16  $\mu$ . Par contre, la photographie a de la Pl. XXVII présente une coupe du ganglion 50 où, au même niveau, on ne voit pas de neurones de ce type. Les cellules fuchsinophiles que l'on peut y observer sont situées plus antérieurement et sont d'ailleurs plus grandes : elles mesurent 12  $\mu$  environ.

Le nombre des cellules va ensuite de nouveau diminuer, et les valeurs relevées dans les quatre ganglions vont se regrouper, au bout de 24 heures. La photographie b (Pl. XXVII) montre, sur une coupe parasagittale, très peu de cellules fuchsinophiles, dans le groupe antérieur. On peut observer, dans certaines de ces cellules, des granules à l'intérieur de petites vacuoles cytoplasmiques (figs c et d, Pl. XXVII), les cytoplasmes étant d'ailleurs plus ou moins fuchsinophiles, donc dans un état de charge plus ou moins important. La photographie d est particulièrement démonstrative à ce sujet, correspondant à 2 cellules voisines du même ganglion (G 49) chez le même individu fixé 24 heures après la section. Enfin on rencontre de nombreux trajets axonaux renfermant un matériel fuchsinophile dans le neuropile (Photo c, flèches). Cette diminution se poursuit le jour suivant (Fig. 40). En fait, un second minimum va être atteint dès 36 h, à peine supérieur au premier, constaté 6 heures après l'intervention. Entre 36 h et 2 jours, les chiffres varient peu. Et à partir du 2° jour, les courbes vont de nouveau traduire une augmentation plus ou moins régulière du nombre des cellules fuchsinophiles. On observe néanmoins des images de décharge (fig. e Pl. XXVII) : dans cette cellule, on peut noter la présence d'un granule  $FP^+$  engagé dans la partie proximale de l'axone (flèche). A la fin de l'expérience, qui a duré 7 jours, on compte en moyenne à peu près le même nombre de cellules colorées par la fuchsine qu'avant l'opération.

Figure 41 - Action de l'inhibiteur caudal sur la régénération postérieure.

Courbe des valeurs moyennes ( $\bar{m}$ ) des quatre ganglions tracée pour la période de 0 à 7 jours. Les quatre phases (P 1 à P 4) sont décelables mais le cycle est profondément modifié (comparer avec la courbe de la Fig. 31 relative aux témoins). Malgré un raccourcissement apparent, la 1<sup>o</sup> phase semble au contraire être prolongée en P'1 (courbe en pointillé). (Voir discussion p. 81).

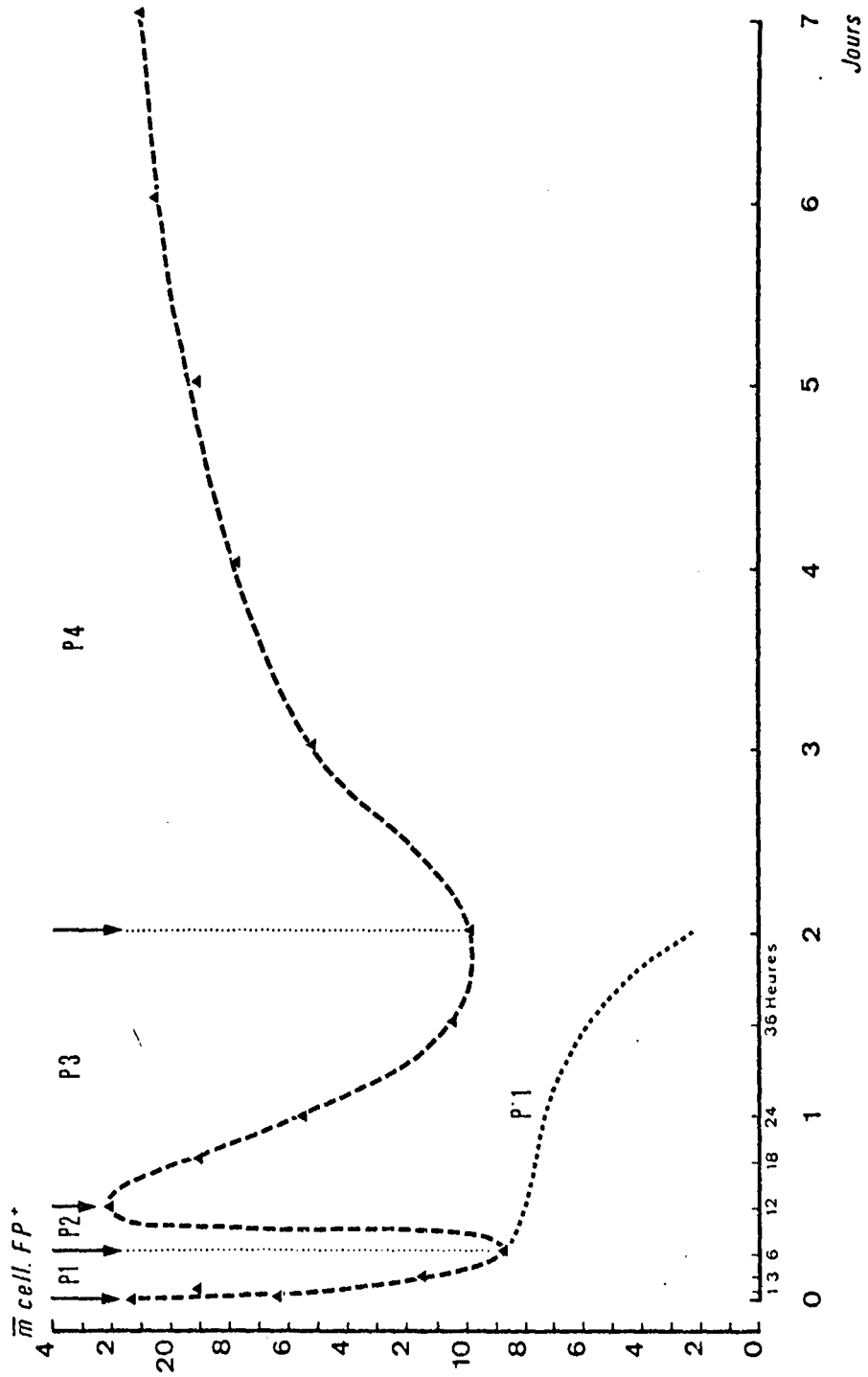




TABLEAU XXIV

EVOLUTION DU NOMBRE DES CELLULES  $FP^+$  CHEZ DES VERS AMPUTES DE LA QUEUE  
(INTERSEGMENT 50/51) EN PRESENCE DE BROYATS DE QUEUES OU DE TETES

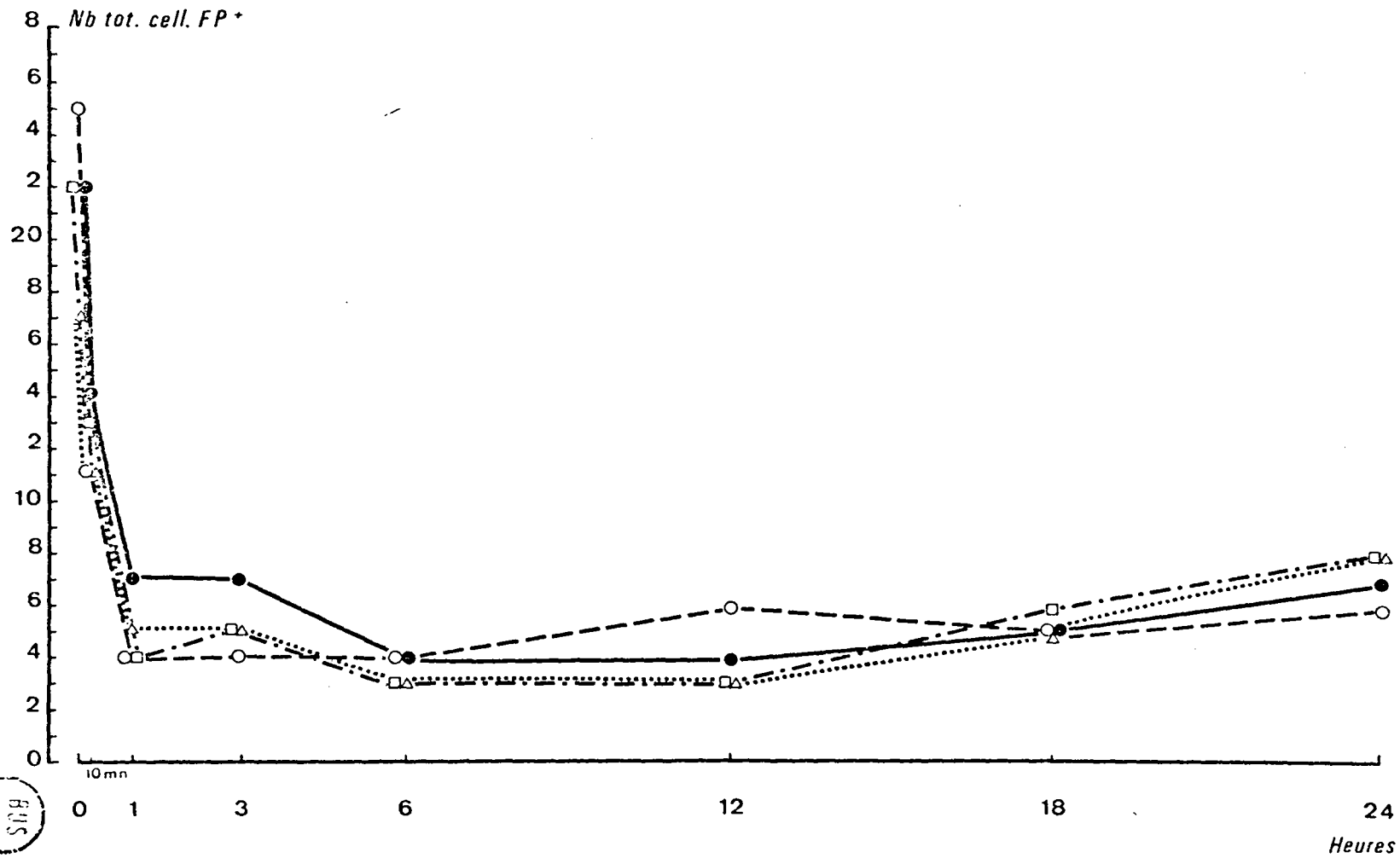
TEMPS	BROYAT DE QUEUES					BROYAT DE TETES				
	G 50	G 49	G 48	G 47	$\bar{m}$	G 50	G 49	G 48	G 47	$\bar{m}$
0	22	25	17	22	21,5	22	25	17	22	21,5
10 min	18	17	17	14	16,5	14	11	11	13	12,3
1 heure	21	20	18	18	19,3	7	4	5	4	5,0
3	10	11	12	13	11,5	4	4	5	5	5,3
6	8	7	9	11	8,8	4	4	3	3	3,5
12	17	21	22	29	22,3	4	6	3	3	4,0
18	19	15	21	22	19,3	5	5	5	6	5,3
24	15	17	15	16	15,8	7	6	8	8	7,3
36	12	11	10	9	10,5	13	12	13	12	12,5
2 jours	10	11	9	10	10,0	5	6	7	7	6,3
3	13	19	13	17	15,5	1	3	2	2	2,0
4	16	17	18	21	18,0	6	5	5	7	5,8
5	18	19	19	21	19,3	10	11	15	13	12,3
6	20	19	22	22	20,8	14	16	20	16	16,5
7	20	20	23	22	21,3	16	18	21	18	18,3

Figure 42 - Action du broyat de têtes sur la régénération postérieure.

Evolution du nombre des cellules  $FP^+$  dans les quatre ganglions 47, 48, 49 et 50, au cours des 24 heures suivant l'opération.

(Nombre total de cellules  $FP^+$  en ordonnées, temps en heures en abscisses).

- —● G 50
- - -○ G 49
- △ ····△ G 48
- - · - □ G 47





La courbe des valeurs obtenues en effectuant la moyenne entre les nombres trouvés pour chaque ganglion (Fig. 41) permet de reconnaître, ici encore, 4 phases dans ce cycle sécrétoire, après action du facteur inhibiteur d'origine caudale.

La première phase (P 1) est très courte - elle dure 6 heures - et présente un pic intermédiaire, 1 heure après l'opération. Au cours de cette phase, les cellules se déchargent sous l'effet du stress.

La phase P 2, caractérisée par une élaboration active des produits fuchsinophiles, est elle aussi très courte ; elle ne dure que 6 heures. A l'issue de cette phase, on retrouve un nombre moyen de cellules sécrétrices du même ordre de grandeur qu'avant l'expérience (respectivement 22,3 et 21,5).

La 3ème phase (P 3) dure 1 jour 1/2. Pendant celle-ci, les cellules sécrétrices se déchargent. Le minimum (10,0), atteint à la fin du 2° jour, est à peine supérieur à celui observé à l'issue de la phase P 1 (nombre moyen  $\pm$  8,8 à 6 h).

Enfin, durant la dernière phase (P 4) se reconstitue le stock de cellules sécrétrices. Cette augmentation demande un temps assez long (5 jours) à l'issue duquel on observe un nombre de neurones fuchsinophiles aussi grand qu'avant l'expérience : 21,3 chez les vers injectés, âgés de 7 jours, contre 21,5 initialement.

Au total, l'injection d'inhibiteur caudal modifie très nettement le cycle sécrétoire mais avant de discuter et d'essayer d'interpréter les résultats nous allons envisager l'action du broyat de régions céphaliques.

## 2 - Action de l'homogénat de régions céphaliques

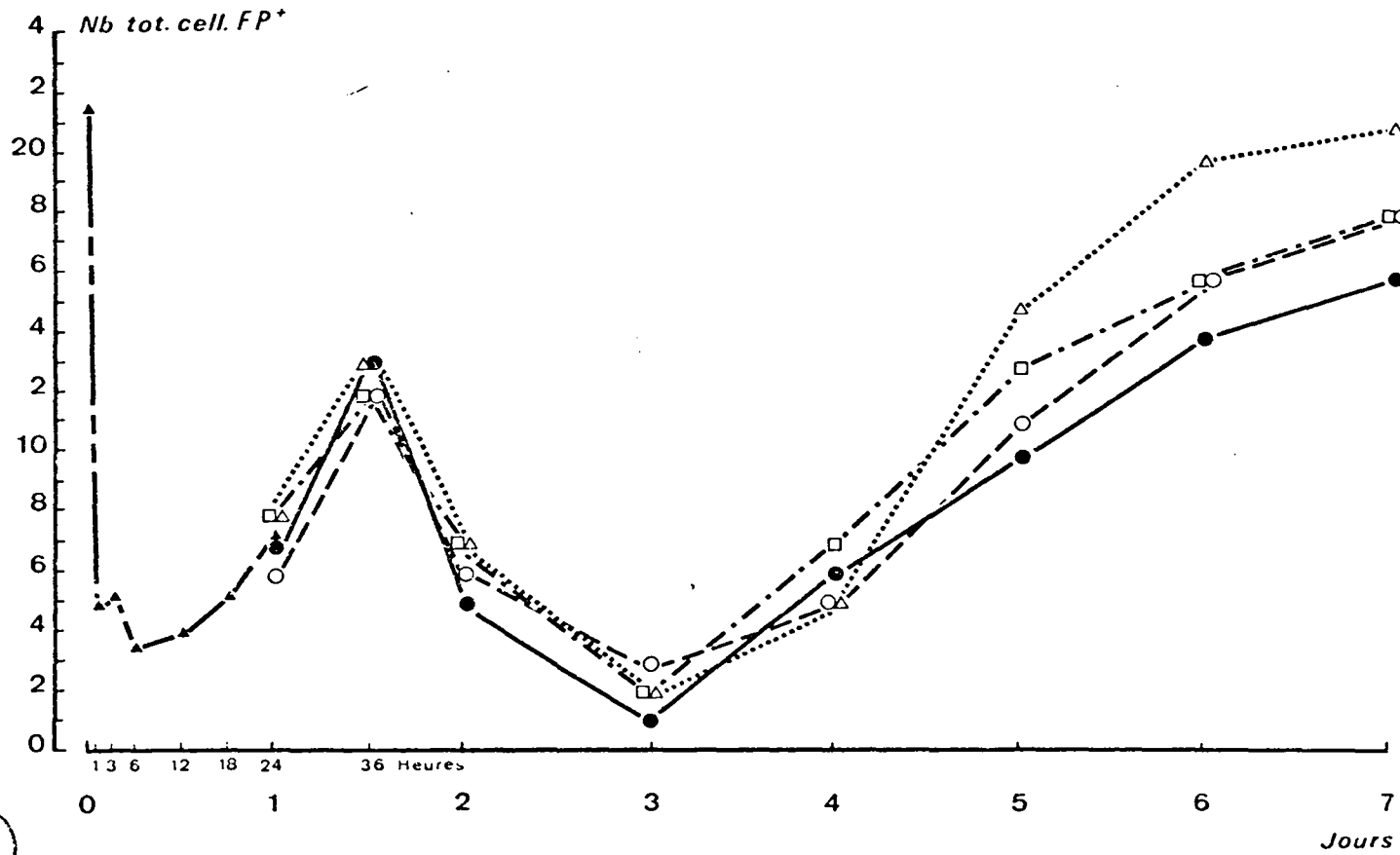
Les résultats des comptages, pour cette série expérimentale, figurent dans la partie droite du Tableau XXIV. La Figure 42 représente d'autre part les variations de ces nombres au cours des 24 heures suivant l'opération, pour les 4 ganglions 47, 48, 49 et 50. Ces courbes ont une allure en "L" et les points sont très groupés. On note, comme à l'ordinaire, une brusque diminution du nombre des cellules fuchsinophiles pendant la première heure. La photo a de la Pl. XXVIII montre, sur une coupe transversale pratiquée dans le 50° métamère, 10 minutes après l'opération, une cellule fuchsinophile en position latérale, et ventralement un gros péri-caryon dans lequel on peut observer d'assez nombreuses granulations fuchsinophiles. De même, un opéré d'1 heure a un petit nombre de cellules colo-

Figure 43 - Action du broyat de têtes sur la régénération postérieure.

Evolution du nombre des cellules  $FP^+$  dans les ganglions 47 à 50, au cours des 7 jours suivant l'amputation.

(Seule la moyenne  $\bar{m}$  des quatre valeurs a été reportée pour les 24 premières heures).

- G 50
- - -○ G 49
- △·····△ G 48
- · -□ G 47
- ▲- - -▲ m



rées en violet (fig. c, Pl. XXVIII) dont certaines possèdent seulement quelques granulations dans leur cytoplasme (Pl. XXVIII, fig. d, flèche).

Entre 1 h et 3 h on peut noter la présence d'un plateau. Celui-ci se situe à des valeurs comprises entre 4 et 7 cellules FP<sup>+</sup>, le 50° ganglion restant le plus riche. Une coupe frontale, au niveau de ce ganglion, montre (Pl. XXVIII, fig. b) un petit groupe de 3 ou 4 cellules, situé postérieurement et dont le cytoplasme est faiblement fuchsinophile, ou (Pl. XXVIII, fig. e) contient des granulations présentant une forte affinité pour la fuchsine.

A partir de 3 h, les nombres recommencent à décroître, jusqu'à 6 h où se situe un minimum. Les cellules sécrétrices possèdent, là encore, des granulations dans leur cytoplasme : la photographie a de la Pl. XXIX présente une cellule C 2 (suivant HERLANT-MEEWIS) tandis que la photographie b montre une cellule du groupe antérieur. Toutefois les différences entre les valeurs observées entre 3 h et 6 h sont faibles : moins de deux cellules fuchsinophiles en moyenne entre ces deux comptages.

Dans les blastèmes âgés de 12 heures, nous n'avons pas trouvé de grandes différences par rapport au matériel fixé à 6 h (Pl. XXIX, fig. c) ; seul le 49° ganglion possède un nombre légèrement supérieur à celui qui avait été compté précédemment (6 au lieu de 4). Il est fort possible d'ailleurs que ce faible écart ne soit pas significatif.

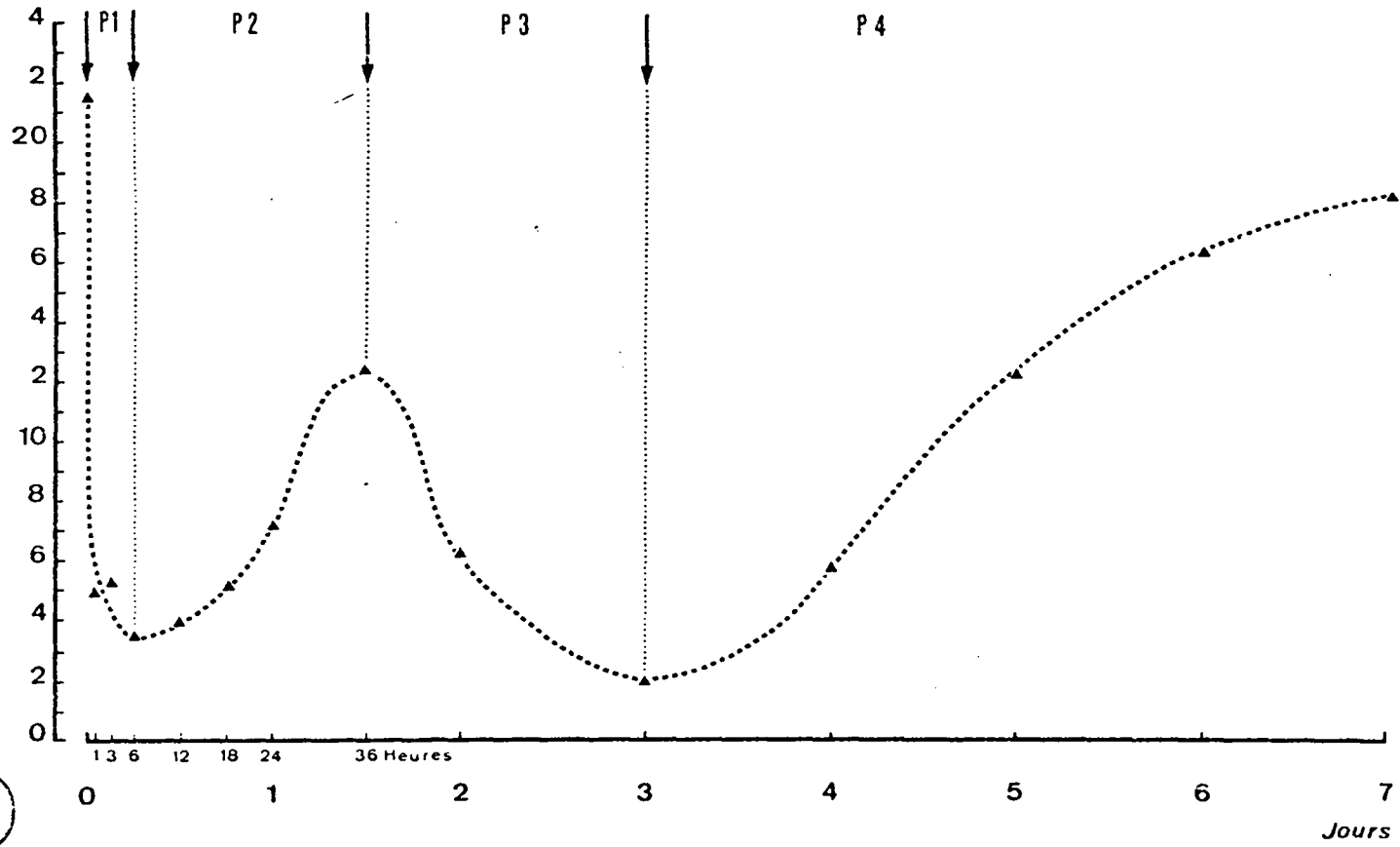
A partir de 12 h, les courbes vont présenter une pente positive ; les comptages effectués 24 heures après l'intervention indiquent un doublement du nombre des cellules fuchsinophiles par rapport au minimum situé à 6 h. La photographie d, prise sur un opéré de cet âge, montre que l'on peut rencontrer des neurones colorés par la fuchsine dans le groupe antérieur (cellules C 1 et chromophiles d'après HERLANT-MEEWIS), ce que nous n'avons jamais observé à 6 h.

Le nombre de cellules sécrétrices, réparables par la fuchsine, va continuer d'augmenter jusqu'à 36 h (Fig. 43), moment auquel les 4 courbes présentent un pic. Les valeurs observées y sont très homogènes. Au microscope, le ganglion 50 montre (Pl. XXIX, figs e et f), plusieurs petites cellules nettement fuchsinophiles dans la partie située entre le nerf antérieur et le nerf moyen (groupe antérieur). Ce même ganglion possède des cellules C 2 à la base du nerf segmentaire moyen, très fortement fuchsinophiles. A côté de l'une d'entre elles (Pl. XXX, fig. a), aisément

Figure 44 - Action du broyat de têtes sur la régénération postérieure.

Courbe des valeurs moyennes ( $\bar{m}$  en ordonnées) des quatre ganglions tracée pour la période de 0 à 7 jours. On peut déceler, comme précédemment, quatre phases (P 1 à P 4). Ce cycle est très comparable à celui des témoins (voir Fig. 31). Toutefois, la phase P 2 est abrégée par une décharge importante du matériel  $FP^+$  (minimum très bas en fin de P 3). La recharge, au cours de la dernière phase (P 4), est assez rapide de sorte que la fin de cette phase est très analogue à celle observée chez les témoins.

$\bar{m}$  cell. FP<sup>+</sup>



identifiable, il existe un gros neurone dont le péricaryon renferme un certain nombre de granulations (même photo, flèche) colorées par la fuchsine.

Deux jours après l'injection, le nombre de cellules fuchsine-positives diminue de nouveau. A l'emplacement des petites cellules du groupe antérieur on ne repère plus d'affinité pour la fuchsine (Pl. XXX, fig. b). A proximité cependant, une cellule d'assez grande taille (peut-être une C 1 d'après la nomenclature d'HERLANT-MEEWIS) possède (Pl. XXX, fig. d) un cytoplasme vacuolisé et, au centre de chaque petite vacuole, un granule (flèche sur photo id.).

Le jour suivant, c'est-à-dire 3 jours après l'amputation et l'injection, il ne reste pratiquement plus que 2 cellules, en moyenne, colorées par la fuchsine. Une coupe frontale (Pl. XXX, fig. c) montre que ces cellules ne sont autres que les C 2.

A partir du 4<sup>o</sup> jour, le nombre de cellules sécrétrices va augmenter progressivement de façon à atteindre, le 7<sup>o</sup> jour, environ les 4/5 du nombre initial, compté avant toute opération : on trouve respectivement, en moyenne, 18,3 et 21,5. On peut noter cependant que les valeurs sont beaucoup moins groupées au fur et à mesure que le temps s'écoule. D'autre part, le ganglion le plus proche du front de section (G 50) possède, à la fin de l'expérience, le moins de cellules fuchsinophiles. L'écart avec le ganglion le mieux pourvu est assez considérable à cette date :  $21-16 = 5$ .

La courbe des valeurs moyennes (Fig. 44) montre l'allure du cycle sécrétoire, sous l'action du broyat de têtes, au cours duquel nous retrouvons les 4 phases précédemment déterminées. La première de celles-ci (P 1) dure 6 heures. La diminution du nombre des cellules  $FP^+$  y est rapide mais est marquée par un ralentissement important à 3 h.

La seconde phase (P 2), ascendante, correspond à une augmentation du nombre des cellules sécrétrices en charge. Le maximum est obtenu 36 heures après l'opération et marque la fin de cette phase.

Fait suite la phase P 3, qui va se terminer trois jours après l'opération. Elle représente une nouvelle décharge qui correspond à une diminution considérable du nombre des cellules fuchsinophiles : à ce moment, les cellules C 2 sont à peu près les seules à contenir des éléments ayant une affinité pour la fuchsine.

Enfin, la 4<sup>o</sup> phase va permettre aux neuromères de reconstituer, pendant 4 jours, leur stock de cellules FP<sup>+</sup>, par conséquent d'élaborer des produits de sécrétion. Ces neurones, toutefois, sont en nombre moindre en fin d'expérience qu'avant l'opération.

### 3 - Discussion et Conclusion

Les résultats que nous venons d'exposer dans ce chapitre montrent que le cycle sécrétoire, caractéristique de la régénération caudale, est modifié, dans les quatre ganglions proches du front de section postérieur, chez les vers soumis à l'influence d'un broyat de régions caudales ou de régions céphaliques.

Par conséquent, l'inhibiteur contenu dans la queue ralentit, dans nos expériences "in vivo", la régénération en intervenant, semble-t-il, sur le cycle de la sécrétion trophique. Les phases de ce cycle apparaissent considérablement plus courtes que chez les témoins. La 1<sup>o</sup> phase, au cours de laquelle la plupart des cellules se déchargent en 12 heures, chez les témoins, est alors deux fois plus courte. Le ralentissement observé entre 3 et 6 h chez les témoins est beaucoup plus important en présence de broyat de queues. Ces vers possèdent, en effet, à ce moment, un peu plus de 4 fois plus de cellules colorées que les témoins, à l'issue de cette même phase.

La phase P 2 est encore beaucoup plus raccourcie. Alors que chez les témoins 36 heures sont nécessaires pour qu'une douzaine de cellules soient rechargées (de 2 en fin de P 1 à 15 en fin de P 2), chez les opérés injectés ce temps est réduit à 6 heures, pour un même accroissement (de 9 cellules en fin de P 1 à 22 en fin de P 2).

La durée de la phase P 3 est à peu près identique dans les deux cas (respectivement 36 et 48 h), mais les différences entre les nombres de cellules fuchsinophiles comptées au début et à la fin de cette phase ne sont pas du tout comparables. Il y a disparition de la fuchsinophilie dans 4 cellules en moyenne chez les témoins contre 12 chez les vers injectés.

Ce raccourcissement des phases du cycle sécrétoire, chez les sujets soumis à l'action de l'inhibiteur, paraît au premier abord contredire les observations in vivo, c'est-à-dire l'allongement du temps de régénération (1<sup>o</sup> Partie, Ch. 5).



TABLEAU XXV

CONCORDANCE ENTRE LES NOMBRES DE CELLULES FP<sup>+</sup> CHEZ  
LES TÉMOINS ET LES VERS INHIBES

	Témoins	Vers ayant reçu du broyat de queues	Ecart par rapport aux témoins
P 1 {	début	21	
	fin	2	
	diminution	<u>19</u>	
		21	
		9	
		<u>12</u>	+ 7
P 2 {	début	2	
	fin	15	
	augmentation	<u>13</u>	
		9	
		22	
		<u>13</u>	0
P 3 {	début	15	
	fin	11	
	diminution	<u>4</u>	
		22	
		10	
		<u>12</u>	- 8



Il semble que l'on puisse expliquer cette anomalie en considérant les différences entre les nombres de cellules comptés pour les trois premières phases (Tableau XXV).

En phase P 1, chez les témoins, on note une diminution de 19 cellules fuchsinophiles, contre 12 seulement chez les vers injectés ; il en reste donc 7 en charge chez ceux-ci.

Au cours de la 2<sup>o</sup> phase, les augmentations sont identiques dans les deux cas. Lors de la phase P 3, on note une nouvelle diminution : de 3 cellules, chez les témoins, et de 12 chez les sujets inhibés, soit un écart de 8, au bénéfice des témoins, cette fois. On peut donc penser que les vers injectés ont rattrapé, avec la décharge de ces 8 cellules supplémentaires, le retard de 7 cellules qu'ils avaient par rapport aux témoins, en fin de phase P 1. Par conséquent, lorsqu'au cours de la phase P 3, les vers présentent une décharge de 12 cellules, celle-ci correspond en fait à la mise en liberté de la substance qui aurait dû être émise en phase P 1 et, simultanément, à la sécrétion du facteur propre à la phase P 3.

Au total, l'injection de substance inhibitrice bouleverse considérablement le cycle sécrétoire de la chaîne nerveuse, entraînant finalement, et contrairement aux apparences, un allongement important de la phase P 1. On peut estimer que cette prolongation (courbe en pointillé), que l'on peut appeler P'1, se termine 2 jours après l'opération, lorsque la courbe (Fig. 41) présente un minimum. La seconde phase de libération de substance (P 3) arrive beaucoup trop tôt pour être <sup>très</sup> efficace. La conjonction de ces deux phénomènes explique le retard pris par les processus de régénération en présence d'inhibiteur.

Le cycle observé chez les vers ayant reçu du broyat de têtes est très comparable à celui des témoins. La phase P 1 est dans les deux cas très semblable : le minimum est toutefois un peu <sup>plus</sup> faible chez les vers témoins. Cette identité explique donc la similitude de la mise en place du bouchon cicatriciel.

La seconde phase débute dans les deux lots de la même façon ; les courbes sont presque superposables jusqu'à 36 h. Mais, à partir de cette date, l'injection de broyat céphalique entraîne une décharge précoce des cellules vraisemblablement responsables de l'élaboration de la substance nécessaire à l'histolysse du bouchon cicatriciel, bien avant que le

stock soit reconstitué. Le minimum observé par conséquent à 3 jours, en fin de P 3, est beaucoup plus faible que le minimum correspondant des témoins. Néanmoins, la précocité relative de cette décharge ne paraît pas influencer sur le comportement du régénérat, comme nous avons pu l'observer in vivo (1° Partie) et au cours de l'étude histologique (2° Partie).

A partir du 5° jour, les courbes sont de nouveau très semblables et, en fin d'expérience, les nombres de cellules fuchsinophiles sont dans les deux cas du même ordre de grandeur. Cette nouvelle similitude explique que les processus de la régénération soient tout à fait comparables chez les témoins et chez les vers auxquels a été injecté le broyat de têtes.

En définitive, l'apport de broyat de queues, ralentit la régénération caudale en agissant sur la cycle sécrétoire des cellules de la chaîne nerveuse proche du front de section. En particulier, la phase initiale de libération de substance trophique est fortement allongée, tandis que la seconde, déclenchée prématurément, se superpose à la précédente.

L'injection du broyat céphalique, au contraire, perturbe seulement la seconde phase de sécrétion, en la déclenchant plus tôt que chez les témoins. Une régulation, par ailleurs, s'effectue, rétablissant ainsi le taux de cellules fuchsinophiles et donc l'élaboration de substance trophique, dès le 5° jour. Cette perturbation ne modifie donc pas le déroulement normal de la régénération : la substance d'origine céphalique n'a pas d'effet trophique sur cette régénération.

DISCUSSION ET CONCLUSION  
DE LA TROISIEME PARTIE

L'étude histologique de la chaîne nerveuse exposée dans cette troisième partie de notre travail a permis de mettre en évidence, dans les ganglions proches du front de section, les phénomènes suivants :

- 1 - Un cycle sécrétoire caractéristique de la régénération céphalique ou caudale existe au niveau des neurones fuchsino-philes de la chaîne ganglionnaire ventrale.
- 2 - Une perturbation de ces cycles peut être provoquée, dans chacun de ces types de régénération, par l'apport de substance inhibitrice spécifique.
- 3 - L'injection de "substance trophique" modifie seulement le cycle sécrétoire au cours de la régénération céphalique.

Pendant la régénération postérieure, des modifications ont déjà été observées dans les cellules ganglionnaires des dix derniers segments précédant le front de section, chez Eophila pyrenaica (JUBERTHIE et MESTROV, 1965). Ces auteurs ont noté en effet, chez cette espèce amphodyname, une augmentation du nombre de certaines "cellules neurosécrétrices" et une accumulation du produit de sécrétion au front de section. De plus les cellules névrogliales de la chaîne peuvent acquérir une forte activité sécrétrice.

De leur côté, HERLANT-MEEWIS et GALLARDO (1965) ont remarqué, chez les jeunes Eisenia foetida en régénération, une activation des cellules C 1 et C 2, immédiatement après la section. Les adultes montrent un "déblocage" de ces mêmes cellules C 1 et C 2 pendant la formation du bouchon cicatriciel : des granules redeviennent visibles dans le péricaryon et l'axone. Pour ces auteurs, cette activité se manifeste uniquement pendant la cicatrisation et la formation du blastème.

Nos résultats confirment donc ceux exposés par ces différents auteurs. Cependant, il convient de remarquer que nos observations permettent de préciser les variations chronologiques du nombre des cellules sécrétrices pendant les premiers stades de la régénération. Cette population

de neurones fuchsino-philes, envisagées dans son ensemble, nous a montré une succession de diminutions et d'accroissements, donnant ainsi la possibilité de détecter quatre phases distinctes.

Evidemment, la technique des comptages que nous avons utilisée ne nous permet pas de tenir pour définitifs les nombres de cellules FP<sup>+</sup> trouvés pendant ces stades, car il aurait fallu effectuer au moins une vingtaine de dénombrements à chaque temps pour leur attribuer une valeur statistique sûre. Néanmoins, l'allure générale des courbes obtenues est certainement vraie. Et le découpage du cycle sécrétoire, au cours de la régénération normale, en 4 phases nous paraît légitime, car il est confirmé par les observations effectuées après action des substances inhibitrice ou trophique aussi bien pendant la régénération d'une tête que d'une queue.

Chez les Annélides Polychètes, les recherches de DHAINAUT-COURTOIS et WAREMBOURG (1967) et WAREMBOURG (1968) ont montré des phénomènes comparables. Trois groupes de cellules sont mis en évidence dans la chaîne nerveuse de Nereis pelagica ; certains présentent des variations en relation avec la régénération. Quelques secondes après la section, certaines cellules sécrétrices FP<sup>+</sup> se déchargent sous l'effet, semble-t-il, du stress. Peu de temps après l'amputation de la queue, les cellules névrogliques de la chaîne montrent une grande activité sécrétoire. Augmentant de volume, elles sont fortement colorées par la fuchsine. Les neurones "ordinaires" présentent aussi des signes d'activité en relation avec la régénération. Le résultat est une augmentation du nombre des cellules fuchsino-philes.

CHAPRON (1969 a, b), chez Eisenia foetida unicolor, a observé au microscope électronique, dans le péricaryon de certains neurones, des granulations de taille identique à celles qu'il retrouve dans les fibres nerveuses au niveau du bouchon cicatriciel. Pour cet auteur, ces granulations représentent une substance responsable de l'histolyse du bouchon cicatriciel.

Cet ensemble de résultats, relativement cohérent, permet donc d'interpréter les variations des nombres de cellules fuchsino-philes, que nous avons enregistrées, comme le résultat d'un cycle sécrétoire en relation avec la régénération, chez Eisenia foetida.

L'injection de substance inhibitrice spécifique modifie dès le début l'allure du cycle. Dans l'ensemble, les durées des phases sont allongées. De plus, au cours de la régénération caudale, la seconde phase se superpose à la première. De la sorte, la phase P 3 se place trop tôt pour être <sup>très</sup> efficace. Il en résulte, dans tous les cas, un ralentissement important de la régénération aussi bien en vitesse qu'en grandeur de la prestation.

L'apport de substance trophique supprime la phase P 2 d'élaboration et donc de recharge des cellules, dans le cas de la régénération antérieure. Par contre la phase P 3 existe et semble normale. On peut donc penser que les cellules impliquées dans la synthèse de la substance sécrétée au cours de cette phase sont différentes de celles responsables de la décharge observée en P 1.

Ces observations permettent seulement de dire qu'un cycle sécrétoire, en relation avec la régénération céphalique ou caudale, existe au niveau de certains neurones de la chaîne nerveuse. Mais nous ne pouvons pas, dans l'état actuel de nos recherches, affirmer que le matériel FP<sup>+</sup> sécrété par ces cellules nerveuses est effectivement la "substance trophique".

Des études histochimiques ont été pourtant entreprises par un certain nombre d'auteurs dans le but d'identifier les substances élaborées par le système "neurosecréteur" (VIGH, 1955 ; HERLANT-MEEWIS, 1956 ; DEUSE-ZIMMERMANN, 1960). Plus récemment AROS (1963, 1964) a montré que le matériel élaboré par les cellules sécrétrices d'Eisenia foetida est de nature protéique. Dans le cas de la chaîne ganglionnaire ventrale, TEICHMANN, AROS et VIGH (1966) ont précisé que les substances "Gomori-positives" sont des protéines contenant une certaine quantité de groupes SS et SH.

D'autre part, les recherches histochimiques effectuées par LECHENAULT (1969, 1971), chez E. foetida, portent sur la détection et l'évolution, au niveau du bourgeon de régénération, des lipides ou des histones. PICCIOCHI (1969) a étudié quantitativement, chez Aulophorus furcatus (Naididae), l'évolution des acides nucléiques et des protéines au cours de la régénération.

Mais, à notre connaissance, le problème du devenir, au niveau du front de régénération, des substances élaborées dans les neurones fuchsiphiles n'a pas été abordé avec les méthodes histochimiques. L'autoradiographie devrait pouvoir apporter des renseignements à ce sujet. Les travaux de TÖRK et Coll. (1966) n'ont concerné que l'incorporation, au niveau des neurones du cerveau, de précurseurs marqués au  $^{35}\text{S}$  (cystéine et méthionine).

Les observations au microscope électronique sont encore trop fragmentaires (CHAPRON, 1969 b) pour assurer que les produits de sécrétion observés, sous forme de granules, dans les péricaryons représentent le facteur trophique. Il est déjà d'ailleurs très difficile d'établir les correspondances entre les cellules  $\text{FP}^+$  et les neurones qui sécrètent des granules élémentaires de 800 et 1100 Å (CHAPRON, 1969 b). Suivant la définition de KNOWLES et BERN (1966) ces neurones, contenant des granules de cette taille, seraient du type aminergiques et élaboreraient par conséquent une neurohumeur. C'est ainsi d'ailleurs que CHAPRON les interprète. On sait que de telles substances sont susceptibles de présenter une fluorescence caractéristique en lumière ultra-violette. Or les recherches de BIANCHI (1964, 1967) ont montré, par cette technique, chez l'Oligochète Octolasmus complanatum, que les cellules qui élaborent la "neurosecrétion" (c'est-à-dire celles qui ont une affinité pour la fuchsine paraldéhyde ou les colorants analogues) sont toujours distinctes des neurones producteurs de substance fluorescente. VIGH-TEICHMANN et GOSLAR (1969) aboutissent à la même conclusion par une étude histo-enzymologique : les cellules "Gomori-positives" diffèrent des neurones monoaminergiques.

Au total, il faut être très prudent dans toute interprétation, en particulier, de la signification physiologique des phases du cycle sécrétoire. Cette interprétation devra évidemment être considérée comme une hypothèse de travail. En l'absence d'études ultrastructurales et histochimiques précises, elle ne pourra reposer que sur les recherches expérimentales et histologiques.

Les expériences d'ablation de la chaîne nerveuse (AVEL et ROZIER, 1961 et KAWAKAMI, 1961) paraissent confirmer notre interprétation de l'existence de plusieurs effets successifs de la "substance trophique".

Ces auteurs ont procédé à des expériences d'ablation de la chaîne nerveuse immédiatement en arrière du front de section antérieur, sur une

TABLEAU XXVI

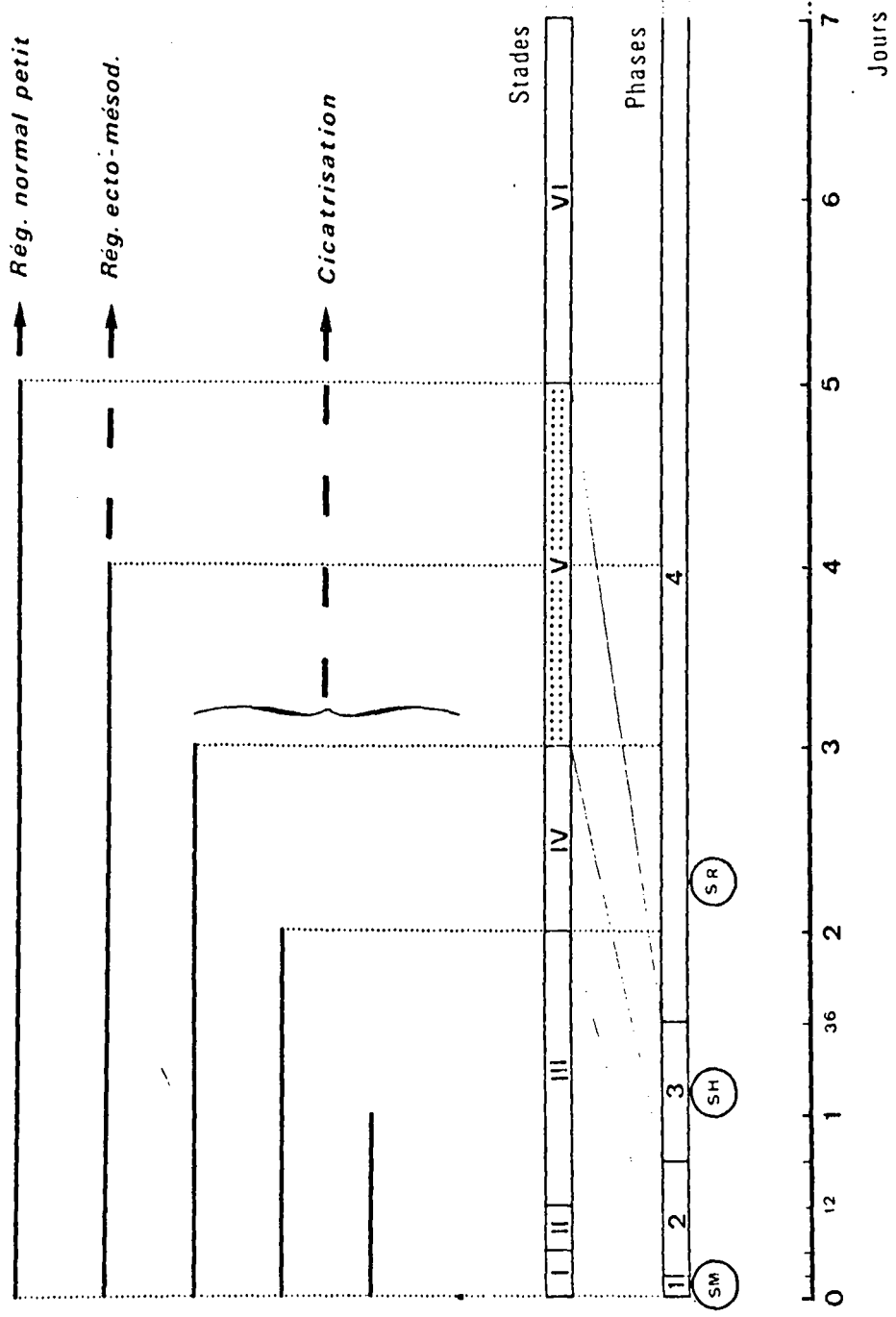
ABLATION DE LA CHAÎNE NERVEUSE  
PENDANT LA RÉGÉNÉRATION CEPHALIQUE

Date de l'ablation de la CN en jours après la section	Résultats des expériences de AVEL et ROZIER	Résultats des expériences de KAWAKAMI
0	cicatrisation	-
1	-	Cicatrisation
2	Cicatrisation	Tissu cicatriciel plus abondant
3	Rarement petit régénérat	Blastème ecto-mésodermique
4	Régénérat ecto-mésodermique	Régénérat normal
5	Tête typique, plus petite que normalement.	-





Figure 45 - Corrélation entre les résultats d'expériences d'ablation de la chaîne nerveuse (AVEL, KAWAKAMI) et la succession des phases du cycle sécrétoire.



distance de 2 à 4 segments (AVEL) ou de 6 segments (KAWAKAMI). Les excisions sont pratiquées en même temps que la décapitation, 2, 3, 4 ou 5 jours après (AVEL) ou bien 1, 2, 3, 4 jours après la section (KAWAKAMI). Leurs résultats sont très comparables (Tableau XXVI), à cela près que les régénérats obtenus par KAWAKAMI semblent un peu plus précoces que ceux décrits par AVEL. Ils montrent que plus la chaîne nerveuse demeure longtemps, plus la prestation est importante et se rapproche d'un régénérat normal. La comparaison de ces observations à la succession des phases du cycle sécrétoire permet de comprendre cette progression (Fig. 45).

Lorsque la chaîne nerveuse est enlevée 1, 2 ou 3 jours après l'opération, le blastème cicatriciel se trouve respectivement aux stades II, III ou IV, stades au cours desquels s'effectue la mise en place du bouchon cicatriciel, déclenchés par la substance trophique sécrétée pendant la phase P 1 et vraisemblablement rejetée dans le système circulatoire ou le liquide coelomique. On observe donc normalement la formation d'un bouchon cicatriciel. Mais la substance histolytique (responsable du stade V) qui doit cheminer le long des axones n'est pas encore arrivée au niveau du bouchon. L'excision de la chaîne à ce moment ne lui permet pas d'être libérée. Eventuellement toutefois, suivant les individus, une partie de cette substance peut être émise.

Lorsque l'opération d'ablation est effectuée 4 jours après la décapitation, le cycle sécrétoire en est au début de la 4<sup>e</sup> phase et, sur le plan morphogénétique, le bouchon commence à s'histolyser. Le résultat sera donc un petit régénérat ectomésodermique amorcé par la substance sécrétée en P 4.

Enfin, si la chaîne nerveuse demeure en place pendant 5 jours, le facteur élaboré pendant la phase P 4 est arrivé au niveau du bourgeon en quantité suffisante pour qu'un régénérat normal apparaisse. AVEL et ROZIER remarquent toutefois que la tête néoformée dans ce cas est généralement plus petite que chez les témoins. Cette substance doit donc être fournie pendant un temps plus long ou au moins à un taux supérieur pour que la prestation soit normale. L'injection de substance trophique amène d'ailleurs un accroissement de la taille des régénérats céphaliques (1<sup>e</sup> Partie, Ch. 4).

Au total, il semble donc que le "facteur trophique" puisse être en réalité constitué par trois substances mises successivement en liberté :

- 1/ une substance assurant la mobilisation des coelomocytes (S M) : elle serait excrétée aussitôt après l'amputation et sa décharge dans le système circulatoire serait déclenchée par le stress dû à la blessure.
- 2/ une substance histolytique du bouchon cicatriciel (S H), provenant de cellules différentes des précédentes, et cheminant par voie axonale jusqu'au niveau du bouchon cicatriciel. Ce pourrait être un neurohumeur.
- 3/ une substance favorisant la régénération proprement dite (S R) et utilisant elle aussi une voie axonale. Ce facteur pourrait être émis, au moins en partie, par les mêmes neurones responsables de la sécrétion de la substance de mobilisation.

Cette hypothèse devra évidemment être confirmée par des travaux ultérieurs, en particulier par l'isolement et la caractérisation histochemique et biochimique de ces trois substances.

Néanmoins, l'existence d'un cycle sécrétoire dans les cellules ganglionnaires ventrales, en relation avec la régénération, est certaine. Là où les substances élaborées ont des propriétés morphogénétiques différentes suivant les phases du cycle où elles sont synthétisées. Les substances inhibitrices spécifiques, céphalique ou caudale, agissent sur le cycle en modifiant in vivo les durées de chacune des phases. Il en résulte une action inhibitrice indirecte sur la formation du régénérat.

QUATRIEME PARTIE

APPROCHES BIOCHIMIQUES DE L'ISOLEMENT DE  
LA SUBSTANCE INHIBITRICE CEPHALIQUE

## INTRODUCTION

L'analyse expérimentale et histologique, que nous avons exposée précédemment, nous a montré que la régénération chez Eisenia foetida était gouvernée par un double mécanisme, trophique et inhibiteur. La substance inhibitrice, localisée dans le tissu nerveux, réagit sur le facteur trophique - vraisemblablement complexe - élaboré par certains neurones sécréteurs de la chaîne ventrale.

L'étape suivante de nos recherches doit être l'isolement et, si possible, la caractérisation biochimique de ces différentes substances.

Dans un premier temps, nous nous sommes proposé d'isoler la substance inhibitrice de la régénération antérieure. Nous avons choisi ce facteur pour plusieurs raisons. L'inhibiteur céphalique, actif au niveau de l'intersegment 7/8, existe chez tout individu dans les 7 premiers métamères. Il est par conséquent très facile de prélever les 7 premiers segments chez de nombreux vers. D'autre part, nous possédons un bon test d'activité de cette substance, en culture organotypique : l'inhibition de la régénération antérieure d'un tronçon formé par les métamères 8 à 12. Ce test ne nécessite, par ailleurs, qu'une faible quantité de produit actif et il est facile, au bout de trois semaines, d'observer morphologiquement le résultat.

Des essais de fractionnement d'un facteur inhibiteur de la régénération ont déjà été effectués chez des invertébrés. TARDENT (1960, 1963) montre que ce facteur, chez le Coelentéré Tubularia, est thermostable et de faible poids moléculaire, car il est susceptible de dialyser. Pour S.M. ROSE (1963 a, b, 1966), au contraire, la substance inhibitrice serait constituée, chez ce même Coelentéré, par des histones, donc de haut poids moléculaire. Cet agent de contrôle migre, dans un champ électrophorétique, comme s'il était chargé positivement. S.D. SMITH (1963) envisage, chez le Polychète Clymenella terquata, la mobilité électrophorétique de l'inhibiteur de tête et de l'inhibiteur de queue : les extraits sont également chargés positivement. P.M. LENICQUE et M. LUNDBLAD (1966 a), reprenant ces recherches sur un autre hydraire, Clava squamata, estiment, après fractionnement, que l'inhibition est due à des  $\alpha$  et  $\beta$ -histones, synthétisées 24 heures après l'opération ; des nucléoprotéines, élaborées pendant les premières 24 heures, constitueraient le facteur trophique. Ces deux substances ont un comportement électrophorétique différent : l'inhibiteur est électropositif, tandis que le "promoteur" est électronégatif. W.A. MULLER (1969) observe que des protéines basiques, extraites d'Hydractinia, bloquent toute régé-

nération. Tout récemment, M. DURANTE et E. PUCCIA (1970) ont effectué des recherches sur la nature chimique de la substance inhibitrice de l'opercule rudimentaire chez Hydroides norvegica (Annélide Polychète). L'inhibiteur est thermostable jusqu'à 80° C et, d'autre part, dialysable. Les auteurs pensent que sa molécule a un diamètre au plus égal à 48 Å et une masse inférieure à 12 000. Ils déduisent de leur analyse chimique que ce facteur n'est pas une protéine d'origine nucléaire.

Comme on peut le voir, les résultats de ces différents travaux ne sont pas homogènes, même en ce qui concerne des espèces identiques. Pour certains auteurs, en particulier ROSE et ses élèves ou LENICQUE, l'inhibiteur serait constitué par une protéine nucléaire à haut poids moléculaire (histone). Pour d'autres (TARDENT, DURANTE), ce facteur, dialysable, aurait au contraire une faible masse moléculaire.

Devant ces déductions contradictoires, nous avons entrepris, par des méthodes biochimiques, un essai d'isolement et d'analyse du facteur inhibiteur céphalique chez Eisenia. Cette étude a été effectuée en collaboration avec C. CARDON, au Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université de Lille I. Les différentes techniques utilisées seront indiquées au fur et à mesure de l'exposé de ces recherches (pour les détails des modes opératoires, voir CARDON, 1970).

Chapitre 1

CARACTERISATION D'UNE FRACTION DIALYSABLE ACTIVE

La manière la plus simple d'effectuer un premier fractionnement nous a paru être la dialyse d'un homogénat de régions céphaliques.

1 - Méthode

Cet homogénat est préparé comme pour l'utilisation en expérimentation in vivo (voir introduction : matériel et méthodes). Après centrifugation, le surnageant est mis en dialyse pendant 15 jours contre de l'eau bidistillée, renouvelée chaque jour, dans des boudins de cellophane "Nojax 16". La cellophane a été auparavant lavée à l'eau courante et placée 24 heures dans l'eau bidistillée. On obtient ainsi deux fractions. L'une, qui a filtré au travers de la cellophane, contient des constituants de faible masse moléculaire ; elle est dite fraction "dialysable" (= "micromoléculaire"). L'autre, retenue dans les boudins de dialyse, est constituée de substances à haute masse moléculaire ; elle est qualifiée d'"adialysable". Les deux fractions sont réduites de volume à l'évaporateur rotatif sous pression réduite à 35°, puis lyophilisées. Les produits obtenus sont dissous dans de l'eau bidistillée et incorporés au milieu de culture, à la concentration de 2 "équivalents-têtes" par saignée.

2 - Essai biologique

Trois lots de culture sont préparés. Après stérilisation par passage sur filtre "Millipore", la phase dialysable est ajoutée au premier, la phase adialysable au second. Le troisième lot, sur milieu standard, sert de témoin.

Après trois semaines de culture à 20° C, les résultats sont les suivants (Tableau XXVII).

La fraction adialysable n'a pas présenté d'action : 76 % des explants régénèrent une tête (Pl. 31, fig. a). Les témoins, de leur côté, ont reformé une tête dans 83 % des cas (Pl. 31, fig. b). Morphologiquement ces prestations sont tout à fait normales.



TABLEAU XXVII

INFLUENCE DES FRACTIONS "DIALYSABLE" ET "ADIALYSABLE" DE L'HOMOGENAT DE  
TETES SUR LA REGENERATION CEPHALIQUE IN VITRO (Trois semaines de culture)

Fractions	Nombre d'explants	Nombre de régénérats	% de régé- nération	Observation
"Dialysable"	20	0	0	3 blastèmes
"Adialysable"	21	16	76	-
Témoins	18	15	83	-



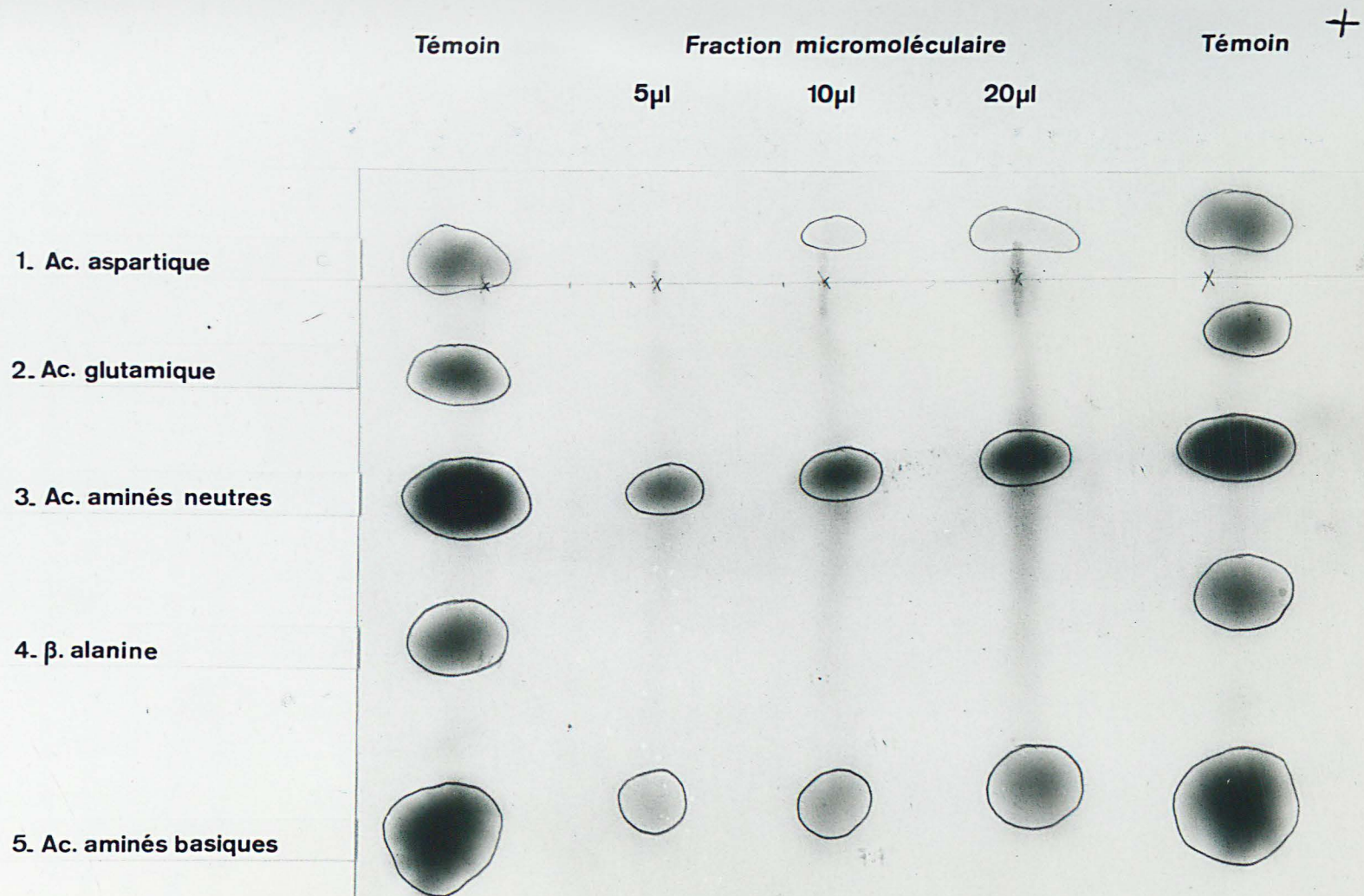
La fraction dialysable, par contre, s'est montrée très active. Sur 20 explants, aucune tête n'a été régénérée (Pl. 31, fig. c, d). Nous avons toutefois rencontré 3 vers qui, au bout de 15 jours, présentaient un petit blastème. Les autres tronçons ne possédaient qu'un bouchon cicatriciel.

### 3 - Conclusion

Devant ces résultats, particulièrement nets, nous pouvons conclure que le facteur inhibiteur de la régénération céphalique se trouve dans la fraction dialysable de l'homogénat de têtes. Il est donc constitué par une substance de faible masse moléculaire, hydrosoluble.



Figure 46 - Electrophorèse à pH 3,9 de la fraction micromoléculaire. Mise en évidence de 3 groupes de constituants aminés : acide, basique et neutre.



BIBLIOTHÈQUE
   
 SOS

Chapitre 2
------------

COMPOSITION DE LA FRACTION MICROMOLECULAIRE ET  
FRACTIONNEMENT SUR RESINES ECHANGEUSES D'IONS

A - Electrophorèse à pH 3,9

Pour analyser cette fraction, biologiquement active, nous avons réalisé une électrophorèse <sup>sur papier</sup> à pH 3,9 qui permet de caractériser trois groupes moyens de constituants aminés : fractions acide, basique et neutre.

1 - Protocole

L'électrophorèse est effectuée sur papier Arches 304 (28 x 40 cm). Une solution d'acides aminés témoins (5 µl) est déposée suivant un trait continu. La fraction micromoléculaire est déposée dans les mêmes conditions en effectuant une série de concentrations croissantes (5, 10 et 20 µl). La feuille de papier est humectée par le tampon volatil de MICHL. L'électrophorèse est réalisée dans des cuves d'électrophorèse "en toit" (type MACHEBOEUF) pendant 4 heures sous 400-450 V. Après séchage, l'électrophorégramme est révélé avec une solution de ninhydrine à 1% dans une étuve à 100° C.

Les acides aminés de la solution témoin sont séparés en cinq taches (Fig. 46) qui correspondent - de l'anode vers la cathode - à :  
1- acide aspartique, 2- acide glutamique, 3- tous les acides aminés neutres, 4- β-alanine, 5- tous les acides aminés basiques.

2 - Résultats

L'électrophorèse à pH 3,9 de la fraction micromoléculaire (Fig. 46) met en évidence trois groupes de constituants aminés : une fraction acide, peu importante, une fraction basique et une fraction neutre assez considérable. L'existence de ces trois fractions nous a incité à envisager leur séparation, par des résines à échange d'ions, à partir du "dialysat" de l'homogénat de têtes.

## B - Chromatographie sur échangeurs d'ions

La chromatographie sur résines échangeuses de cations, puis d'anions permet un fractionnement en trois groupes "acide", "basique" et "neutre" de la fraction micromoléculaire et en outre un dessalage de la solution.

### 1 - Protocole

La solution micromoléculaire est passée successivement sur une colonne de résine échangeuse de cations (DOWEX 50 x 8, "mesh 25-50", forme acide) puis sur une colonne à échange d'anions (Duolite A 40, "mesh 25-50", forme formiate).

Les colonnes, en verre Pyrex de 40 cm de hauteur sur 2 cm de diamètre, contiennent chacune 100 ml de résine. La forme acide de l'échangeur de cations est obtenue par le passage de 500 ml d'acide chlorhydrique 3 N, suivi d'un lavage à l'eau bidistillée jusqu'à ce que le pH du liquide effluent atteigne 5,5-6. La forme formiate de l'échangeur d'anions est obtenue par le passage de 1000 ml de soude 3 N puis de 300 ml d'acide formique concentré. La résine est alors lavée à l'eau distillée jusqu'à ce que le pH du liquide effluent atteigne 4,5-5.

30 mg de fraction dialysable lyophilisée, correspondant à environ 45 têtes, sont dissous dans 10 ml d'eau bidistillée. La solution est passée sur l'échangeur de cations puis sur l'échangeur d'anions (Fig. 47). Les résines sont contenues dans deux colonnes séparées, mais raccordées à l'aide d'un tube en caoutchouc, de sorte que la purification s'effectue en une seule opération. Les colonnes sont ensuite lavées avec 1000 ml d'eau bidistillée. L'eau de lavage et le premier liquide effluent représentent la fraction "neutre".

L'élution de la fraction "acide" (retenue sur la Duolite A 40) est obtenue par passage de 500 ml d'acide formique à 5 p. 100 dans l'eau distillée. Cette fraction contient les composés organiques acides. La fraction "basique" est éluee de la Dowex 50 x 8 par le passage de 100 ml d'une solution aqueuse d'ammoniaque à 5 p. 100. Elle contient les acides aminés, les amino-glucides et les peptides de très faible poids moléculaire.

Figure 47 - Schéma de fractionnement de la solution "micromoléculaire"  
sur des échangeurs d'ions.

*Solution  
micromoléculaire*

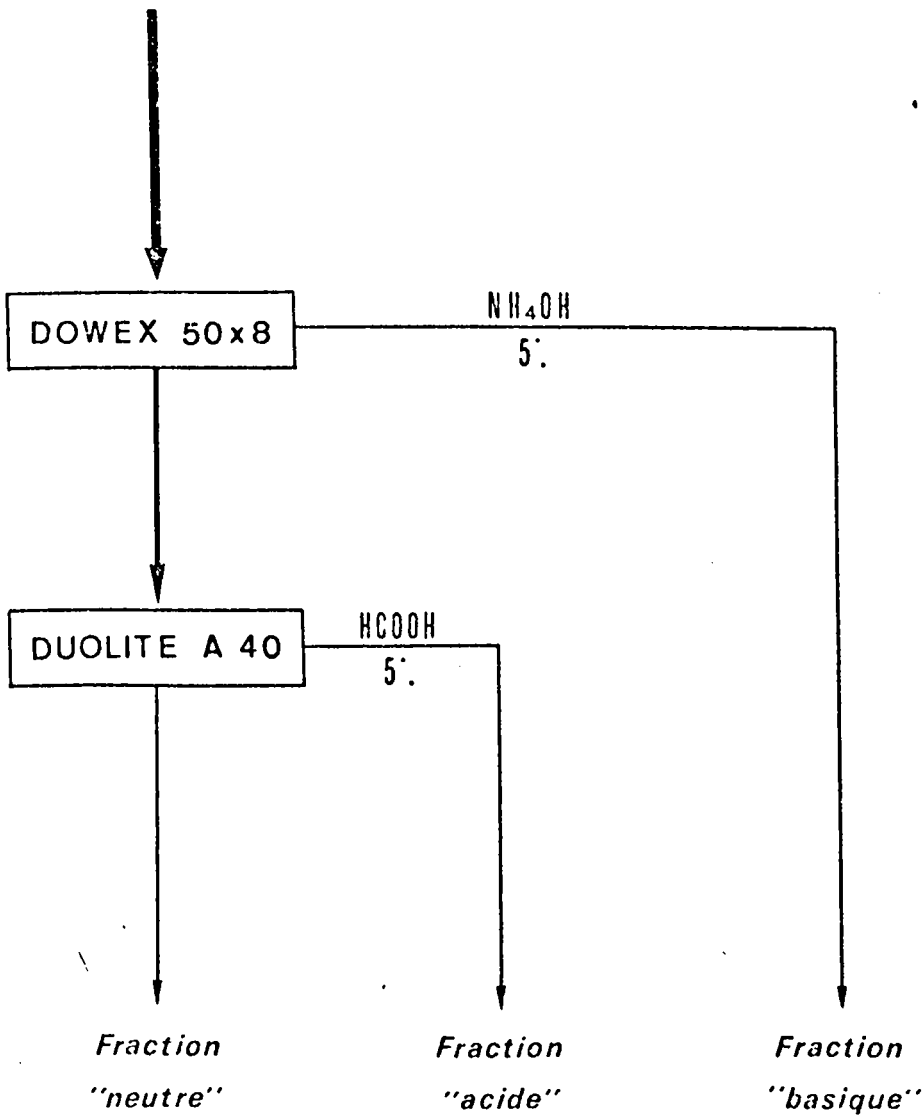




TABLEAU XXVIII

INFLUENCE DES FRACTIONS "NEUTRE", "ACIDE" ET "BASIQUE" DE L'HOMOGENAT DE  
TETES SUR LA REGENERATION CEPHALIQUE IN VITRO (Trois semaines de culture)

	Nombre d'explants	Pas de régé- nération	Bourgeons	Régénérats complets	% de Prestation
Témoins	20	5	3	12	75 %
Fr. Neutre	19	12	3	0	16 %
Fr. Acide	19	6	4	9	68 %
Fr. Basique	18	10	4	4	44 %
Mélange N. + Ac. + Bas.	15	11	3	1	26 %



La fraction "acide" est évaporée sous vide à 37-40° C pour éliminer l'acide formique. La solution concentrée obtenue est reprise par 100 ml d'eau distillée et évaporée de nouveau. L'opération est répétée deux ou trois fois pour éliminer complètement l'acide. On fait subir à la fraction "basique" le même traitement pour éliminer totalement l'ammoniaque ; les trois phases "acide", "basique" et "neutre" sont lyophilisées avant d'être essayées en culture organotypique.

## 2 - Résultats des tests biologiques

Pour essayer l'activité de chacune de ces trois phases, les résidus de lyophilisation sont dissous dans de l'eau bidistillée et stérilisés comme à l'habitude par passage sur filtres "Millipore", avant d'être incorporés au milieu de culture. Une quatrième série est composée d'explants mis en contact avec un mélange des trois solutions précédentes, reconstituant ainsi la phase dialysable initiale. Ce lot témoin doit permettre de vérifier que le passage sur colonnes n'a pas dénaturé la substance inhibitrice. Enfin, des explants sont déposés sur milieu normal pour servir de témoins de la régénération.

Les résultats observés au bout de trois semaines sont consignés dans le Tableau XXVIII. Les témoins régénèrent dans 75 % des cas, proportion identique à celle généralement obtenue dans nos expériences. Les explants mis en présence de fraction "acide" reforment une "tête", ou au moins un bourgeon, dans 68 % des cas. Par contre, le mélange des trois fractions ne permet que 26 % de néoformations. La fraction "neutre" montre une activité inhibitrice importante, puisque 16 % seulement des vers régénèrent ; la prestation fournie dans ce cas n'est d'ailleurs constituée que par des bourgeons, ce qui traduit, par conséquent, un retard important dans la régénération. Enfin, les explants mis en présence de la fraction "basique" ne régénèrent que dans 44 % des cas.

## 3 - Conclusion

Le mélange des trois fractions possède une activité inhibitrice tout à fait normale. Les résultats de cette expérience sont très comparables à ceux obtenus lorsque des vers sont soumis à l'action de la fraction micromoléculaire avant son passage sur les colonnes. Par conséquent, la chromatographie sur résines échangeuses d'ions ne dénature nullement l'inhibiteur céphalique. La fraction "acide" est biologiquement

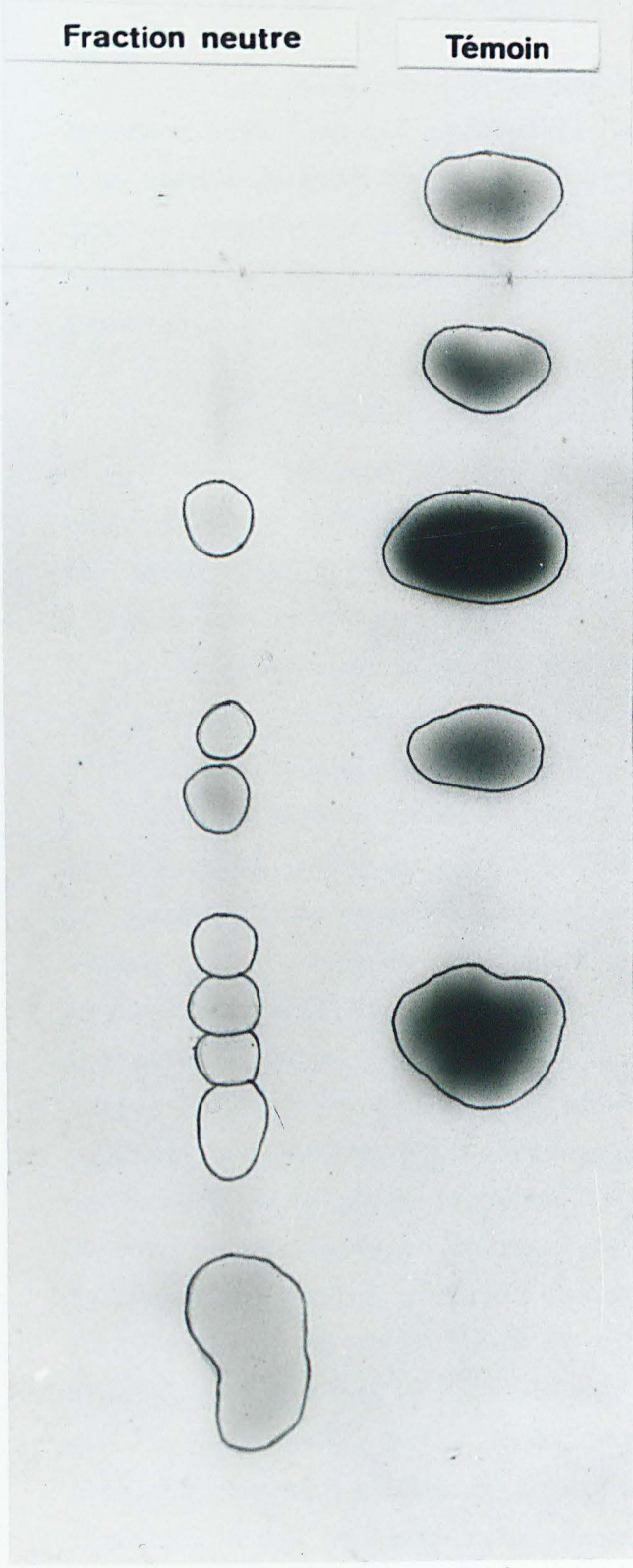
inactive : le taux de régénération est, dans ce lot, du même ordre de grandeur que celui observé chez les témoins. Le faible nombre de régénérats obtenus (16 %) en présence de la fraction dite "neutre" montre donc que le facteur inhibiteur est essentiellement localisé dans cette phase. Néanmoins on observe que la fraction "basique" présente une certaine activité inhibitrice. Une partie de ce facteur a donc été retenue par la Dowex et éluee avec la fraction basique. Il est fort possible qu'un défaut de lavage des colonnes, avant l'élution, soit responsable de cette rétention.

Figure 48 - Electrophorèse à pH 3,9 de la fraction "neutre".

8 spots sont révélés assez faiblement - Noter la présence d'un spot important correspondant à une substance fortement basique dont la présence est difficilement explicable.



+



1. Ac. aspartique

2. Ac. glutamique

3. Ac. aminés neutres

4.  $\beta$ . alanine

5. Ac. aminés basiques

-



Chapitre 3

ANALYSE DE LA FRACTION DITE "NEUTRE"

Les résultats des essais biologiques nous ayant montré que la fraction dite "neutre" présentait une forte activité inhibitrice, nous nous sommes proposé d'étudier sa composition. Pour cela, nous avons voulu, dans un premier temps, au moyen d'une électrophorèse à pH 3,9 détecter la présence d'acides aminés libres ou de composés peptidiques dans cette fraction.

1 - Electrophorèse à pH 3,9

Suivant le même protocole qu'au chapitre précédent, nous avons effectué une électrophorèse à pH 3,9 de la phase dite "neutre" obtenue après passage de la fraction micromoléculaire sur les colonnes de résines à échange d'ions.

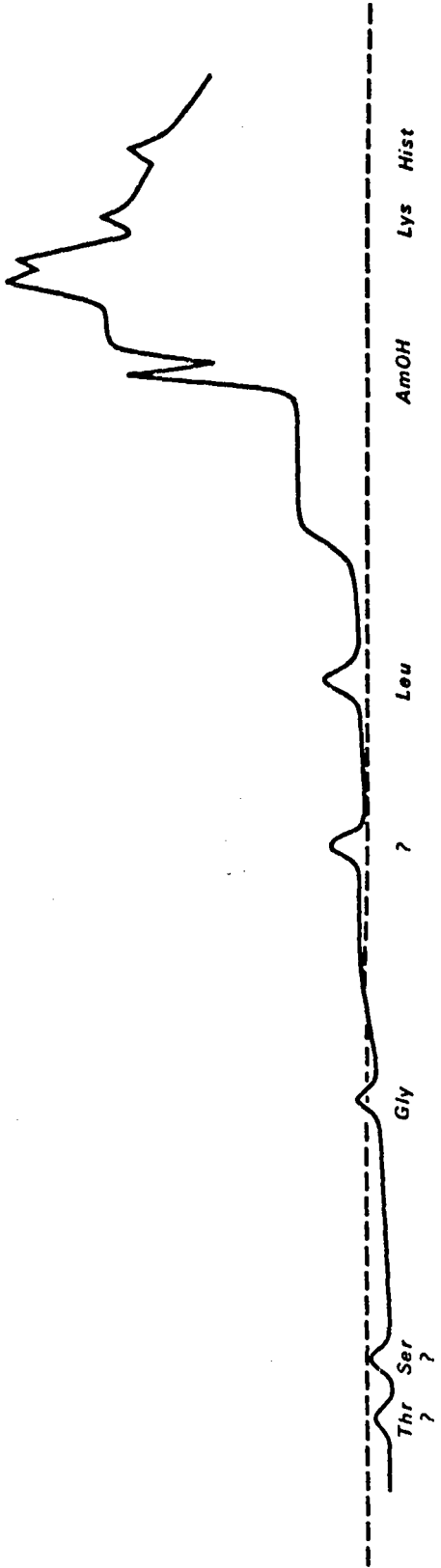
La ninhydrine à 1% révèle la présence de 8 spots. La révélation est nettement plus faible que pour les témoins amino-acides (Fig. 48) : ce résultat est normal si ces taches correspondent à des composés peptidiques. On distingue quatre zones de migration. Une première tache correspond à un produit ayant migré dans la zone des acides aminés neutres. Au niveau de la  $\beta$ -alanine, se trouvent deux spots. Puis, ayant migré au niveau des acides aminés basiques, on repère un ensemble de quatre taches. Enfin, la ninhydrine révèle un spot important, correspondant à une substance très fortement basique. La présence d'un tel composé est difficilement explicable. Ce produit aurait dû en effet être retenu sur la Dowex 50 x 8. Deux possibilités peuvent être envisagées. Il se peut que l'on se trouve en présence d'un artefact (composé possédant des fonctions  $-NH_2$  par exemple). Ou bien cette substance pourrait être un composé peptidique très basique, fortement ionisé, qui n'aurait pas été retenu par la résine dont les mailles sont, dans le cas de la Dowex 50 x 8, très fines. De nouvelles expériences seront donc nécessaires pour essayer d'expliquer la présence de ce spot.

Au total, cette fraction dite "neutre" est en réalité très complexe et comprend plusieurs substances à comportement électrophorétique identique à des produits très basiques. Il est fort possible que ces corps, mis en évidence par électrophorèse à pH 3,9, soient des composés peptidi-

BUS  
LILLE

Figure 49 - Diagramme d'élution à l'auto-analyseur Technicon de la fraction dite "neutre" (avant hydrolyse).

Peu d'acides aminés libres sont repérables sur le diagramme. Présence entre le glycolle (gly) et la leucine (leu) d'un pic inconnu (?).



345  
LILLE



ques. Pour nous en assurer nous avons recherché, dans cette fraction dite "neutre", quels étaient les acides aminés libérés par une hydrolyse.

## 2 - Composition en acides aminés de la fraction dite "neutre"

Avant de pratiquer l'hydrolyse de la fraction dite "neutre", nous avons voulu rechercher les acides aminés libres qui seraient éventuellement passés directement dans cette fraction. D'autre part, l'existence de pics de la courbe d'absorption pourrait indiquer la présence de "peptides".

### a) Analyse de la fraction "neutre" avant hydrolyse

Ces acides aminés sont dosés par chromatographie à l'auto-analyseur Technicon (colonne de 0,60 x 65 cm). La composition du gradient d'éluion a été définie par CARDON (1970) selon les conditions établies par MONSIGNY (1968).

Les résultats apparaissent sur le diagramme d'éluion représenté Fig. 49. On note une absence à peu près complète d'acides aminés libres : seuls le glycoColle, la leucine, la lysine et l'histidine peuvent être repérés en très faible quantité. Par contre on remarque la présence de deux faibles pics au début du diagramme correspondant à des substances éluées dès les premières fractions.

On peut donc penser que ces faibles pics du diagramme d'éluion correspondent à la présence de "peptides" ou plus largement de "composés peptidiques".

Nous avons donc procédé à une hydrolyse de la fraction neutre pendant 24 et 48 heures.

### b) Composition en acides aminés après hydrolyse de 24 h

L'hydrolyse est conduite dans les conditions suivantes. Environ 2 mg de lyophilisat de la fraction "neutre" sont prélevés, dissous dans 50  $\mu$ l d'eau bidistillée à laquelle on ajoute 1 ml d'acide chlorhydrique 5,6 N redistillé. L'hydrolyse, effectuée en présence de témoin interne Norleucine, dure 24 heures à 105° C. Le mode opératoire est décrit en détail par CARDON (1970).

La Figure 50 représente le diagramme d'éluion après 24 heures d'hydrolyse. On note la présence d'assez nombreux pics traduisant la libération d'acides aminés en faible quantité : asparagine, thréonine, sérine, acide glutamique, glycoColle, alanine, leucine, lysine, histidine et arginine. Seul le glycoColle est en quantité beaucoup plus grande que

Figure 50 - Diagramme d'élution à l'autoanalyseur Technicon d'un hydrolysate de la fraction "neutre"  
(24 heures d'hydrolyse acide).

Dix acides aminés ont été libérés par l'hydrolyse. Noter la présence de 4 pics A, B, C et D inconnus.

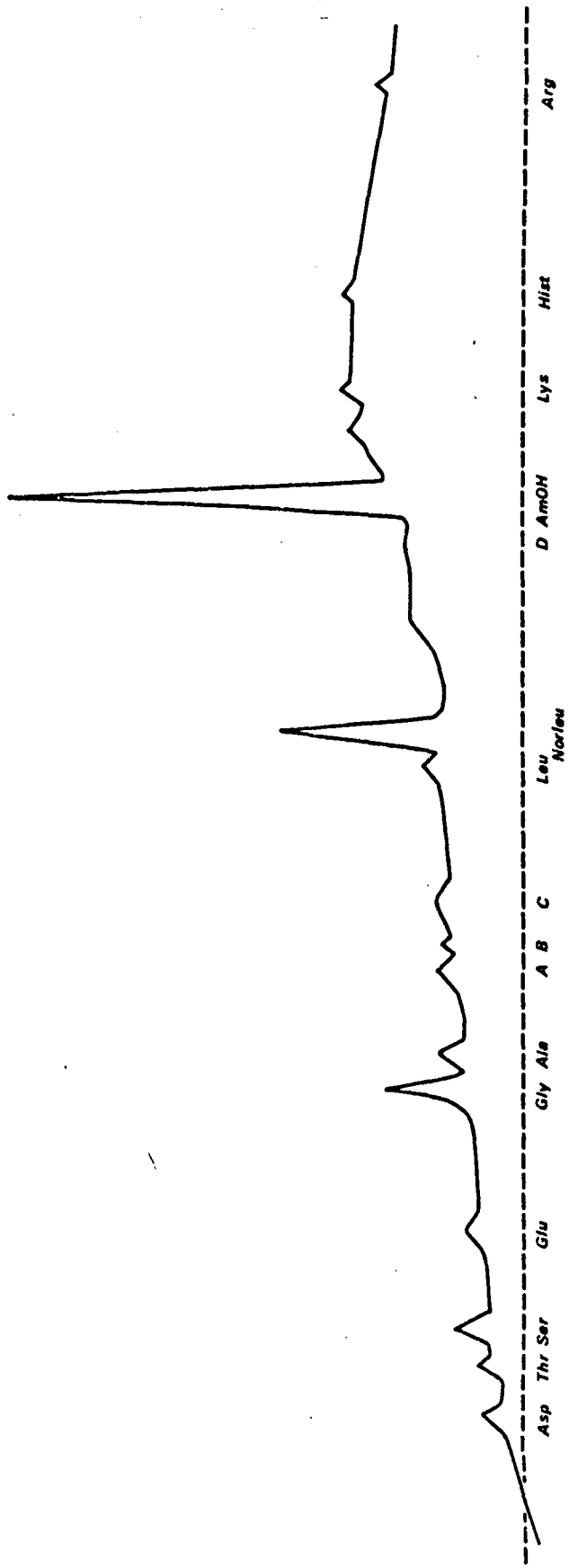
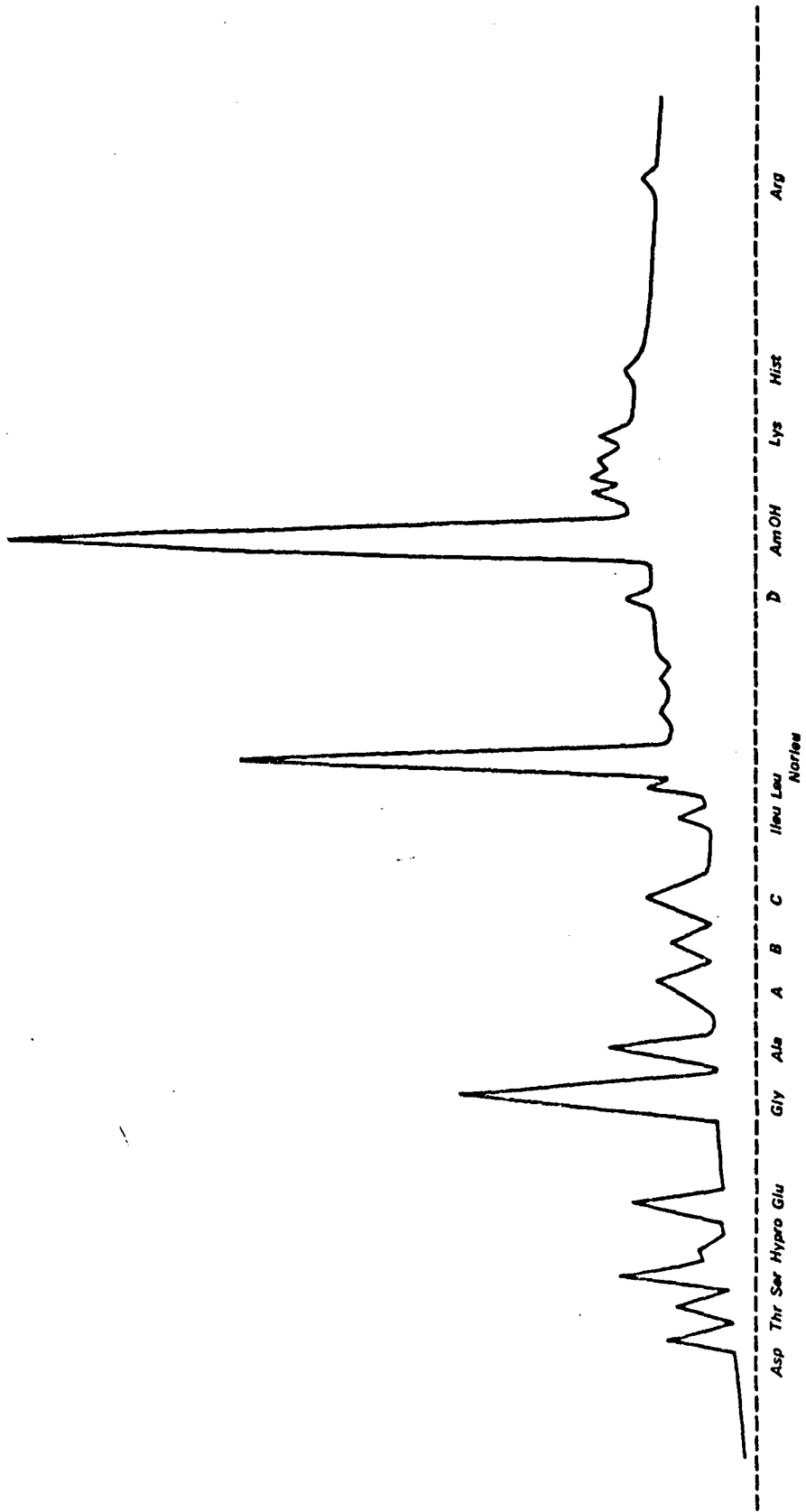


Figure 51 - Diagramme d'élution à l'autoanalyseur Technicon d'un hydrolysate de la fraction "neutre"  
(48 heures d'hydrolyse acide).

12 acides aminés sont repérables sur le diagramme. Les 4 pics A, B, C et D demeurent  
visibles.



BUS  
FILE

les autres. Enfin, sous forme de traces, on peut repérer trois légers pics au niveau de la valine, de la cystéine et de la méthionine.

L'hydrolyse, pendant 24 heures, a permis la libération de 10 acides aminés, mais en faible quantité. Le fait que le diagramme ne soit pas parfaitement démonstratif peut être dû à deux causes.

1. Le produit hydrolysé était en trop petite quantité. Il est possible que la fraction "neutre" contienne simultanément des produits ne réagissant pas à la ninhydrine (par exemple des oses neutres).

2. La fraction "neutre" peut être constituée par un ou plusieurs composés peptidiques résistant à l'hydrolyse acide pendant 24 heures (peut-être des composés cycliques ?).

Nous avons donc été amené à réaliser une hydrolyse de cette même fraction pendant 48 heures.

c) Hydrolyse de la fraction "neutre" pendant 48 heures

Dans les mêmes conditions que précédemment, nous avons réalisé l'hydrolyse de 4,6 mg de lyophilisat de fraction "neutre" pendant 48 heures.

Les résultats sont traduits sur la Fig. 51. Le diagramme d'élu-tion nous fournit 12 acides aminés dont deux n'étaient pas apparus lors de l'hydrolyse de 24 heures : l'hydroxyproline et l'isoleucine. Enfin la courbe révèle la présence de 4 pics inconnus dont 3 (A, B et C) sont situés au niveau de la valine, de la cystéine et de la méthionine, comme sur la Figure 50, et le quatrième (D) correspondant à un produit élué avec les dernières fractions.

Par conséquent, une hydrolyse prolongée nous a permis de mettre en évidence quatre pics inconnus qui pourraient correspondre à des substances peptidiques résistant à l'hydrolyse acide de 48 heures. Mais d'autre part, une telle hydrolyse autorise la caractérisation précise de 12 acides aminés.

### 3 - Conclusion

L'électrophorèse à pH 3,9 de la fraction "neutre" nous a indiqué la présence de composés peptidiques dont l'analyse à "l'auto-analyzer Technicon" a confirmé la nature. En effet, les différentes hydrolyses ont permis de libérer 12 amino-acides parfaitement dosables. Cependant, dans l'état actuel de nos recherches, nous ne pouvons que présumer de la nature peptidique de la substance inhibitrice.

#### CONCLUSION DE LA QUATRIEME PARTIE

Les premiers résultats que nous avons pu obtenir dans l'analyse biochimique de la substance inhibitrice permettent de dire tout d'abord que le facteur inhibiteur est constitué par un composé de faible poids moléculaire. Il semble que l'on soit en présence d'un dérivé "peptidique" qui, en raison de son ionisation et de sa taille, n'aurait pas été retenu par les résines échangeuses d'ions.

Ces résultats, fractionnaires, sont toutefois en accord avec ceux de TARDENT (1960, 1963) chez Tubularia et ceux de DURANTE et PUCCIA (1970) chez Hydroides norvegica. Cependant, nos résultats s'opposent à ceux de ROSE (1963, 1966) ou de LENICQUE (1966 a). Ces auteurs, en effet, estiment que l'inhibition est due à des  $\alpha$  et  $\beta$ -histones, protéines nucléaires de haut poids moléculaire.

Nos recherches ne constituent, pour l'instant, qu'une approche de l'étude biochimique de la substance inhibitrice. Il faudrait dans un premier temps effectuer des cinétiques d'hydrolyse jusqu'à 96 heures pour s'assurer de la cassure complète des chaînes peptidiques. D'un autre côté, pour tenter de mieux isoler ce facteur, il conviendrait de réaliser des électrophorèses "préparatives" à pH 3,9 de façon à pouvoir éluer séparément chacun des spots révélés précédemment et les essayer en culture organotypique.



DISCUSSION ET CONCLUSION

GENERALES

A l'issue de cette étude de quelques aspects de la morphogenèse au cours de la régénération chez Eisenia foetida Sav. f. typica, un certain nombre de problèmes n'ont reçu pour l'instant que des solutions hypothétiques. Avant d'en discuter, et en particulier de rechercher la signification physiologique des facteurs trophique et inhibiteur, en comparant nos résultats à ceux obtenus chez d'autres animaux, il nous paraît souhaitable de rappeler les principaux faits que nous avons pu mettre en évidence.

1 - L'étude expérimentale pratiquée sur des tronçons du corps d'Eisenia, en culture organotypique, ou "in vivo" sur des vers entiers, a permis de montrer que la régénération céphalique, ainsi que la régénération caudale, sont inhibées par une substance spécifique. Celle-ci est localisée dans le système nerveux central de la région homologue. Mais, de plus, nous avons pu montrer que la chaîne nerveuse située en arrière du front de section 7/8, jusqu'en territoire caudal, possède une influence inhibitrice vis à vis de la régénération antérieure à ce niveau. La distribution de l'inhibiteur céphalique se présente donc sous la forme d'un gradient antéro-postérieur dont l'étendue paraît coïncider avec celle du territoire tête.

D'autre part, nous avons pu observer que l'effet trophique de la chaîne nerveuse s'exerce par l'intermédiaire d'une substance soluble elle aussi dans le liquide de Holtfreter. L'étude comparative de l'action de broyats de ganglions ventraux prélevés à différents niveaux du corps indique que le facteur trophique est distribué uniformément le long de l'axe céphalo-caudal.

Un troisième facteur intervient au cours de la régénération. Une "organisine" est élaborée dans le ganglion cérébroïde; elle est responsable de l'induction de la formation et de la différenciation du pharynx. Ce facteur est susceptible lui aussi d'être extrait par homogénéisation dans un solvant aqueux.

2 - Pour essayer de comprendre le mode d'action des facteurs inhibiteur et trophique, nous avons recherché quelles étaient les phases sensibles à leur action au cours de la morphogenèse céphalique. Le bouchon cicatriciel, élément transitoire, persiste pendant trois semaines de culture en présence du facteur inhibiteur. Rappelons que chez les témoins il a pratiquement disparu au bout de cinq jours. Il présente, au microscope photographique, une structure à peu près normale. Par conséquent, en présence d'une

telle substance, il est susceptible de se former mais non d'être détruit. La comparaison entre son évolution "in vivo", en présence des facteurs inhibiteur et trophique, et celle en cas de régénération normale permet de dire que la substance inhibitrice intervient au cours du stade d'histolyse du bouchon cicatriciel. Cette destruction, indispensable pour la suite des processus de régénération, n'a donc pas lieu ou tout au moins est fortement ralentie en présence d'inhibiteur. Inversement l'apport de substance trophique accélère l'histolyse du bouchon cicatriciel. Il semble donc par conséquent que l'inhibition porte sur la substance trophique et non directement sur les tissus du blastème.

L'étude, réalisée parallèlement, de la régénération caudale a abouti à des résultats un peu différents. Nous avons été d'abord amené à définir une série de 8 stades au cours de la régénération normale d'une queue au niveau 50/51, pour avoir des éléments de comparaison.

Le facteur inhibiteur issu de la queue agit sur l'histolyse du bouchon cicatriciel en la ralentissant. Mais, contrairement aux observations effectuées lors de la régénération d'une tête, l'apport de substance trophique ne modifie pas la vitesse d'histolyse du bouchon cicatriciel (lorsqu'il existe).

3 - Un cycle sécrétoire, en relation avec la régénération, est mis en évidence dans les neurones se colorant par la fuchsine paraldéhyde au niveau des quatre ganglions ventraux proches du front de section. Aussi bien en direction céphalique que caudale, la morphogenèse régénératrice déclenche un cycle comportant quatre phases. Une première correspond à une diminution du nombre des cellules  $FP^+$ . Assez courte (3 à 12 heures), nous pouvons l'interpréter comme une décharge du matériel  $FP^+$  sous l'effet du stress dû à la blessure. Elle est suivie par une phase de synthèse de ce matériel fuchsinophile qui dure un peu plus d'1/2 journée dans le cas de la régénération céphalique ou 2 jours pour la régénération caudale. Puis vient une 3<sup>o</sup> phase, pendant laquelle un certain nombre de cellules  $FP^+$  perdent leur chromophilie. Brève au cours de la reformation d'une tête (18 heures), elle est nettement plus longue lorsque la régénération s'effectue en direction caudale (48 heures). Enfin la dernière phase, qui contrôle la suite des processus de régénération, nous paraît correspondre à la synthèse d'un matériel aussitôt excrété.

Les modifications apportées à ces cycles par l'injection de substance inhibitrice ou trophique aux animaux en expérience permettent de confirmer que l'inhibiteur spécifique contrarie l'action du facteur trophique. Celui-ci, d'ailleurs, paraît être en fait complexe et posséder trois actions successives : l'une permettrait la mobilisation des éléments formant le bouchon cicatriciel ; la seconde interviendrait dans l'hydrolyse de ce bouchon ; la dernière assurerait la croissance du régénérat.

4 - L'étude biochimique de ces substances doit nécessairement suivre leur mise en évidence. Nous avons donc abordé le problème de l'isolement de la substance inhibitrice dans le but de l'analyser. Par dialyse, nous avons séparé une fraction micromoléculaire active. La chromatographie sur résines échangeuses d'ions a permis de fractionner le dialysat en trois phases - "acide", "basique" et "neutre" - dont seule la troisième présente une intense activité inhibitrice. La phase basique conserve néanmoins un léger pouvoir inhibiteur. Le passage de la fraction "neutre" sur l'auto-analyseur Technicon après hydrolyse acide nous permet de soupçonner la nature peptidique du facteur inhibiteur.

Il semble, par conséquent, que les phénomènes de régénération chez E. foetida soient sous la dépendance de deux facteurs à rôle antagoniste. Le premier est une substance trophique nécessaire à l'initiation et à la poursuite de la régénération. Celle-ci est limitée par l'entrée en jeu du second facteur, à fonction inhibitrice.

Il convient maintenant de comparer nos résultats chez Eisenia foetida à ceux obtenus dans d'autres groupes d'animaux.

I

LE FACTEUR AUTO-INHIBITEUR

A - Généralité de la notion d'auto-inhibiteur .

La présence d'inhibiteurs spécifiques pourra vraisemblablement être retrouvée chez les autres Oligochètes. Le facteur semble être analogue, dans ses effets, à celui qui a été découvert dans plusieurs groupes d'invertébrés (Polychètes, Planaires, Némertes, Coelentérés).

1 - Chez les Annélides Polychètes, seuls les travaux de SMITH sur Clymenella torquata (1963) ont établi la réalité d'une inhibition de la régénération de chaque région du corps par une substance hydrosoluble provenant de la région homologue d'un autre ver. De plus, cet auteur a pu montrer que la moitié dorsale d'un collier anal inhibait la régénération de cette même moitié dorsale, tandis que la partie ventrale empêchait la reformation de cette même partie ventrale. Nous avons vu (1<sup>o</sup> Partie, Discussion) que des expériences analogues pratiquées au cours de la régénération céphalique de cette espèce n'avaient pas donné de semblables résultats. De même chez E. foetida, notre expérimentation pendant la régénération céphalique a abouti à la même conclusion : il n'y a pas indépendance entre les deux moitiés, dorsale et ventrale, de la tête.

A notre connaissance il n'existe pas d'autres travaux portant sur ce sujet, si ce n'est ceux de LUDWIG (1957) et de DURANTE et PUCCIA (1970) relatifs à l'inhibition du développement de l'opercule rudimentaire chez Hydroïdes norvegica.

2 - Dans une revue très large de la régénération chez les Planaires, BRØNDSTED (1969) a rappelé les principales expériences ayant permis d'étudier les phénomènes d'inhibition (BRØNDSTED, 1946, 1954, 1965 ; LENDER, 1955, 1956). De cet ensemble de travaux, il ressort que l'inhibition spécifique est un fait très général chez les Triclades. Il y est bien établi que chaque organe empêche spécifiquement la régénération d'un organe homologue. Ainsi, WOLFF, LENDER et ZILLER-SENGEL (1964) ont pu donner une nouvelle interprétation de la théorie des gradients de CHILD à la lumière de ces découvertes.

I

LE FACTEUR AUTO-INHIBITEUR

A - Généralité de la notion d'auto-inhibiteur .

La présence d'inhibiteurs spécifiques pourra vraisemblablement être retrouvée chez les autres Oligochètes. Le facteur semble être analogue, dans ses effets, à celui qui a été découvert dans plusieurs groupes d'invertébrés (Polychètes, Planaires, Némertes, Coelentérés).

1 - Chez les Annélides Polychètes, seuls les travaux de SMITH sur Clymenella torquata (1963) ont établi la réalité d'une inhibition de la régénération de chaque région du corps par une substance hydrosoluble provenant de la région homologue d'un autre ver. De plus, cet auteur a pu montrer que la moitié dorsale d'un collier anal inhibait la régénération de cette même moitié dorsale, tandis que la partie ventrale empêchait la reformation de cette même partie ventrale. Nous avons vu (1<sup>o</sup> Partie, Discussion) que des expériences analogues pratiquées au cours de la régénération céphalique de cette espèce n'avaient pas donné de semblables résultats. De même chez E. foetida, notre expérimentation pendant la régénération céphalique a abouti à la même conclusion : il n'y a pas indépendance entre les deux moitiés, dorsale et ventrale, de la tête.

A notre connaissance il n'existe pas d'autres travaux portant sur ce sujet, si ce n'est ceux de LUDWIG (1957) et de DURANTE et PUCCIA (1970) relatifs à l'inhibition du développement de l'opercule rudimentaire chez Hydroides norvegica.

2 - Dans une revue très large de la régénération chez les Planaires, BRØNDSTED (1969) a rappelé les principales expériences ayant permis d'étudier les phénomènes d'inhibition (BRØNDSTED, 1946, 1954, 1965 ; LENDER, 1955, 1956). De cet ensemble de travaux, il ressort que l'inhibition spécifique est un fait très général chez les Triclades. Il y est bien établi que chaque organe empêche spécifiquement la régénération d'un organe homologue. Ainsi, WOLFF, LENDER et ZILLER-SENGEL (1964) ont pu donner une nouvelle interprétation de la théorie des gradients de CHILD à la lumière de ces découvertes.



Dans nos expériences, nous n'observons pas une spécificité organique aussi nette. Une région (tête ou queue) est inhibée plutôt qu'un organe particulier. Toutefois, il faut rappeler ici les expériences de CHAPRON (1969 a) qui montrent que, lorsqu'une région céphalique d'E. foetida est greffée à proximité du front de section antérieur, le cerveau régénéré est minuscule. Ce résultat est à rapprocher directement de ceux de LENDER (1956) obtenus sur Polycelis nigra et Dugesia lugubris, chez qui les cerveaux régénérés en présence de broyats de têtes ont une très petite taille.

3 - A la suite des travaux de TUCKER (1959) chez la némerte Lineus vegetus, REUTTER (1967) a étudié en détail l'action sur la régénération de broyats de différentes régions du corps d'une espèce voisine, Lineus sanguineus Rathke. Tandis que TUCKER déduisait de ses expériences la présence à chaque niveau du corps d'une substance inhibitrice spécifique, REUTTER conclut que les effets d'inhibition ont pour origine la superposition de deux systèmes de contrôle. Le premier est formé par l'inhibition spécifique de chaque région pour la région analogue ; il correspondrait par conséquent à celui mis en évidence par TUCKER. Le second serait constitué par un (ou plusieurs) facteur susceptible de déterminer la faculté de régénérer de certaines régions du corps. Il existe dans les extraits préparés à partir des différents tronçons et sa concentration augmente en direction céphalo-caudale. Il semble donc qu'il y ait un certain parallélisme entre les mécanismes impliqués dans la régénération chez les Némertes et ceux que nous avons observés chez Eisenia. Toutefois REUTTER n'assigne pas de rôle trophique à ce deuxième facteur. D'autre part, à la différence de ses résultats, la substance trophique est distribuée, chez Eisenia foetida, uniformément le long de l'axe nerveux. Le parallélisme est donc vraisemblablement plus apparent que réel.

4 - La régénération a fait l'objet de nombreux travaux chez les Coelentérés. En particulier, des phénomènes d'inhibition y ont été mis en évidence. L'école de S.M. ROSE a recherché chez les Tubulaires les différents aspects du contrôle inhibiteur de la morphogenèse (revue par ROSE, 1957). Chez d'autres Hydrozoaires, les travaux de TARDENT (revue dans TARDENT, 1963, 1965) et de WEBSTER (article de synthèse par WEBSTER, 1971) ont confirmé dans l'ensemble les précédents résultats. L'établissement d'un champ morphogénétique semble dépendre de l'étendue d'une "autolimi-

tation inhibitrice" : chacun des champs organo-spécifiques se limite lui-même et empêche l'établissement de champs équivalents à son voisinage.

Ici encore, nos observations des processus inhibiteurs chez Eisenia sont dans l'ensemble en accord avec les travaux effectués sur les Coelentérés.

Il semble donc bien que chez la plupart des invertébrés dont la régénération est possible (en particulier Coelentérés, Planaires, Némertes, Annélides Polychètes et Oligochètes) les phénomènes d'autoinhibition soient déterminants pour diriger les étapes de la reformation des parties manquantes.

Mais on doit pouvoir, semble-t-il, étendre cette notion d'autoinhibition aux vertébrés. Les recherches ont porté sur l'oeuf de grenouille (ROSE, 1955), l'embryon de grenouille (CLARKE et McCALLION, 1959) et sur l'embryon de poulet (LENICQUE, 1959).

Nos résultats se placent donc dans un contexte très général avec lequel ils sont dans l'ensemble en accord.

#### B - Originalité de l'inhibiteur mis en évidence chez Eisenia

De par sa localisation dans le tissu nerveux le facteur inhibiteur d'Eisenia se distingue de celui mis en évidence dans d'autres groupes. Il faut rappeler tout d'abord que cette substance ne possède pas chez Eisenia une "organo-spécificité" aussi nette que celle isolée chez les Planaires par exemple. Seul le tissu nerveux possède cette propriété inhibitrice et cela suivant un gradient céphalo-caudal. Une explication de ce gradient peut être fournie, en accord avec la théorie émise par WOLFF et coll. (1964). Ces auteurs écrivent en effet : "on peut considérer que les gradients d'inhibition établis par CHILD sont dus en grande partie à la diffusion de substances inhibitrices qui sont plus ou moins diluées suivant la distance de la source". Nos expériences ont montré que le maximum d'inhibition se situait au niveau du cerveau et des trois premiers ganglions ventraux. Au-delà l'influence inhibitrice s'atténue progressivement jusqu'à l'extrémité du territoire tête. On peut penser que la substance inhibitrice de la régénération antérieure est élaborée dans les ganglions nerveux de la région céphalique et diffuse le long de la chaîne ventrale où sa concentration diminue progressivement. Il convient d'ailleurs de souligner la coïncidence existant entre présence du facteur



inhibiteur et étendue du territoire céphalique ; la nature des potentialités d'un territoire semble avoir pour corollaire la présence d'un inhibiteur autologue.

Cette liaison étroite de l'inhibiteur au système nerveux demande de rechercher le support de cette substance. Pour l'instant nous en sommes réduit aux conjectures. Nous ne pouvons pas savoir, en effet, à partir de notre étude expérimentale sous quelle forme et par quoi ce facteur est élaboré dans le tissu nerveux. Aucun travail, semble-t-il, n'a été exécuté chez les autres invertébrés où un inhibiteur spécifique a été mis en évidence. Un petit nombre de recherches d'ordre biochimique ont apporté quelques résultats, parfois contradictoires (voir 4<sup>o</sup> Partie) sur la nature de cette substance (TARDENT, 1960 ; ROSE, 1963 a, b ; LENICQUE et LUNDBLAD, 1966 a, b ; DAVIS, 1967 ; MULLER, 1969, chez les Coelentérés ; SMITH, 1964 ; DURANTE et PUCCIA, 1970, chez les Polychètes). Mais il reste à repérer histochimiquement la localisation du facteur inhibiteur.

Etudiant le rôle endocrine du système nerveux au cours de la régénération caudale chez Eiseniella tetraedra, MICHON, MAISSIAT et ANGEVIN (1964) estiment que les cellules "b" du cerveau élaboreraient un facteur inhibiteur de la régénération caudale ; par contre les cellules "u" du ganglion sous-oesophagien produiraient un facteur stimulant. Il est tentant d'établir un rapprochement entre ces résultats et les nôtres. On peut penser que la substance inhibitrice céphalique que nous avons isolée est analogue à celle mise en évidence par MICHON et Coll. et qu'elle est synthétisée dans des cellules sécrétrices spéciales du ganglion cérébroïde. Cette hypothèse demande une analyse à la fois expérimentale, histochimique et biochimique très précise pour être vérifiée.

#### C - Nature chimique de la substance inhibitrice

Le problème de l'isolement de l'inhibiteur spécifique, que nous avons abordé chez E. foetida, ne paraît pas encore près d'être résolu. En effet, si la généralité du phénomène d'auto-inhibition semble indéniable, les modalités doivent être variables suivant les groupes d'animaux. Nous avons pu montrer que chez ce Lombricien le facteur est constitué par une molécule vraisemblablement peptidique de petite taille (dialysable). Ce résultat est en accord avec ceux de DURANTE et PUCCIA (1970) relatifs à Hydroides norvegica, de TARDENT (1960) pour la Tubulaire. Il s'oppose cependant aux conclusions tirées par ROSE (1966, 1967 a, b), ROSE et

POWERS (1966), LENICQUE et LUNDEBLAD (1966) de leurs recherches sur d'autres Coelentérés. Pour ces derniers auteurs l'inhibiteur serait constitué par des histones  $\alpha$  et  $\beta$ . De son côté L.V. DAVIS (1967) a extrait de certaines espèces d'Hydres un facteur inhibiteur qu'il a identifié à une toxine des nématocystes : le tétraméthylammonium. Enfin W.A. MÜLLER (1969) a isolé et purifié des protéines basiques pouvant bloquer la régénération d'Hydractinia echinata.

Au total, il apparaît que de nombreuses recherches s'avèrent encore nécessaires pour progresser dans la connaissance de la nature chimique des substances inhibitrices spécifiques.

## II

### SUBSTANCE TROPHIQUE ET "NEUROSECRETION"

Les résultats de nos observations en microscopie photonique ont permis de définir un cycle sécrétoire des cellules  $FP^+$  de la chaîne nerveuse. Nous en avons déjà discuté à l'issue de la 3<sup>e</sup> Partie. Néanmoins il nous semble indispensable de revenir sur quelques aspects de l'action trophique du système nerveux et en particulier sur son mode d'action.

Il est certain que la régénération chez les Annélides est sous la dépendance du système nerveux central qui exerce une action trophique et une action endocrine. Au niveau des sections que nous avons pratiquées, l'action endocrine du cerveau ou du ganglion sous-oesophagien (si elle existe vraiment chez E. foetida) ne se fait pas sentir sur la reformation de la queue. Par contre, il semble que la régénération, antérieure ou postérieure, est conditionnée par l'existence d'une sécrétion trophique de la chaîne nerveuse. Celle-ci présente des analogies avec celle observée chez les Batraciens lors de la régénération des membres.

#### 1 - Rôle des fibres nerveuses dans la régénération chez les Amphibiens

Chez les Vertébrés, les importants travaux de SINGER (mises au point 1959, 1960) et de ses collaborateurs (SINGER et MUTTERPERL, 1963) ont montré que les fibres nerveuses étaient nécessaires à la régénération des membres chez les Batraciens. Inversement la surcharge en nerfs (SINGER, 1960) permet la formation d'un régénérat chez l'adulte d'anouère. Le mécanisme de l'action de ces nerfs a été envisagé dès 1926 par SCHOTTE (cité par AVEL, 1961). Depuis ces travaux on considère que cette action est exercée par une sécrétion des axones.

HAY (1960) a montré, par une étude au microscope électronique, que les fibres nerveuses qui pénètrent dans le moignon du membre d'amphibien entrent en contact avec les cellules du blastème. Les renflements terminaux contiennent de petites vésicules dont la présence et la taille sont caractéristiques de la sécrétion de neurotransmetteurs. Récemment VAN ARSDALL et LENTZ (1970) ont étudié l'activité sécrétrice des neurones pendant la régénération chez le Triton. Par coloration à la fuchsine-paraldéhyde, ils mettent en évidence des péricaryons actifs pendant la régénération. La microscopie électronique leur permet de voir

dans ces neurones et dans les axones des granules de taille moyenne égale à 1 700 Å. D'après la classification de KNOWLES il s'agirait donc de fibres peptidergiques et non aminergiques. Il semble donc que, chez les amphibiens, ne soit pas encore résolu le problème du mécanisme d'action des nerfs sur la régénération.

## 2 - Action du système nerveux sur la régénération chez les Annélides

Chez les Polychètes, l'étude ultrastructurale (DHAINAUT-COURTOIS et WAREMBOURG, 1969) de la chaîne nerveuse de Nereis pelagica a montré que les cellules très chromophiles en microscopie photonique contiennent des grains élémentaires de diamètre voisin de 1 300 - 1500 Å. Mais les auteurs n'ont pu conclure à la nature neurosécrétoire de ces cellules. D'autre part, de grands neurones "ordinaires", dans les groupes médian et postérieur des ganglions "ventraux", présentent des modifications de leur cycle sécrétoire corrélatives des processus de régénération" (DHAINAUT-COURTOIS, 1970).

L'analyse expérimentale (BOILLY et COMBAZ, 1970 ; COMBAZ et BOILLY, 1971) confirme chez Nereis diversicolor en régénération le rôle trophique de la chaîne nerveuse. Néanmoins, il n'est pas encore possible, chez les Polychètes, de démontrer le mécanisme de l'action trophique du système nerveux.

Nos recherches, d'ordre expérimental et histologique, ne permettent pas non plus d'expliquer cette action chez Eisenia foetida. Toutefois, il n'est pas exclu d'envisager une intervention de monoamines au niveau du bouchon cicatriciel (CHAPRON, 1969 b). Celles-ci ont été mises en évidence en effet dans le système nerveux des vers de terre en particulier par BIANCHI (1964, 1967) chez Octolasion complanatum et par H.E. MYHRBERG (1967) chez Lumbricus terrestris. Mais il faut encore, pour arriver à une conclusion valable, effectuer le lien entre les études expérimentales et les recherches histochimiques et ultrastructurales.

3 - Un autre problème demeure sans solution satisfaisante : quelle est la voie d'acheminement du facteur trophique ? Au cours de la 3<sup>e</sup> Partie de notre étude, nous avons émis l'hypothèse que ce facteur pourrait être en réalité multiple. En fonction du délai observé entre les phases du cycle et les effets successifs nous avons pensé que certains produits de sécrétion pourraient être transportés par voie humorale. La mobilisation des coelomocytes pourrait ainsi être assurée par une substance déversée dans le système circulatoire : la présence de nombreux capillaires dans la chaîne nerveuse, jusqu'au milieu du neuropile, permettrait ce passage. Mais d'autre part nous avons observé, en particulier au cours des phases P 3 et P 4, la présence relativement fréquente de matériel FP<sup>+</sup> le long d'axones situés dans le neuropile. Il s'agit donc là, vraisemblablement, d'un transport par voie axonale de substance excrétée pendant les phases P 3 et P 4.

Néanmoins il faut insister sur le caractère encore hypothétique de ces déductions.

#### 4 - Nature chimique de la substance trophique

Dans les broyats utilisés pour notre étude expérimentale se trouvent conjointement les substances inhibitrice et trophique. La chromatographie ne nous a pas permis de séparer, dans deux phases distinctes, ces deux facteurs.

Pourtant chez les Coelentérés, LENICQUE et LUNDBLAS (1966) ont montré que des nucléoprotéines, synthétisées pendant les 24 premières heures après l'opération, représentaient un facteur trophique envers la régénération. De leur côté LESH et BURNETT (1966) ont analysé le contrôle de la polarité chez l'Hydre. Un facteur "polarisant" (ou "inducteur") est isolé par ces auteurs dans l'homogénat de tissus de l'animal. Cette substance serait de nature peptidique. Tout récemment MULLER et SPINDLER (1971) viennent de montrer que ce facteur, qu'ils préfèrent qualifier "d'animalisant" plutôt que "polarisant", n'est autre qu'un composant des toxines des nématocystes.

De nouvelles recherches sont donc nécessaires pour faire progresser notre compréhension du mécanisme trophique de la chaîne ventrale au cours de la régénération.

III

SIGNIFICATION PHYSIOLOGIQUE DES  
FACTEURS INHIBITEUR ET TROPHIQUE

Les deux facteurs, inhibiteur et trophique, dont l'existence vient d'être montrée chez Eisenia foetida, paraissent régler le mécanisme de la régénération.

Le facteur trophique est nécessaire au déclenchement et au déroulement des processus de morphogenèse régénératrice. Ce facteur semble agir sur trois phases : mobilisation des coelomocytes, histolyse du bouchon cicatriciel, croissance du régénérat. Il est actuellement impossible d'assurer que ces trois actions correspondent à l'existence de trois substances spécifiques. L'étude des cycles sécrétoires de certains neurones des ganglions de la chaîne nerveuse pourrait suggérer une séquence de décharge de trois principes distincts ; mais les observations en microscopie optique ne peuvent apporter que des présomptions.

Le facteur inhibiteur, spécifique d'une région (céphalique ou caudale) serait progressivement élaboré au cours de la formation du régénérat ; localisé au niveau du système nerveux central du territoire céphalique et distribué en gradient, il subsiste dans la prestation formée et prévient la formation d'une région supplémentaire analogue.

L'antagonisme existant entre ces deux facteurs est certain. Il reste à en expliquer le mécanisme.

Une conjonction de plusieurs techniques (biochimie, expériences in vivo et in vitro, études en microscopies optique et électronique) est nécessaire pour accéder à la connaissance des actions respectives de ces deux facteurs et de leur interaction.





## BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ABELOOS M., 1955 - Le problème morphogénétique dans la régénération des Annélides Polychètes. Bull. Soc. Zool. France 80, 228-256.
- 2 - AROS B., 1963 - Histochemische Untersuchung des neurosekretorischen Systems des Regenwurmes Eisenia foetida Sav. in verschiedenen Lebensperioden. Gen. Comp. Endocr., 3, 6 (abstract).
- 3 - AROS B., 1964 - Données histologiques et histochimiques sur le système neurosécrétoire chez le ver de terre. Ann. Endocr., Paris, 25, n° 5, sup. 5-7.
- 4 - AROS B., ROHLICH P. et VIGH B., 1963 - Electron microscopic observations on neurosecretory cells on the earthworm Lumbricus terrestris. Acta biol. Acad. Sc. Hung., 13, 59-60.
- 5 - AROS B., VIGH B., 1961 a - Neurosecretory changes in the nervous system of Lumbricus rubellus Hoffm. provoked by various experimental influences. Acta biol. Acad. Sc. Hung., 12, 87-98.
- 6 - AROS B., VIGH B., 1961 b - Neurosecretory activity of the central and peripheral nervous system in the earthworm. Acta biol. Acad. Sc. Hung., 12, 169-186.
- 7 - AROS B., VIGH B. et TEICHMANN I., 1965 - The structure of the neurosecretory system of the earthworm. Symp. Biol. Hung., 5, 303-316.
- 8 - AVEL M., 1929 - Recherches expérimentales sur les caractères sexuels somatiques des Lombriciens. Bull. Biol. Fr. Belg., 63, 149-318.
- 9 - AVEL M., 1930 - Sur le rôle du système nerveux dans la régénération de la tête chez les Lombriciens. C.R. Acad. Sc. Paris, 191, 78-80.
- 10 - AVEL M., 1932 a - Sur une expérience permettant d'obtenir la régénération de la tête en l'absence de la chaîne nerveuse ventrale ancienne chez les Lombriciens. C.R. Acad. Sc. Paris, 194, 2166-2168.
- 11 - AVEL M., 1932 b - Analyse expérimentale de la disparition du pouvoir de régénération d'une tête dans la région du corps chez les Lombriciens. C.R. Acad. Sc. Paris, 195, 273-275.



- 12 - AVEL M., 1941 - La régénération de la tête des Lombrics en l'absence du tube digestif. C.R. Acad. Sc. Paris, 213, 409-411.
- 13 - AVEL M., 1947 - Les facteurs de la régénération chez les Annélides. Rev. Suisse Zool., Genève, 54, 219-235.
- 14 - AVEL M., 1950 - Le problème des inductions dans la régénération de la tête chez les Lombriciens. Année Biol. N° 3, 26, 241-256.
- 15 - AVEL M., 1959 - Classe des Annélides Oligochètes in "Traité de Zoologie", P.F. GRASSE, Tome V, 1° fascicule, 224-470, Masson, Paris.
- 16 - AVEL M., 1961 - L'influence du système nerveux sur la régénération chez les Urodèles et les Oligochètes. Bull. Soc. Zool. Fr. 86, 464-483.
- 17 - AVEL M. et ROZIER J. - cité par AVEL M. (1961).
- 18 - BIANCHI S., 1964 - Neurosecrezione e sostanze fenoliche nei gangli degli annellidi. II. Ricerche sui Oligocheti (Octolasion complanatum D.) Atti. Soc. pelorit. Sci. fis. nat., 10, 327-336.
- 19 - BIANCHI S., 1967 - The amine secreting neurons in the central nervous system of the earthworm (Octolasion complanatum) and their possible neurosecretory role. Gen. Comp. Endocr. 9, n° 3, 343-348.
- 20 - BOILLY B. et COMBAZ A., 1970 - Influence de la chaîne nerveuse sur la régénération caudale de Nereis diversicolor O.F. Müller (Annélide Polychète). C.R. Acad. Sc. 271, 92-95.
- 21 - BOUC-LASSALLE A.M., 1968 - La cicatrisation des plaies de la paroi du corps chez le Lombricien Eisenia foetida Sav. en présence et en l'absence d'innervation. C.R. Acad. Sc. 267, 2167-2169.
- 22 - BRANDENBURG J., 1956 - Neurosekretorische Zellen des Regenwurm. Naturwissenschaften 43, 453.
- 23 - BRØNDSTED H.V., 1946 - The existence of a static, Potential and graded regeneration field in Planarians. Kgl. D. Vid. Selsk. Biol. Medd. 20, 1-31.
- 24 - BRØNDSTED H.V., 1954 - The time graded regeneration field in planarians and some of its cyto-physiological implications. Colston Papers 7, 121-138.



- 25 - BRØNSTED H.V., 1955 - Planarian regeneration. Biol. Rev. 30, 65-126.
- 26 - BRØNSTED H.V., 1969 - Planarian regeneration. Pergamon Press, 276 p.
- 27 - CARDON C., 1970 - Procédés de fractionnement de ganglions cérébroïdes de Nereis diversicolor O.F. Müller en vue de l'isolement de l'hormone inhibitrice de la sexualisation. Thèse 3° Cycle, Lille, 1-112.
- 28 - CHAPRON C., 1964 - Les phénomènes de cicatrisation et les stades précoces de la régénération antérieure chez le Lombricien Eisenia foetida unicolor. C.R. Acad. Sc. 259, 1200-1202.
- 29 - CHAPRON C., 1969 a - Contribution à l'étude histologique et infrastructurale de la régénération céphalique chez le Lombricien E. foetida Sav. Thèse Doct. Sci. Nat. Bordeaux, 198 p.
- 30 - CHAPRON C., 1969 b - Mécanisme de l'action du système nerveux au cours de la régénération céphalique chez le Lombricien Eisenia foetida unicolor. C.R. Acad. Sc. 269, n°5, 604-607.
- 31 - CHAPRON C., 1970 a - Régénération céphalique chez le Lombricien Eisenia foetida unicolor : structure, origine et rôle du bouchon cicatriciel. Arch. Zool. exp. gén. 111, n°2, 217-227.
- 32 - CHAPRON C., 1970 b - Contribution à l'étude du déterminisme de la régénération caudale chez le Lombricien Eisenia foetida. C.R. Acad. Sc. 270, n°19, 2318-2321.
- 33 - CHAPRON C., 1970 c - Etude de la régénération céphalique en direction postérieure chez le Lombricien Eisenia foetida unicolor (Sav.). Bull. Soc. Zool. France, 95, n°1, 155-160
- 34 - CHAPRON C., 1971 - Etude de l'origine et de la différenciation du pharynx au cours de la régénération chez l'Annélide Eisenia foetida. J. Embryol. exp. Morph., 25, n°3, 439-455.
- 35 - CHILD C.M., 1911 - Studies on the dynamics of morphogenesis and inheritance in experimental reproduction. I. The axial gradients in Planaria dorotocephala as a limiting factor in regulation. J. exp. Zool., 10, 265-320.
- 36 - CHILD C.M., 1929 - Physiological dominance and physiological isolation in development and reconstitution. Arch. EntwMech. Org. 117, 21-66.



- 37 - CLARKE R.B., Mc CALLION D.J., 1959 - Specific inhibition in the frog embryo by cell-free homogenates of adult tissue. *Can. J. Zool.* 37, 129-131.
- 38 - COMBAZ A. et BOILLY B., 1971 - Particularités de la morphogenèse parapodiale dans les régénérats faiblement innervés chez Nereis diversicolor O.F. Müller, (Annélide Polychète). *C.R. Acad. Sc.* 273, 951-954.
- 39 - DAVIS L.V., 1967 - The source and identity of a regeneration-inhibiting factor in hydroid polyps. *J. exper. Zool.* 164, 187-194.
- 40 - DEUSE-ZIMMERMANN R., 1960 - Vergleichende Untersuchungen über Neurosekretion bei Enchytraeidae, Tubificidae und Naididae. *Z. Zellforsch.* 52, 801-861.
- 41 - DHAINAUT-COURTOIS N., 1970 - Contribution à l'étude morphologique des processus sécrétoires dans le système nerveux central et au niveau de la glande infracérébrale des Nereidae (Annélides Polychètes). Thèse Doct. Sci. Nat. Lille, 164 p.
- 42 - DHAINAUT-COURTOIS et WAREMBOURG M., 1967 - Etude des cellules sécrétrices de la chaîne nerveuse de Nereis pelagica L. (Annélide Polychète). *Gen. comp. Endocr.* 9, 276-286.
- 43 - DHAINAUT-COURTOIS et WAREMBOURG M., 1969 - Etude ultrastructurale des neurones de la chaîne nerveuse de Nereis pelagica L. (Annélide Polychète). *Z. Zellforsch.* 97, 260-273.
- 44 - DURANTE M. et PUCCIA E., 1970 - Ricerche preliminari sulla natura chimica della sostanza inibitrice dell' opercolo funzionale di Hydroides norvegica. *Atti Acc. Naz. Lincei. R.C., Cl. Sc. fis., mat. e nat.* 48 n° 6, 683-689.
- 45 - DURCHON M., 1964 - Résultats de cultures organotypiques chez les Annélides et les Mollusques gastéropodes. *Bull. Soc. Zool. France* 89, n°1, 45-48.
- 46 - DURCHON M., 1967 a - Rôle du système nerveux dans la régénération des Annélides. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 92, 319-330.
- 47 - DURCHON M., 1967 b - L'endocrinologie des Vers et des Mollusques. Masson éd. Paris. 241 p.



- 48 - GABE M., 1953 - Sur quelques applications de la coloration par la fuchsine paraldéhyde. Bull. Microscop. Appl. 3, 153-162.
- 49 - GATES G.E., 1949 - Regeneration in an earthworm, Eisenia foetida (Sav).  
I. Anterior regeneration. Biol. Bull. 96, 129-139.
- 50 - GATES G.E., 1950 - Regeneration in an earthworm, Eisenia foetida (Sav).  
II. Posterior regeneration. Biol. Bull. 98, 36-45.
- 51 - GERSCH M. und WOHLRABE K., 1965 - Experimentelle Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Neurosekretion und Regeneration bei Enchytraeus. Zool. Jb. Physiol. 71, 393-413.
- 52 - GERSCHENFELD H.M., 1966 - Chemical transmitters in Invertebrate nervous system. Symp. Soc. Exptl. Biol. 20, 299-323.
- 53 - HARMS W.R., 1948 - Über ein inkretorisches Cerebralorgan bei Lumbriciden sowie Beschreibung eines verwandten Organs bei drei neuen Lycastis Arten. Arch. EntwMech. Org. 143, 332-346.
- 54 - HAY E.D., 1960 - The fine structure of nerves in the epidermis of regenerating salamander limbs. Exptl. Cell. Res. 19, 299-317.
- 55 - HERLANT-MEEWIS H., 1954 - Croissance et reproduction du Lombricien Eisenia foetida Sav. Ann. Soc. R. Belg. 85, 119-151.
- 56 - HERLANT-MEEWIS H., 1956 - Croissance et neurosécrétion chez Eisenia foetida. Ann. Sci. Nat., Zool. 11° S, 18, 185-198.
- 57 - HERLANT-MEEWIS H., 1962 - Neurosecretory phenomena during regeneration of nervous centres in Eisenia foetida. Mem. Soc. Endocrinol. 12, Neurosecretion (Heller et Clark ed) Acad. Press, 267-273.
- 58 - HERLANT-MEEWIS H., 1966 - Les cellules neurosécrétrices de la chaîne nerveuse d'Eisenia foetida. Z. Zellforsch. 69, 319-325.
- 59 - HERLANT-MEEWIS H., 1971 - Le rôle du système nerveux dans la cicatrisation chez Eisenia foetida. 6° Congrès européen d'Endocrinologie Comparée Montpellier, 2-7 août 1971.
- 60 - HERLANT-MEEWIS H. et DELIGNE J., 1965 - Influence of the nervous system on regeneration in Annelids, in "Regeneration in animals and related problems". V. Kiortsis and H.A.L. Trampusch, edit. North. Holl. Co Amsterdam, 228-238.



- 61 - HERLANT-MEEWIS H., GALLARDO S., 1965 - Phénomènes neurosécrétoires au cours de la régénération postérieure d'E. foetida. Gen. Comp. Endocrinol. 5, 681.
- 62 - HERLANT-MEEWIS H., NAISSE J. et MOUTON J., 1967 - Phénomènes neurosécrétoires au niveau de la chaîne nerveuse chez les Invertébrés, in "Neurosecretion" (F. Stutinsky edit.) 203-218, Springer Verlag, Berlin (IV° Symp. intern. sur la Neurosécrétion).
- 63 - HERLANT-MEEWIS et VAN DAMME N., 1962 a - Phénomènes neurosécrétoires chez Nereis diversicolor et Eisenia foetida. C.R. Acad. Sc. 255, 2291-2293.
- 64 - HERLANT-MEEWIS H., VAN DAMME N., 1962 b - Neurosecretion and wound healing in Nereis diversicolor. Mem. Soc. Endocrinol. 12, 289-295.
- 65 - HÜBL H., 1952 - Beiträge zur Kenntnis der Regenerationsvorgänge bei Lumbriciden. Arch. EntwMech. Org. 145, 508-527.
- 66 - HÜBL H., 1956 - Über die Beziehungen der Neurosekretion zum Regenerationsgeschehen bei Lumbriciden nebst Beschreibung eines neuartigen neurosekretorischen Zelltyps im Unterschlundganglion. Arch. EntwMech. Org. 149, 73-87.
- 67 - JUBERTHIE C., 1965 - Régénération postérieure en l'absence du cerveau et des segments antérieurs chez Eisenia foetida. C.R. Acad. Sc. 260, n° 20, 5383-5386.
- 68 - JUBERTHIE C. et MĚSTROV M., 1962 - Etude de la neurosécrétion chez Pelodrilus leruthi Hroobé (Olig. Haplotaxidae). Ann. de Spéléologie 17 n° 4, 551-566.
- 69 - JUBERTHIE C. et MĚSTROV M., 1965 - Régénération postérieure en milieu humide et activité neurosécrétrice de la chaîne nerveuse chez Eophila pyrenaica (Olig. Lumbricidae). C.R. Acad. Sc. 260, 991-994.
- 70 - KAWAKAMI I.K., 1952 - Pharynx regeneration in the earthworm Eisenia foetida Sav. with special reference to the factors affecting the regeneration. Annot. Zool. Japon. 25, n° 1, 2, 193-197.



- 71 - KAWAKAMI I.K., 1961 - Experimental analysis of factors influencing regeneration in the earthworm. Jap. J. of Zool. 13, 141-164.
- 72 - KNOWLES F. et BERN H.A., 1966 - Function of neurosecretion in endocrine regulation. Nature 210, 271-272.
- 73 - KROPP B., 1933 - Brain transplantation in regenerative earthworms. J. exp. Zool. 65, 107-130.
- 74 - LECHENAULT H., 1969 - Etude histochimique des lipides au cours de la régénération céphalique chez l'Oligochète Eisenia foetida (Sav). Ann. Histochem. 14, 189-198.
- 75 - LECHENAULT H., 1971 - Analyse cytochimique des histones des cellules activées au cours de la régénération céphalique de l'Oligochète Eisenia foetida (Sav.). Ann. Histochem. 16, 129-140.
- 76 - LENDER Th., 1955 - Sur l'inhibition de la régénération du cerveau de la Planaire Polycelis nigra. C.R. Acad. Sc. 241, 1863-1865.
- 77 - LENDER Th., 1956 - L'inhibition de la régénération du cerveau des Planaires Polycelis nigra et Dugesia lugubris en présence de broyats de têtes ou de queues. Bull. Soc. Zool. Fr. 81, 192-199.
- 78 - LENICQUE P., 1959 - Studies on homologous inhibition in the chick embryo. Acta Zool. 40, 141-202.
- 79 - LENICQUE P. et LUNDBLADM., 1966 a - Promoters and inhibitors of development during regeneration of the hypostome and tentacles of Clava squamata. Acta Zool. 47, 185-195.
- 80 - LENICQUE P.M. et LUNDBLADM., 1966 b - Promoters and inhibitors of development during regeneration of the hypostome and tentacles of Hydra littoralis. Acta Zool. 47, n° 3, 277-287.
- 81 - LESH G.E. et BURNETT A.L., 1966 - An analysis of the chemical control of polarized form in Hydra. J. exper. Zool. 163 n° 1, 55-77.
- 82 - LUDWIG H.N., 1957 - Weiteres zur Regeneration der Opercula von Hydroides norvegica (Gunn.). Arch. EntwMech. Org. 149, 602-612.
- 83 - MARCEL R., 1966 - Rôle inducteur du cerveau au cours de la régénération du pharynx chez Eisenia foetida Sav. (Ann. Oligochète). C.R. Acad. Sc. 262, 2470-2472.



- 84 - MARCEL R., 1967 a - Inhibition de la régénération antérieure chez Eisenia foetida f. typica Sav. (Annélide Oligochète). Bull. Soc. Zool. Fr. 92, 345-350.
- 85 - MARCEL R., 1967 b - Rôle du système nerveux dans l'inhibition de la régénération antérieure chez Eisenia foetida f. typica Sav. (Annélide Oligochète). C.R. Acad. Sc. 265, 693-694.
- 86 - MARCEL R., 1968 - Effets inhibiteur et trophique dans la régénération céphalique de Eisenia foetida Sav. f. typica (Ann. Oligochète). Ann. Embr. Morph. 1, n°4, 417-425.
- 87 - MARCEL R., 1970 a - Etude "in vitro" de la régénération céphalique d'Eisenia foetida f. typica Sav. (Annélide Oligochète). Année Biol., 4<sup>e</sup> s, 9, 527-235.
- 88 - MARCEL R., 1970 b - Etude "in vivo" de l'inhibition céphalique chez Eisenia foetida Sav. f. typica (Annélide Oligochète). Ann. Embr. Morph. 3, n°3, 329-335.
- 89 - MARCEL R., 1970 c - Inhibition de la régénération caudale chez Eisenia foetida typica Sav. (Annélide Oligochète). Ann. Embr. Morph. 3, n°4, 439-446.
- 90 - MARCEL R., 1970 d - Sur une anomalie importante de la métamérisation dans un régénérat postérieur d'Eisenia foetida Sav. f. typica. Bull. Soc. Zool. France 95, 727-736.
- 91 - MICHON J., ALAPHILIPPE F., 1959 - Contribution à l'étude de la neurosécrétion chez les Lumbricidae. C.R. Acad. Sc. 249, 835-837.
- 92 - MICHON J., MAISSIAT J. et ANGEVIN A., 1964 - Contribution à l'étude de la neurosécrétion chez le Lombricien Eiseniella tetraedra f. typica. C.R. Acad. Sc. 259, 5, 1248-1249.
- 93 - MOMENT G.B., 1946 - A study of growth limitation in Earthworms. J. exp. Zool. 103, 487-506.
- 94 - MONSIGNY M., 1968 - La liaison glycanne-protide dans les glycoprotéines. Procédés d'étude et applications. Thèse Doct. Sc. Phys. Lille, 195 p.
- 95 - MORGAN T.H., 1897 - Regeneration in Allolobophora foetida. Arch. EntwMech. Org. 5, 570-585.



- 96 - MULLER W.A., 1969 - Die Steuerung des morphogenetischen Fließgleichgewichts in den Polypen von Hydractinia echinata. II. Chemisch-analytische Untersuchungen. Arch. EntwMech. Org. 163, n°4, 357-374.
- 97 - MULLER W.A.; SPINDLER K.D., 1971 - The "Polarizing Inducer" in Hydra : A reexamination of its Properties and its Origin. Arch. EntwMech. Org. 167, n° 4, 325-335.
- 98 - MYHRBERG H.E., 1967 - Monoaminergic mechanisms in the nervous system of Lumbricus terrestris (L.). Z. Zellforsch. 81, n°3, 311-343.
- 99 - OKADA Y.K., 1932 - Les possibilités de la régénération de la tête chez le Polychète Myxicola aesthetica Clap. Annot. Zool. Jap. 13, n°5, 535-549.
- 100 - OKADA Y.K. et KAWAKAMI T., 1943 - Transplantation experiments in the earthworm Eisenia foetida (Sav.) with special remarks on the inductive effects of the nerve cord on the differentiation of the body wall. Tokyo Univ. Fac. Sc. J. Ser. 4, 6, 25-96.
- 101 - OTREMBA P. - Beobachtungen an neurosekretorischen Zellen des Regenwurmes (Lumbricus sp.). Z. Zellforsch. 54, 421-436.
- 102 - PELLEGRINO DE IRALDI A., DE ROBERTIS E., 1962 - Electron microscope study of a special secretory neurone in the nerve cord of the earthworm. 5th Int. Cong. Electron. Micr. Acad. Press, 190-191 (S.S. Breese, Jr, edit.).
- 103 - PENTZ S., 1963 - Über die Augendifferenzierung bei Polycelis nigra Ehrb. Arch. EntwMech. Org. 154, 495-505.
- 104 - PENTZ S. et SEILERN-ASPANG F., 1961 - Die Entstehung des Augenmusters bei Polycelis nigra durch Wechselwirkung zwischen dem Augenhemmfeld und der Augeninduktion durch das Gehirn. Arch. EntwMech. Org. 153, 75-92.
- 105 - PICCIOCHI P.G.C., 1969 - Evolution of nucleic acids and proteins in the course of regeneration in an Oligochaete (Aulophorus furcatus). Experientia 25, n°8, 881-882.
- 106 - RAND H.W. et BROWNE A., 1926 - Inhibition of Regeneration in Planarians by grafting : Technique of grafting. Proc. Nat. Ac. Sc. U.S.A. 12, 575-581.



- 107 - RAND H.W. et ELLIS M., 1926 - Inhibition of regeneration in two-headed or two-tailed Planarians. Proc. Nat. Ac. Sc. U.S.A., 12, 570-574.
- 108 - REUTTER K., 1967 - Untersuchungen zur ungeschlechtlichen Fortpflanzung und zum Regenerationsvermögen von Lineus sanguineus Rathke (Nem.) Arch. EntwMech. Org. 159, 141-202.
- 109 - ROSE S.M., 1955 - Specific inhibition during differentiation. N.Y. Acad. Sc. Ann. 60, 1136-1159.
- 110 - ROSE S.M., 1957 - Cellular interaction during inhibition. Biol. Rev. 32, 351-382.
- 111 - ROSE S.M., 1963 a - Polarized control of regional structure in Tubularia. Develop. Biol. 7, 488-501.
- 112 - ROSE S.M., 1963 b - Inhibition in Polarized systems. in Proc. XVI Int. Congr. Zool. vol. 3, Washington, 185-188.
- 113 - ROSE S.M., 1966 - Polarized inhibitory control of regional differentiation during regeneration in Tubularia. II. Separation of active materials by electrophoresis. Growth 30, n° 4, 429-448.
- 114 - ROSE S.M., 1967 a - Polarized inhibitory control of regional differentiation during regeneration in Tubularia. III. The effects of grafts across sea water-agar bridges in electric fields. Growth 31, 149-164.
- 115 - ROSE S.M., 1967 b - The aging of the system for the transmission of information controlling differentiation. J. Gerontol., USA, 22, n° 4, 28-41.
- 116 - ROSE S.M. et POWERS J.A., 1966 - Polarized inhibitory control of regional differentiation during regeneration in Tubularia. I. The effect of extracts from distal and proximal regions. Growth 30, n° 4, 419-428.
- 117 - ROSI G., 1968 - Osservazioni sulla distribuzione e sul diverso comportamento delle cellule neurosecretrici nei vari distretti del sistema nervoso centrale di Allolobophora caliginosa Sav. Boll. Zool., Ital. 35, n° 1-2, 97-107.



- 118 - SAUDAIN P., 1968 - Relations entre le système nerveux central et la régénération caudale chez Eisenia foetida (Sav.) f. typica (Oligochaète Lombricien). D.E.S. Fac. Sc. Caen, 1-26.
- 119 - SCHARRER B., 1937 - Ueber neurosekretorisch tätige Zellen bei wirbellosen Tieren. Naturwissen. 25, 131-138.
- 120 - SCHARRER B., 1969 - Neurohumors and neurohormones : Definitions and Terminology. J. Neuro-Visceral Relations, Suppl. IX, 1-20.
- 121 - SCHARRER B. et WEITZMAN M., 1970 - Current Problems in Invertebrates neurosecretion, in : Aspects of Neuroendocrinology. W. Bargmann and B. Scharrer Edit. Springer Verlag 1-23.
- 122 - SCHARRER E. et BROWN S., 1961 - Neurosecretion. XII. The formation of neurosecretory granules in the earthworm, Lumbricus terrestris. Z. Zellforsch. 54, 530-540.
- 123 - SCHARRER E. et BROWN S., 1962a- Neurosecretion in Lumbricus terrestris. Gen. comp. Endoc. 2, 1-3.
- 124 - SCHARRER E. et BROWN S., 1962b - Electron microscopic studies of neurosecretory cells in Lumbricus terrestris. Mem. Soc. f. Endoc., 12, Neurosecretion, Acad. Press, London, 103-105.
- 125 - SENDEL C., 1960 - Culture in vitro de blastèmes de régénération de Planaires. J. Embryol. exp. Morph. 8, n°4, 468-476.
- 126 - SINGER M., 1959 - The influence of nerves on regeneration, in "Regeneration in Vertebrates", ed. C.S. Thornton, Univ. Chicago Press, 59 -80.
- 127 - SINGER M., 1960 - Nervous mechanisms in the regeneration of body parts in Vertebrates, in 18th Growth symposium, Ronald Press Co, 115-133.
- 128 - SINGER M. et MUTTERPERL E., 1963 - Nerve fiber requirements for regeneration in forelimb transplants of the newt Triturus. Develop. Biol. 7, 180-191.
- 129 - SMITH S.D., 1963 - Specific inhibition of regeneration in Clymenella torquata. Biol. Bull. 125, 542-555.
- 130 - STOLTE H.A., 1955 - Oligochaeta, in "Brom's Tierreich", Bd 4, Abt 3, 723-890, Geest et Portig, K.C. Leipzig.



- 131 - TAKEUCHI N., 1965 - Neurosecretory elements in the central nervous system of the earthworm. Sci. Rep. Tôhoku Univ. Ser. IV (Biol) 31, 105-116.
- 132 - TARDENT P., 1960 - Principles governing the process of regeneration in hydroids. in "Developing cell Systems" (Rudnick, ed.) 21-43, The Ronald Press, New-York.
- 133 - TARDENT P., 1963 - Regeneration in the Hydrozoa. Biol. Rev. 38, 293-333.
- 134 - TARDENT P., 1965 - Developmental aspects of regeneration in Coelenterates. in Proc. Regeneration in animals North. Holl. Publ. Co, Amsterdam. V. Kiortsis, H.A.L. Trampusch ed.
- 135 - TEICHMANN I., AROS B. et VIGH B., 1966 - Histochemical studies on Gomori positives substances. III. Examination of the earthworm's neurosecretory (Lumbricus herculeus, Eisenia foetida). Acta Biol. Hung. 17, n°4, 329-357.
- 136 - TÖRK I., AROS B., KISS J., VIGH B., 1966 - Morphological examination of the metabolism in the secretory cells of the nervous system. I. Autoradiographic study of the incorporation of <sup>35</sup>S labelled cysteine and methionine into the neurosecretory system of the earthworm (Eisenia foetida; Lumbricus herculeus). Acta Biol. Hung. 17, 185-198.
- 137 - TUCKER M., 1959 - Inhibitory control of regeneration in nemertean worms. J. Morph. 105, 569-599.
- 138 - VAN ARSDALL C.B., LENTZ T.L., 1968 - Neurons : Secretory activity during limb regeneration and induction in the Newt. Science 162, n°3859, 1296.
- 139 - VIGH I., 1955 - Comparative histological investigations of the invertebrate's cerebral ganglion. Cité par TEICHMANN, AROS et VIGH (1966).
- 140 - VIGH-TEICHMANN, GOSLAR H.G., 1969 - Enzyme histochemical studies on the nervous system of the earthworm. Ann. Endocrinol. 30, n°1, 55-60.
- 141 - WAREMBOURG M., 1968 - Contribution à l'étude des différents types de neurones dans la chaîne ventrale des Nereidae (Annélides Polychètes) Thèse 3° Cycle, Lille, 1-126.



- 142 - WEBSTER G., 1971 - Morphogenesis and pattern formation in hydroids. Biol. Reviews 46, n°1, 1-46.
- 143 - WOLFF E., 1962 - Recent researches on the regeneration of Planaria. in "Regeneration", 20th Growth Symposium 53-84, The Ronald Press Co.
- 144 - WOLFF E., 1967 - Les matériaux et les mécanismes de la régénération chez les Planaires. Bull. Soc. Zool. Fr. 92, 273-286.
- 145 - WOLFF E., LENDER T. et ZILLER-SENGEL C., 1964 - Le rôle des facteurs auto-inhibiteurs dans la régénération des Planaires. Rev. Suisse Zool. 71, n°1, 75-98.
- 146 - ZILLER-SENGEL C., 1966 - Recherches sur la détermination et l'inhibition de la morphogenèse des blastèmes de régénération chez les Planaires. Thèse Doct. Sc. Nat. Fac. Sc. Paris.
- 147 - ZILLER-SENGEL C., 1967 a - Recherches sur l'inhibition de la régénération du pharynx chez les Planaires. I. Mise en évidence d'un facteur auto-inhibiteur de la régénération du pharynx. J. Emb. exp. Morph. 18, 91-106.
- 148 - ZILLER-SENGEL C., 1967 b - Recherches sur l'inhibition de la régénération du pharynx chez les Planaires. II. Variations d'intensité du facteur inhibiteur suivant les espèces et les phases de la régénération. J. Embr. exp. Morph. 18, 107-120.

