

0 5 + 6
1 9 7 8
8 3

N° d'ordre : 415

50376
1978
83

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir

le grade de Docteur ès-Sciences Naturelles

par

BERNARD LASSALLE

LES POTENTIELS DE SURFACE CHEZ LES AMPHIBIENS ORIGINE ET ÉVOLUTION AU COURS DU DÉVELOPPEMENT ET DE LA RÉGÉNÉRATION



Soutenue le 6 Juin 1978 devant la Commission d'Examen

Président : M. M. DURCHON

Directeur du Travail
et Rapporteur : M. B. BOILLY

Rapporteurs : M. J.-C. BEETSCHEN
M. P. GUILBAULT
M. J. MAMBRINI

Examineur : M. J. FABER

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

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

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER
DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE
KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT,
MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, WATERLOT, WIEMAN,
ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M. MIGEON.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie

Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M.	LOMBARD Jacques	Sociologie
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M.	MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M.	MONTREUIL Jean	Biochimie
M.	PARREAU Michel	Analyse
M.	POUZET Pierre	Analyse numérique
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie
M.	SALMER Georges	Electronique
M.	SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M.	WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M.	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
Mme	DACHARRY Monique	Géographie
M.	DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
Mme	EVRRARD Micheline	Chimie Appliquée
M.	GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	HERMAN Maurice	Physique Spatiale
Mme	LEHMANN Josiane	Analyse
M.	LENTACKER Firmin	Géographie
M.	LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M.	LOUAGE Francis	Electronique
M.	MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle	MARQUET Simone	Probabilités
M.	MIGEON Michel	Chimie Physique
M.	MONTEL Marc	Physique du Solide
M.	MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M.	NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M.	PAQUET Jacques	Géologie Générale
M.	RACZY Ladislas	Electronique
M.	ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M.	SLIWA Henri	Chimie Organique
M.	WATERLOT Michel	Géologie Générale

MAITRES DE CONFERENCES (Et Chargés d'Enseignement)

M.	ADAM Michel	Sciences Economiques
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
Mme	BATTIAU Yvonne	Géographie

M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CARREZ Christian	Informatique
M. COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. CRAMPON Norbert	Géologie
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FONTAINE Hubert	Physique
M. FONTAINE Jacques	Electronique
M. FOURNET Bernard	Biochimie
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GERVAIS Michel	Gestion des Entreprises
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
M ^{lle} LEGRAND Denise	Algèbre
M ^{lle} LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NOTELET Francis	Electrotechnique
M. NUSSEMBAUM Maurice	Sciences Economiques
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Physique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SOMME Jean	Géographie

Mlle SPIK Geneviève
M. STANKIEWICZ François
M. STERBOUL François
M. TAILLEZ Roger
M. THERY Pierre
M. TOP Gérard
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TREANTON Jean-René
M. VANDORPE Bernard
M. VILLETTE Michel
M. WALLART Francis
M. WERNER Georges
Mme ZIN-JUSTIN Nicole

Biochimie
Sciences Economiques
Informatique
Biologie
Electronique
Sciences Economiques
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Mécanique
Chimie
Informatique
Algèbre

AVANT-PROPOS

Que Monsieur le Professeur BOILLY trouve ici le témoignage de ma sincère et profonde reconnaissance. Je le remercie de la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant dans son laboratoire et pour les nombreux conseils et encouragements qu'il m'a prodigués avec un enthousiasme sans relâche et une constante disponibilité.

Je remercie Monsieur le Professeur GUILBAULT d'avoir bien voulu juger ce manuscrit mais aussi pour m'avoir initié à l'électro-physiologie, technique sans laquelle ce travail n'aurait pu être mené à bien.

Je remercie également Monsieur le Professeur DURCHON qui malgré ses lourdes charges a accepté d'examiner ce travail et de présider mon Jury de thèse.

Mes plus sincères remerciements vont à Monsieur le Professeur MAMBRINI pour la bienveillance qu'il m'a manifestée en acceptant de juger ce travail.

Monsieur le Professeur BEETSCHEN a accepté de bien vouloir examiner ce travail, qu'il soit assuré de toute ma gratitude.

Monsieur le Professeur FABER me fait l'honneur de participer à mon Jury de thèse, qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie enfin tout le personnel du laboratoire mais je tiens à remercier tout particulièrement Madame DERACHE qui s'est chargée de la dactylographie de ce manuscrit, Madame STRUYVE qui en a réalisé les tableaux, Monsieur LAZARECKI et Madame AUGER qui ont assuré le tirage des photographies, Madame HERBAUT et Madame FOURNEZ qui m'ont apporté leur aide pour la confection des coupes de microscopie photonique et électronique.

Une partie de ce travail a été réalisée avec l'aide matérielle du C.N.R.S.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	p.	1
DEFINITION DES POTENTIELS DE SURFACE.....	p.	2
POSITION DU PROBLEME.....	p.	3
MATERIEL ET TECHNIQUES.....	p.	11
I - MATERIEL.....	p.	11
A - Amphibiens Urodèles.....	p.	11
B - Amphibiens Anoures.....	p.	11
II - TECHNIQUES.....	p.	11
A - Techniques d'élevage.....	p.	11
B - Techniques histologiques.....	p.	12
C - Techniques électrophysiologiques.....	p.	13
D - Techniques biochimiques.....	p.	15

PREMIERE PARTIE

CARACTERISTIQUES ET ORIGINE DES POTENTIELS DE SURFACE.....	p.	18
--	----	----

CHAPITRE I - CARACTERISTIQUES DES POTENTIELS DE SURFACE

DU MEMBRE NORMAL.....	p.	18
1 - METHODOLOGIE.....	p.	18
2 - RESULTATS.....	p.	19
a - Potentiels de surface de Pleurodèle.....	p.	19
α Premier groupe d'animaux adultes.....	p.	19
β Deuxième groupe d'animaux adultes.....	p.	22
γ Larves de Pleurodèles.....	p.	23
b - Potentiels de surface d'autres Amphibiens.....	p.	23
3 - DISCUSSION.....	p.	24

CHAPITRE II - SUPPORT TISSULAIRE DES POTENTIELS DE

SURFACE.....	p.	27
1 - METHODOLOGIE.....	p.	27
2 - RESULTATS.....	p.	28
a - Dénervation.....	p.	28
b - Extirpation d'os.....	p.	30
c - Ablation de peau et d'épiderme.....	p.	31
d - Isolement de membre.....	p.	32

3 - DISCUSSION.....	p.	33
CHAPITRE III - FACTEURS SUSCEPTIBLES DE MODIFIER LES POTENTIELS DE SURFACE.....	p.	35
I - PRESSION OSMOTIQUE.....	p.	35
1 - METHODOLOGIE.....	p.	35
2 - RESULTATS.....	p.	36
a - Solutions appliquées sur tout le membre.....	p.	36
b - Solutions appliquées sur une partie du membre.....	p.	36
3 - DISCUSSION.....	p.	38
II - INFLUENCE DES BLESSURES.....	p.	40
1 - METHODOLOGIE.....	p.	40
2 - RESULTATS.....	p.	40
a - Blessures provoquées au niveau du membre....	p.	40
b - Ablation de peau dans une zone éloignée du membre.....	p.	42
3 - DISCUSSION.....	p.	44
CHAPITRE IV - RELATIONS ENTRE LES POTENTIELS DE SURFACE ET LES POTENTIELS TRANSEPIHELIAUX.....	p.	47
I - MODIFICATIONS EXPERIMENTALES DE L'AMPLITUDE DES POTENTIELS DE SURFACE <u>IN VIVO</u>	p.	47
1 - METHODOLOGIE.....	p.	50
a - Diminution de la ddp transépithéliale U.....	p.	50
b - Augmentation de la ddp transépithéliale U...	p.	50
2 - RESULTATS.....	p.	51
a - Milieu externe dépourvu d'ions Na^+ appliqué sur tout le membre.....	p.	51
b - Milieu externe dépourvu d'ions Na^+ appliqué sur une partie du membre.....	p.	51
c - Milieu externe dépourvu d'ions Cl^- appliqué sur tout le membre.....	p.	52
d - Milieu externe dépourvu d'ions Cl^- appliqué sur une partie du membre.....	p.	53
3 - DISCUSSION.....	p.	54

II - MESURE DES POTENTIELS TRANSEPIHELIAUX <u>IN VIVO</u> .	p.	56
1 - METHODOLOGIE.....	p.	57
2 - RESULTATS.....	p.	58
a - Mesure simultanée des potentiels transépi- théliaux et des potentiels de surface dans les conditions normales.....	p.	58
b - Mesure simultanée des potentiels transépi- théliaux et des potentiels de surface en l'absence d'ions Cl ⁻ dans le milieu externe.....	p.	59
3 - DISCUSSION.....	p.	60
III - MESURE DES POTENTIELS TRANSEPIHELIAUX <u>IN VITRO</u>	p.	60
1 - METHODOLOGIE.....	p.	61
2 - RESULTATS.....	p.	62
a - Premier dispositif expérimental.....	p.	62
b - Second dispositif expérimental.....	p.	63
3 - DISCUSSION.....	p.	64

CHAPITRE V - RÔLE DES PERMEABILITES TRANSEPIHELIALES
DANS L'EXPRESSION DES POTENTIELS DE SURFACE p. 68

I - ROLE DE LA PERMEABILITE ACTIVE.....	p.	68
1 - METHODOLOGIE.....	p.	68
2 - RESULTATS.....	p.	69
a - Dosage des protéines.....	p.	69
b - Réaction témoin.....	p.	69
c - Cinétique de la réaction enzymatique.....	p.	70
d - Activité ATPasique des lambeaux épider- miques.....	p.	70
3 - DISCUSSION.....	p.	72
II - ROLE DE LA PERMEABILITE PASSIVE.....	p.	72
1 - METHODOLOGIE.....	p.	73
2 - RESULTATS.....	p.	73
a - Ultrastructure de l'épiderme de Pleurodèle adulte.....	p.	73

b - Perméabilité passive de l'épiderme de Pleurodèle en présence d'un milieu externe hyperosmotique.	p. 75
c - Perméabilité passive de l'épiderme de Pleurodèle en présence d'un milieu externe isotonique.....	p. 75
3 - DISCUSSION.....	p. 76
CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE.....	p. 79

DEUXIÈME PARTIE

ÉVOLUTION DES POTENTIELS DE SURFACE AU COURS DU DEVELOPPEMENT ET DE LA REGENERATION.....	p. 80
--	-------

CHAPITRE VI - LES POTENTIELS DE SURFACE AU COURS DE LA VIE DES AMPHIBIENS.....	p. 81
--	-------

I - LES POTENTIELS DE SURFACE ET LA METAMORPHOSE.....	p. 81
1 - METHODOLOGIE.....	p. 81
2 - RESULTATS.....	p. 82
3 - DISCUSSION.....	p. 83
II - LES POTENTIELS DE SURFACE ET LA MUE.....	p. 84
1 - METHODOLOGIE.....	p. 84
2 - RESULTATS.....	p. 85
3 - DISCUSSION.....	p. 85

CHAPITRE VII - ÉVOLUTION DES POTENTIELS DE SURFACE AU COURS DE LA REGENERATION DES MEMBRES.....	p. 88
---	-------

1 - METHODOLOGIE.....	p. 88
2 - RESULTATS.....	p. 90
a - Membres en régénération.....	p. 90
b - Membres cicatrisant une plaie.....	p. 93
α Régénération d'un lambeau de peau sur la face dorsale d'un membre de Pleurodèle....	p. 93
β Cicatrisation de membres de Pleurodèles irradiés ou dénervés.....	p. 94
γ Cicatrisation de membres de Grenouille....	p. 96
3 - DISCUSSION.....	p. 96
CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE.....	p. 100
CONCLUSION GENERALE.....	p. 101

INTRODUCTION

La régénération des Amphibiens a suscité l'intérêt de nombreux auteurs et conduit à la réalisation de multiples travaux. L'étude des mécanismes impliqués dans le déclenchement et le contrôle de la régénération des membres a fait ressortir l'importance primordiale du système nerveux (SINGER, 1954) et des interactions tissulaires entre territoires de qualités différentes (DROIN, 1959 ; CARLSON, 1974 a; LHEUREUX, 1975). La nécessité de la participation d'un troisième facteur a cependant été suggérée par quelques auteurs ; il s'agit des potentiels bioélectriques de surface qui existent chez la plupart des êtres vivants (voir revue dans LASSALLE, 1977a) mais qui, chez les Amphibiens, sont particulièrement élevés. Ce sont ces potentiels de surface relativement peu connus qui ont retenu notre attention et que nous proposons d'étudier notamment en raison des interprétations confuses et contradictoires de certains travaux relatifs à l'origine et au rôle de ces potentiels.

DEFINITION DES POTENTIELS DE SURFACE

Avant d'aborder l'étude des potentiels de surface et afin d'éviter toute confusion dans la terminologie employée, nous donnerons une définition précise de ces potentiels bioélectriques particuliers.

Les potentiels de surface (PS) sont des potentiels continus, extracellulaires, mesurables entre deux régions non lésées de la surface d'un animal ou d'un organe (Fig. 1 a). Ils diffèrent en cela des potentiels électriques :

- variables tels que E.C.G., E.M.G., E.E.G. (Fig. 1 b) ;
- intracellulaires tel le potentiel transmembranaire qui représente le potentiel intracellulaire mesuré à l'aide d'une microélectrode par rapport au potentiel extracellulaire (Fig. 1 c) ;
- de lésion mesuré entre une zone intacte et une zone lésée de la surface d'un organe (Fig. 1 d).

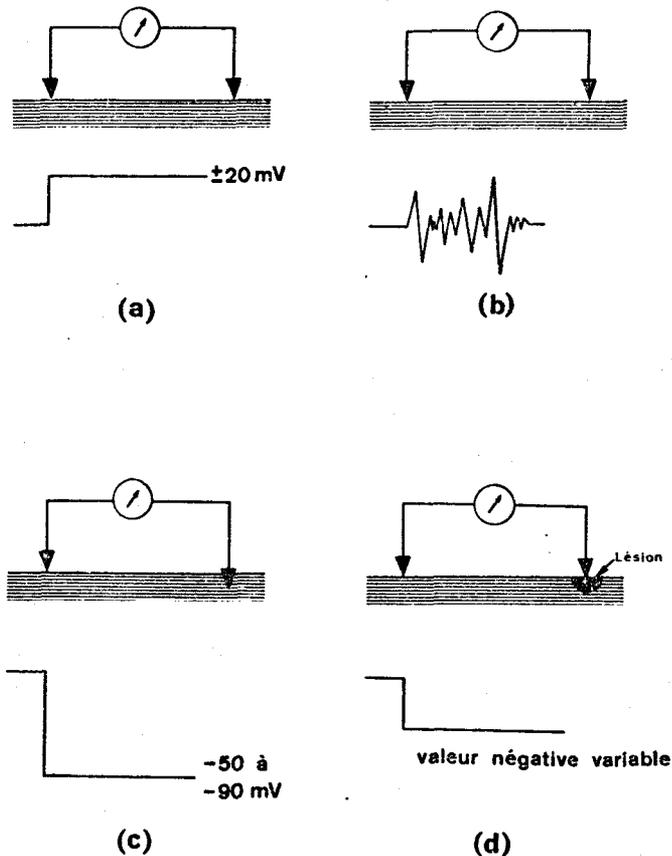


Figure 1 : Techniques de mesure. a) Potentiels de surface (potentiels extracellulaires continus) ; b) Potentiels extracellulaires variables ; ils représentent l'activité électrique de surface d'un organe (électrocardiogramme, électromyogramme, électroencéphalogramme) ; c) Potentiels intracellulaires (potentiels de membrane, potentiels d'action) ; d) Potentiels de lésion ; ils sont le reflet des potentiels intracellulaires.

POSITION DU PROBLEME

Décrits pour la première fois par MONROY (1941) chez un Urodèle (*Triturus cristatus*), les PS des Amphibiens adultes ont été particulièrement étudiés par BECKER dans une série de travaux (1960 à 1974) réalisés essentiellement chez *Triturus viridescens*. Cette espèce est caractérisée par l'électronégativité des extrémités du corps et des membres par rapport à une région de référence située au centre de la tête et par la présence de zones (correspondant aux plexus brachial et lombo-sacré) ayant le même potentiel que la référence (Fig. 2 a). Ces PS ont été considérés par BECKER comme des facteurs capables de déclencher et de contrôler la régénération. Les raisons qui ont conduit cet auteur à proposer une telle interprétation sont multiples et reposent sur les résultats de nombreux travaux ayant trait à l'origine des PS, à l'évolution de ces PS au cours de la régénération ou de la cicatrisation de membres d'Urodèles et d'Anoures et à la stimulation des capacités régénératrices par un courant électrique. Compte-tenu de l'importance des résultats présentés, nous analyserons successivement chacun de ces points.

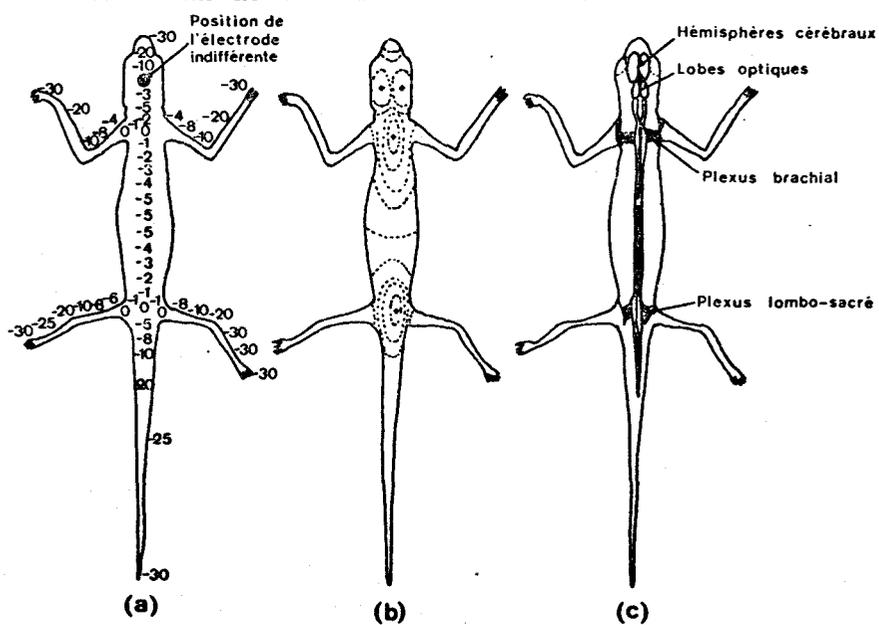


Figure 2 : Potentiels de surface de *Triturus*. a) Valeur des potentiels ; b) Carte des lignes isopotentielles ; c) Représentation schématique du système nerveux (d'après BECKER, 1960).

1 - Origine des PS

Selon BECKER, le tissu générateur des potentiels détectables à la surface d'un Amphibien est constitué par le tissu nerveux dont on connaît le rôle important dans la régénération. Cette hypothèse de l'origine nerveuse des PS a été développée à partir d'une expérimentation consistant à reproduire à l'aide d'un modèle le système nerveux de *Triturus* (BECKER, 1960). Ce modèle est constitué d'un réseau de fils de cuivre soudés en différents points correspondant au cerveau, au plexus brachial et au plexus lombo-sacré. Les extrémités libres et non isolées des fils de cuivre correspondent aux extrémités de membres (Fig. 3). Enfermé dans une éponge façonnée en forme de Triton et imbibée d'électrolyte, cet analogue du système nerveux développe des potentiels positifs au niveau des soudures et

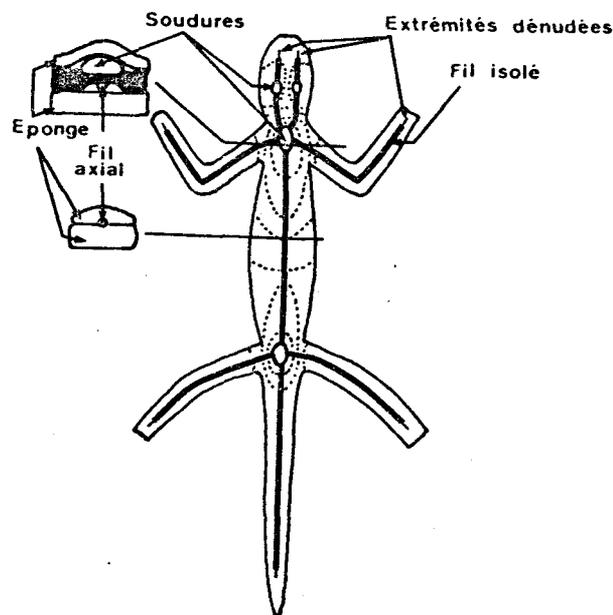


Figure 3 : Modèle expérimental reproduisant le champ électrique normal de *Triturus* (d'après BECKER, 1960).

des potentiels négatifs au niveau des extrémités dénudées. La carte des lignes isopotentielles relevée dans ces conditions est identique à celle observée sur l'animal (Fig. 2 b). Cette similitude

conduit BECKER à proposer le système nerveux comme le support tissulaire des PS. D'autres observations rapportées par cet auteur viennent appuyer cette hypothèse :

- l'anesthésie profonde que l'on sait agir sur le système nerveux, provoque une inversion complète des PS (BECKER, 1960) ;

- la section des nerfs brachiaux abolit la négativité distale des membres (BECKER, 1960, 1961 a) ;

- l'effet HALL* mis en évidence au niveau des membres antérieurs prouve l'existence d'une migration électronique longitudinale qui s'interrompt lorsque les nerfs sont sectionnés (BECKER, 1961 b) ;

- des mesures de PS effectuées chez divers animaux (Planaire, Ver de terre, Poisson, Homme) montrent que les zones riches en cellules nerveuses (ganglions) sont électropositives (BECKER, 1963) ;

- les PS mesurés sur la peau du membre de Grenouille sont retrouvés, bien que de valeur inférieure, à la surface des nerfs mis à nu (BECKER et coll., 1962 a). Selon l'auteur, les nerfs se comportent comme de véritables semi-conducteurs, les électrons migrant dans le sens proximo-distal dans les fibres motrices et dans le sens disto-proximal dans les fibres sensibles (Fig. 4) (BECKER et coll., 1962 b).

Enfin en 1974, BECKER précise que le tissu responsable des PS n'est pas le tissu nerveux proprement dit mais serait plutôt constitué par les cellules de SCHWANN.

* L'effet HALL permet de détecter la présence d'un flux électronique dans une direction donnée par l'apparition d'un gradient de potentiel dans une direction perpendiculaire à celle du flux sous l'influence d'un champ magnétique non variable lui-même placé à 90° par rapport au flux électronique et au gradient de potentiel.

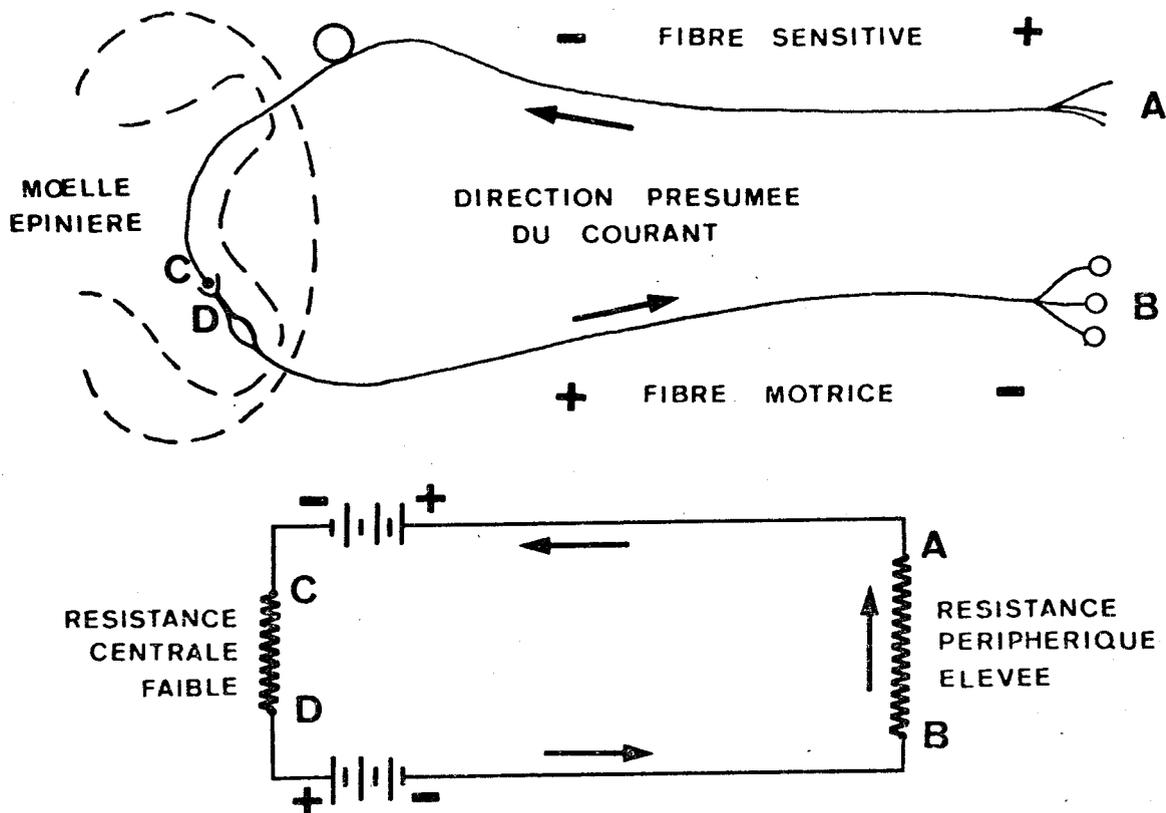


Figure 4 : Circuit composé de deux neurones. L'orientation de chaque neurone détermine la direction du courant. Un neurone sensitif et un neurone moteur constituent donc non seulement un arc réflexe simple mais aussi un circuit électrique complet. Le circuit électrique analogue illustre l'hypothèse selon laquelle la source de courant est concentrée dans le corps cellulaire ; la résistance de la synapse centrale (CD) aurait une résistance plus faible que la résistance périphérique (AB) (d'après BECKER, 1962 b).

2 - Evolution des PS au cours de la régénération ou la cicatrisation de membres

La comparaison de l'évolution des PS au cours de la régénération d'un membre de Triton ou de la cicatrisation d'un membre de Grenouille (espèce qui ne régénère pas à l'état adulte) montre des différences notables (BECKER, 1961 a). Chez les Urodèles

(Fig. 5), la section d'un membre provoque l'inversion de la polarité initiale conduisant à l'apparition d'une forte positivité. Celle-ci décroît rapidement et à partir du 6e jour suivant l'amputation, le moignon devient fortement négatif pendant environ 10 jours. Finalement, la polarité initiale se rétablit progressivement.

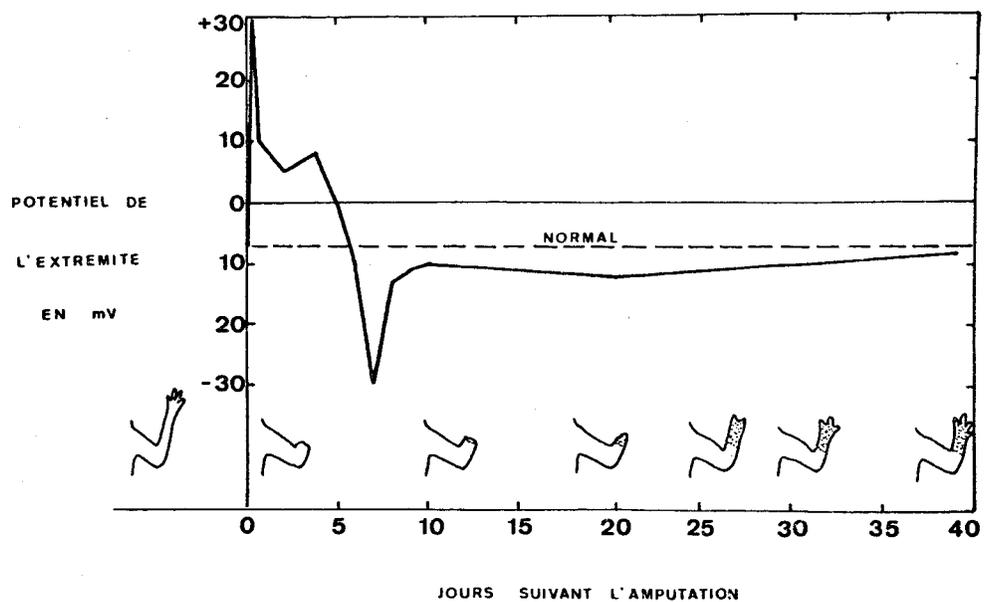


Figure 5 : Evolution des potentiels de surface au cours de la régénération d'un membre amputé de Salamandre. Le premier pic positif de valeur élevée correspond au moment de l'amputation. Le second pic positif est observé vers le 5e jour, et le maximum de négativité vers le 8e jour. La ligne discontinue correspond au potentiel du membre normal. Les schémas représentent les différentes étapes de la régénération (d'après BECKER, 1961 a).

Chez les Anoures (Fig. 6) si la section du membre est également suivie de l'apparition d'une forte positivité distale, par contre, aucune phase négative n'apparaît et les PS reprennent lentement leur valeur initiale au fur et à mesure que progresse la cicatrisation. Selon BECKER, l'inversion de polarité qui se produit

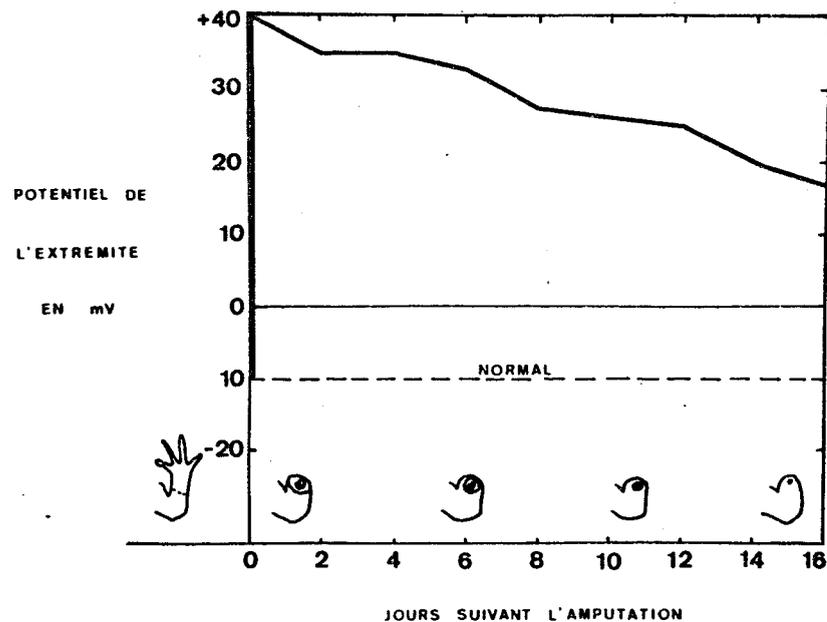


Figure 6 : Evolution des potentiels de surface au cours de la cicatrisation d'un membre antérieur amputé de Grenouille (animal qui ne régénère pas). Le pic positif correspond à l'amputation. Contrairement à la Salamandre (Fig. 5) cette polarité positive se maintient pendant une longue période et diminue progressivement jusqu'à la valeur mesurée avant l'amputation (ligne discontinue) ; la cicatrisation est alors complète (d'après BECKER, 1961 a).

immédiatement après la section est due à un arrêt du flux d'électrons circulant dans le nerf brachial, la phase positive des cinq jours suivants correspond à la dédifférenciation cellulaire et la phase négative à la différenciation et à la croissance axiale du blastème (BECKER, 1961 a).

3 - Stimulation des capacités régénératrices par le courant électrique

L'utilisation du courant électrique a été envisagée par BECKER pour apprécier les conséquences de l'augmentation de l'amplitude des PS naturellement présents à la surface des membres de Triton en régénération (BECKER, 1961 a). L'application, quelques minutes par jour, d'un courant électrique de même polarité que le moignon (positif pendant les cinq premiers jours, négatif pendant les dix suivants) induit une croissance plus forte du régénérat. Par contre, si les animaux dont les membres ont été sectionnés se déplacent au hasard à l'intérieur d'une cuve où circule en permanence

un courant électrique aucune stimulation n'est enregistrée (BECKER, 1961 a).

Ces expérimentations ont amené un certain nombre d'auteurs à utiliser le courant électrique pour tenter de contrôler la régénération (voir revue dans LASSALLE, 1978) ou d'augmenter les faibles capacités régénératrices des membres d'Anoures. Dans ce dernier cas, les techniques de stimulation sont diverses : excitation répétitive du nerf brachial (BODEMER, 1964), implantation d'un couple bimétallique argent-platine au niveau du moignon (SMITH, 1967), utilisation de piles au mercure glissées sous la peau (SMITH, 1974 ; BORGENS et coll., 1977 a). Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque le moignon est polarisé négativement. Dans ce cas apparaît un petit régénérat dans lequel se différencient quelques lobules cartilagineux. Ces résultats semblent confirmer l'interprétation de BECKER selon laquelle les PS d'origine nerveuse constituent un signal qui déclenche et contrôle les mécanismes impliqués dans la régénération qu'il s'agisse d'organes ou de membres (BECKER et coll., 1967, 1970 ; BECKER, 1972 a, 1972 b, 1974).

Cependant un certain nombre de travaux et d'observations sont difficilement interprétables dans le cadre de cette théorie. Ils concernent non seulement l'origine des PS mais aussi le rôle qui leur a été attribué dans la régénération. En effet, l'origine nerveuse des PS n'est pas compatible avec la persistance de ces potentiels observée après destruction de l'axe cérébro-spinal (MONROY, 1941). De même et bien que BECKER n'ait pas interprété cette observation, on peut s'interroger sur la signification de la diminution du gradient de PS lorsque celui-ci est mesuré directement à la surface des nerfs (BECKER et coll., 1962 a). De plus, il faut souligner que les enregistrements de BECKER obtenus chez diverses espèces (Planaire, Ver de terre) lui permettant d'affirmer que les ganglions correspondent à des zones électropositives sont tout à fait contraires aux enregistrements d'autres auteurs (HYMAN et BELLAMY, 1922 ; FLICKINGER et BLOUNT, 1957 pour les Planaires ; MOMENT, 1949-1950 ; KURTZ et

SHRANK, 1955 ; LASSALLE et BOILLY, 1973 pour les Oligochètes). D'autre part, la nécessité de l'intervention des PS dans le déclenchement et le contrôle de la régénération souffre d'exception non négligeable puisque leur absence chez l'Axolotl (SHURALEFF, 1968) ou leur augmentation à l'aide d'un champ électrostatique chez le Triton (SMITH, 1976) n'altèrent en rien les potentialités régénératrices de ces animaux.

Compte-tenu de ces résultats contradictoires et des restrictions que nous avons formulées mais aussi de l'intérêt fondamental et pratique que peuvent présenter les PS, il nous a paru opportun de reprendre l'étude des PS d'Amphibiens afin de déterminer non seulement leur origine mais aussi leur implication éventuelle dans la morphogenèse régénératrice.

La première partie de ce travail sera consacrée à l'étude de l'origine des PS. Après avoir déterminé les caractéristiques des PS de divers Amphibiens (Chapitre I), nous reprendrons l'étude du support tissulaire de ces PS (Chapitre II). L'origine des PS sera ensuite abordée par l'analyse des modifications de leur amplitude et de leur polarité induites par des facteurs comme les blessures ou la pression osmotique (Chapitre III) et les modifications de la composition ionique du milieu baignant l'animal (Chapitre IV). Enfin, dans le Chapitre V nous déterminerons le mécanisme qui préside à l'expression des PS.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous suivrons l'évolution des PS au cours de divers événements biologiques tels que la métamorphose, la mue (Chapitre VI) et la régénération (Chapitre VII).

MATERIEL ET TECHNIQUES

I - MATERIEL

A - AMPHIBIENS URODELES

Ces animaux sont capables de régénérer leurs membres même à l'état adulte.

1 - *Pleurodeles waltlii* Michah.

Les Pleurodèles proviennent d'un élevage réalisé au laboratoire.

2 - *Triturus alpestris*, Laur., *Triturus vulgaris* Laur.

Ces Tritons ont été récoltés dans les mares de la région.

3 - *Ambystoma mexicanum* Shaw. (Axolotl)*

Ces Amphibiens néoténiques sont élevés au laboratoire.

B - AMPHIBIENS ANOURES

Ces animaux perdent leurs capacités de régénération au moment de la métamorphose.

Rana temporaria, Linné, *Rana esculenta* Linné.

Ces grenouilles proviennent de récoltes effectuées dans les mares de la région.

II - TECHNIQUES

A - TECHNIQUES D'ELEVAGE

1 - Amphibiens Urodèles

Les animaux sont élevés en groupe ou isolément dans

* Je remercie Monsieur le Professeur HOUILLON et Monsieur le Professeur SIGNORET pour nous avoir aimablement fourni les oeufs et les jeunes larves d'Axolotl permettant la mise en route d'un élevage au laboratoire.

des récipients remplis d'eau de ville renouvelée deux à trois fois par semaine après la prise de nourriture. Les larves et les jeunes adultes sont nourris de larves de Chironome, les adultes de foie et de rate de Boeuf hachés.

2 - Amphibiens Anoures

Les Grenouilles sont maintenues dans des terrariums. Ces animaux refusent la plupart du temps toute nourriture mais sont capables de jeûner plusieurs mois.

B - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

1 - Microscopie photonique

Les lambeaux de peau sont fixés au Bouin Hollande. Les membres et les régénérats sont fixés de la même manière avec ou sans traitement décalcifiant selon l'âge de l'individu. Après inclusion dans la paraffine, ils sont débités en coupes sériées de 6 à 7 μ m d'épaisseur. Les coupes sont colorées à l'azan (variante à froid de Gabe).

2 - Microscopie électronique

Les lambeaux de peau sont fixés pendant une heure à la température du laboratoire au glutaraldéhyde à 2,5 % soit dans un tampon cacodylate 0,06 M pH 7,4, soit dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,4. Après lavage dans le tampon, les pièces sont post-fixées pendant une heure à 4° C dans le tétroxyde d'osmium à 1 % dans le même tampon. L'inclusion est réalisée dans l'araldite après déshydratation à l'acétone. Les coupes semi-fines sont colorées au Bleu azur. Les coupes ultra-fines réalisées au couteau de verre ou de diamant sont contrastées par l'acétate d'uranyle en solution alcoolique et par les sels de plomb (REYNOLDS, 1963). Les observations sont effectuées au microscope électronique SIEMENS Elmiskop I.

C - TECHNIQUES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

Les PS sont recueillis à l'aide d'électrodes impariarisables du type argent-argent chloruré. La construction de ces électrodes a été conçue de manière à les rendre extrêmement stables et à limiter la différence de potentiel (ddp) interélectrode à une valeur inférieure ou égale à 200 μ V. Pour cela, les fils d'argent chlorurés d'un diamètre de 2 mm et d'une longueur de 10 cm plongent dans un tube en U rempli d'une solution de NaCl 7 ‰. La partie du tube contenant le fil d'argent est rendu opaque à la lumière pour éviter la détérioration de la couche de chlorure d'argent. La liaison électrique entre ces électrodes et la surface de l'animal est assuré par des ponts constitués de tubes cathéter souples remplis de NaCl 7 ‰ et dans lesquels est glissé un fil de coton (Fig. 7). C'est ce dernier qui assure conjointement avec

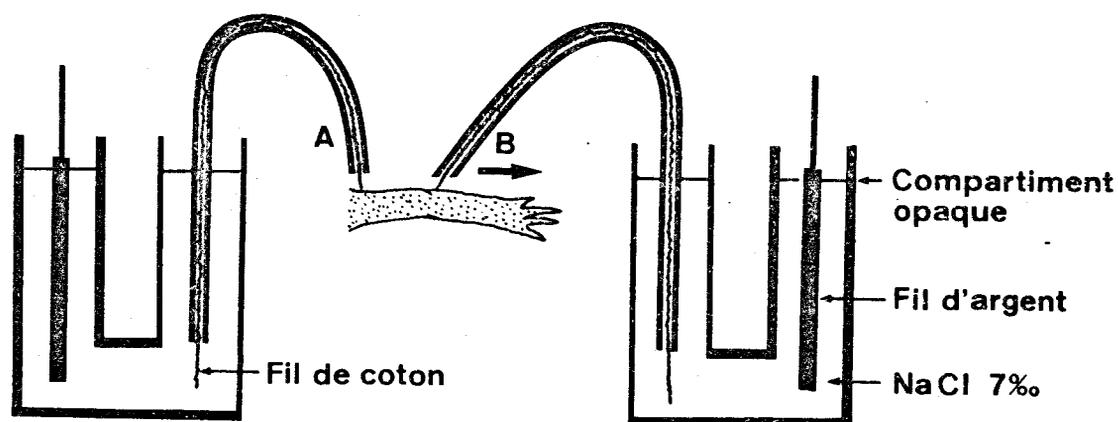


Figure 7 : Système d'électrodes utilisé pour l'enregistrement des PS.

A. Electrode de référence fixe.

B. Electrode d'enregistrement déplacée le long de l'axe proximo-distal du membre dans le sens de la flèche.

la solution saline qui l'imbibe constamment, le contact avec le tégument de l'animal. La souplesse de ce système évite toute irritation mécanique au niveau de la peau. La solution de NaCl 7 ‰ a été choisie en raison de ses caractéristiques physiologiques : les ions Na^+ et Cl^- ne provoquent aucune réaction néfaste au niveau cellulaire dans les limites des concentrations utilisées et la pression osmotique de ce liquide (220 mosM) est voisine de celle du milieu intérieur de l'animal. Les électrodes sont reliées à un oscillographe cathodique à mémoire (Textronix 5031) par l'intermédiaire d'un changeur d'impédance. Les enregistrements sont photographiés sur Polaroid.

Les PS sont mesurés sur des animaux anesthésiés et soustraits de leur milieu liquide. Nous avons analysé les facteurs qui pouvaient influencer la qualité des réponses obtenues dans ces conditions particulières : l'anesthésie, le degré d'humidité de la peau et les contacts mécaniques. Ni la nature de l'anesthésique (MS 222 ou chlorétone), ni la durée de l'anesthésie (10 à 30 mn), ni le moment de la mesure par rapport au réveil de l'animal n'ont d'influence notable sur l'amplitude et la polarité des PS. Par contre, le degré d'humidité de la peau peut être source d'artéfacts : une peau trop sèche engendre l'apparition au moment de la mesure d'effets capacitifs gênants, une peau trop humide provoque la formation de court-circuits dérivant une partie du courant enregistré. De plus, nous avons pu constater que des étirements mécaniques des membres pouvaient entraîner des modifications de la valeur des PS. Compte-tenu de ces observations, les conditions expérimentales suivantes ont été retenues : l'animal est anesthésié 15 mn dans une solution de MS 222 à 1 ‰ dans l'eau de ville ; après un court rinçage, la peau est humectée avec la solution de NaCl 7 ‰ pendant quelques minutes. L'animal est ensuite épongé sur un papier filtre, posé sur une plaque de verre, le membre soumis à la mesure étant lui-même isolé de cette plaque par un support en matière plastique. Durant toutes ces manipulations, l'animal est saisi à l'aide d'une paire de pinces par la région proximale de la queue s'il s'agit d'un Urodèle ou par la partie centrale du corps s'il s'agit d'un Anoure.

D - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

1 - Milieux d'incubation

Les tissus épidermiques sont incubés dans des milieux dont la composition ionique est la suivante :

- Milieu A pour la mesure de l'activité ATPasique totale (Na-K-Mg)

NaCl	100 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂	2 mM
Tris/HCl	40 mM pH 7,4
ATP, sel disodique	5 mM
[8- ³ H] ATP (29 Ci/mM)	5 µCi

- Milieu B pour la mesure de l'activité ATPasique liée au Mg²⁺ milieu A + 5 . 10⁻⁴ d'ouabaïne.

La différence des résultats obtenus avec le milieu A et le milieu B correspond à la mesure de l'activité ATPasique liée au Na/K. La méthode radioactive consiste à mesurer la quantité de [8-³H]ADP formée à partir du [8-³H] ATP initialement ajouté au milieu sous l'action de l'ATPase selon la réaction :



Cette méthode très sensible a été choisie de préférence au dosage colorimétrique des phosphates (Pi) libérés.

2 - Séparation des métabolites de l'ATP

La séparation électrophorétique s'étant révélée peu propice à la bonne séparation du mélange ATP-ADP en raison de la force ionique élevée du milieu d'incubation, nous avons été amenés à adopter la méthode chromatographique. La chromatographie est réalisée sur papier Whatman 3 MM (46x57 cm) dans un système solvant acide isobutyrique-ammoniaque-eau (66/1/33 ; V/V/V) pH 3,7

La Figure 8 donne un exemple de séparation obtenue à partir d'un mélange ATP-ADP-AMP dans le milieu d'incubation après une migration de 7 H. Les R_F de l'ATP, ADP, AMP sont respectivement de 0,23 ; 0,32 et 0,48.

3 - Détermination de l'activité enzymatique

Les lambeaux épidermiques sont incubés à la température du laboratoire sous agitation constante dans 200 μ l de la solution tamponnée radioactive. Au bout d'une heure de contact, 10 μ l du milieu sont déposés sur papier. Après migration chromatographique, les composés témoins sont repérés sous une lampe ultraviolette et le papier est découpé en bandes de 5 x 1 cm le long du trajet de migration (Fig. 8). Chaque bande est placée dans 5 cm³ de liquide

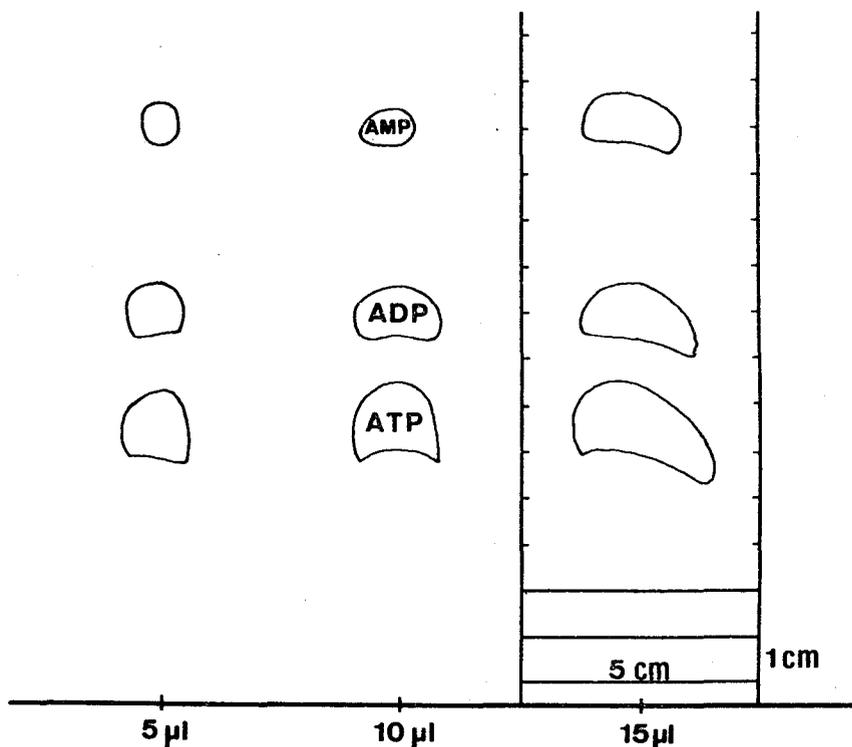


Figure 8 : Migration chromatographique de l'ATP et de ses dérivés dans les conditions décrites dans le texte.

scintillant (Lipoluma) et la détermination de la radioactivité est effectuée dans un compteur à scintillation (Intertechnique SL 30). Les résultats sont exprimés en coups par minute (cpm). Le pourcentage d'ADP formé est calculé en faisant le rapport du nombre de cpm correspondant à l'ADP sur le nombre total de cpm (ATP + ADP). Sachant que dans 200 μ l du milieu d'incubation, la quantité initiale d'ATP est de 1 μ M, il est alors possible de transformer le nombre de cpm en μ M d'ADP formé par heure et par lambeau.

4 - Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectuée par la méthode de LOWRY (1951) pour protéines insolubles après broyage des lambeaux épidermiques dans un microbroyeur de tissus (Duall).

PREMIERE PARTIE

CARACTERISTIQUES ET ORIGINE DES POTENTIELS DE SURFACE

CHAPITRE I

CARACTERISTIQUES DES POTENTIELS DE SURFACE

DU MEMBRE NORMAL

Avant d'aborder l'étude de l'origine des PS, il importe de préciser leurs caractéristiques. Ceux-ci ont été mesurés uniquement au niveau des membres en raison de l'intérêt expérimental qu'a suscité et qu'offre cette région du corps. C'est sur le Triton, *Pleurodeles waltlii* Michah. qu'a porté l'essentiel de notre travail, cependant, dans le cadre d'une étude comparative d'autres Amphibiens (Urodèles et Anoures) ont également été analysés.

1 - METHODOLOGIE

Chez tous les animaux utilisés, les PS ont été mesurés le long de l'axe proximo-distal du membre antérieur en posant une électrode de référence au niveau de l'épaule et en déplaçant la seconde électrode vers l'extrémité de la patte d'un mouvement continu (Fig. 7). Dans quelques cas, des mesures de ddp antéro-postérieures et dorso-ventrales ont été effectuées en trois points différents de la patte, le milieu de l'avant-bras, le coude et le milieu du bras, les deux électrodes étant alors placées en regard l'une de l'autre (Fig. 9).

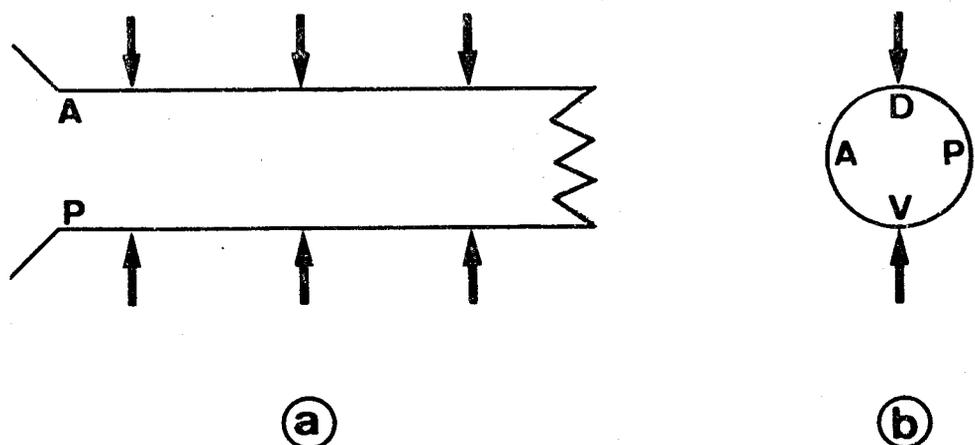


Figure 9 : Position des électrodes lors de la mesure des PS des axes antéro-postérieur (a) et dorso-ventral (b).

Les PS de Pleurodèle ont été mesurés chez les adultes et chez les larves. Chez les adultes, deux groupes d'animaux ont été constitués : le premier est composé d'individus d'âge identique conservés dans le même bac, nourris de la même façon et chez lesquels les mesures ont été effectuées le même jour ; le second groupe diffère du premier essentiellement par l'âge (différent d'un individu à l'autre) et par le fait que les mesures sont réalisées sur une période de temps d'un mois environ. Les autres espèces d'Amphibiens étudiées sont d'âge varié.

2 - RESULTATS

a - Potentiels de surface de Pleurodèle

α Premier groupe d'animaux adultes (36 mesures)

- ddp proximo-distales

La Figure 10a montre les enregistrements oscillographiques les plus fréquemment obtenus lors de la mesure des PS le long de l'axe proximo-distal. Ces potentiels se répartissent selon un profil caractéristique et sont distribués très généralement de façon non monotone tant sur la face dorsale que sur la face ventrale, la ddp augmente régulièrement de la base du membre jusqu'au poignet puis décroît lentement jusqu'à l'extrémité des doigts. L'étude statistique et la schématisation graphique (Fig. 10, b, c) des enregistrements nous a amené à considérer les trois points les plus représentatifs de ce profil de répartition des PS : le point A constitue le potentiel de référence (potentiel 0 quand les deux électrodes sont court-circuitées) et correspond à la base du membre, le point B, point le plus positif, correspond à la zone comprise entre le milieu de l'avant-bras et le poignet et le point C caractéristique de l'extrémité distale du membre. Les moyennes des valeurs obtenues pour ces différents points sur les faces dorsale et ventrale ont été reportées dans le tableau 1 et sur la Figure 10. Les légères différences existant entre les valeurs de faces dorsale et ventrale ne sont pas significativement différentes ; par contre, les points B et C d'une même face ont des valeurs qui diffèrent de manière significative.

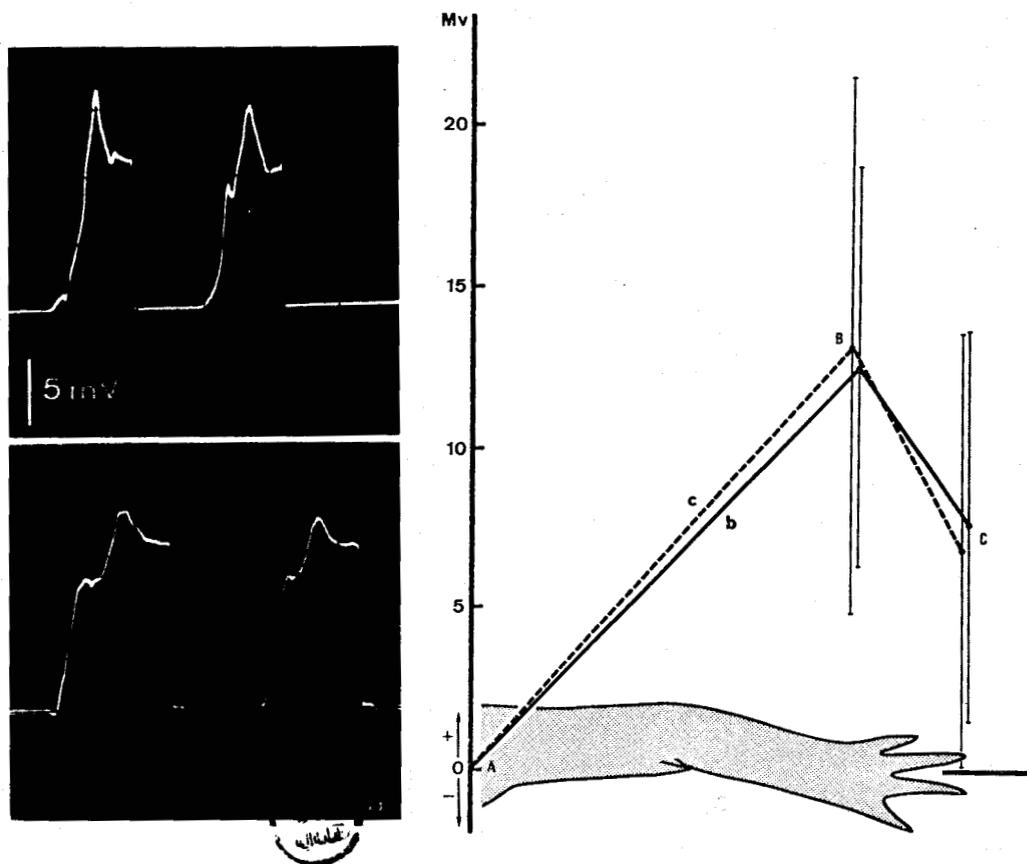


Figure 10 : Valeurs des PS le long de l'axe proximo-distal du membre de Pleurodèle (1er groupe d'animaux).
a - enregistrements obtenus sur deux membres différents (deux mesures successives par membre) ;
b - profil moyen des PS de la face dorsale ;
c - profil moyen des PS de la face ventrale.

Bien que nous n'en ayons pas tenu compte dans le calcul de nos moyennes, il faut cependant signaler que des PS à profil complexe peuvent être occasionnellement enregistrés (Fig. 11). Ils sont caractérisés par l'alternance irrégulière de phases positives et de phases négatives.

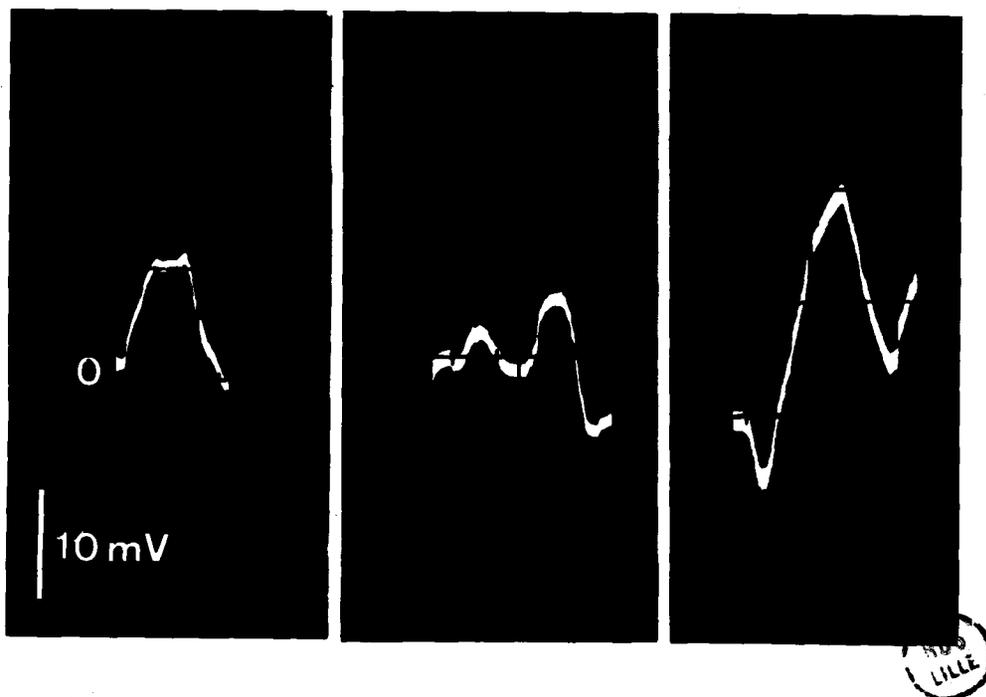


Figure 11 : Exemples de PS à profil complexe de Pleurodèle.

	A (RÉFÉRENCE)	B	C
DDP DE LA FACE DORSALE	0	$+ 12,5 \pm 6,2$ mV	$+ 7,6 \pm 6,1$ mV
DDP DE LA FACE VENTRALE.....	0	$\pm 13,1 \pm 8,4$ mV	$+ 6,8 \pm 6,9$ mV

Taleau 1 : Différence de potentiel le long de l'axe proximo-distal du membre de Pleurodèle (premier groupe d'animaux).

- ddp transversales

Les mesures révèlent une ddp de faible amplitude ainsi qu'une grande dispersion des valeurs obtenues (Tableau 2).

. ddp antéro-postérieures. La face antérieure du membre est en moyenne négative de quelques millivolts par rapport à la face postérieure aussi bien au niveau du bras (-3,3mV) que de l'avant-bras (-3,6 mV), la zone du coude étant légèrement plus

négative (-4,8 mV) que les zones adjacentes.

. ddp dorso-ventrales. Par rapport à la face dorsale, la face ventrale du membre est très légèrement négative (-0,2 mV) au niveau du bras, légèrement positive (+1,5 mV) dans la zone du coude et, au niveau de l'avant-bras, de même valeur qu'au niveau du segment proximal (-0,2 mV).

	: MILIEU DU BRAS :	COUDE	: MILIEU DE
	:	:	: L'AVANT-BRAS
DDP ANTÉRO-POSTÉRIEURE (RÉF:FACE POSTÉRIEURE)..	- 3,3 ± 2,4 mV	- 4,8 ± 3,8 mV	- 3,6 ± 3,7 mV
DDP DORSO-VENTRALE (RÉF. : FACE DORSALE)....	- 0,2 ± 3,2 mV	+ 1,5 ± 4,0 mV	- 0,2 ± 4,7 mV

Tableau 2 : Différences de potentiel transversales du membre de Pleurodèle (1er groupe d'animaux).

β Deuxième groupe d'animaux adultes (97 mesures)

Chez ces animaux, seuls les PS de l'axe proximo-distal de la face dorsale du membre ont été mesurés. Les résultats (Fig. 11 et Tableau 3) montrent que dans 86 % des cas (Fig. 12, a), les valeurs de PS sont semblables à celles obtenues dans le groupe précédent, la très légère différence observée entre les deux groupes n'étant pas statistiquement significative. Par contre, dans 14 % des cas, le profil de potentiel est complètement inversé (Fig. 12, b). Toutefois, cette inversion de potentiel est temporaire, en effet, lors d'une seconde mesure effectuée quelques jours après, on constate que la positivité distale est rétablie.

	: A :	B	: C
DDP DE LA FACE DORSALE (86 % DES MESURES).....	0	+13,6 ± 5,3 mV	+ 10,5 ± 7,3 mV
DDP DE LA FACE DORSALE (14 % DES MESURES).....	0	- 10,4 ± 4,8 mV	- 7,3 ± 5,1 mV

Tableau 3 : Différences de potentiel le long de l'axe proximo-distal de la face dorsale du membre de Pleurodèle (2ème groupe d'animaux).

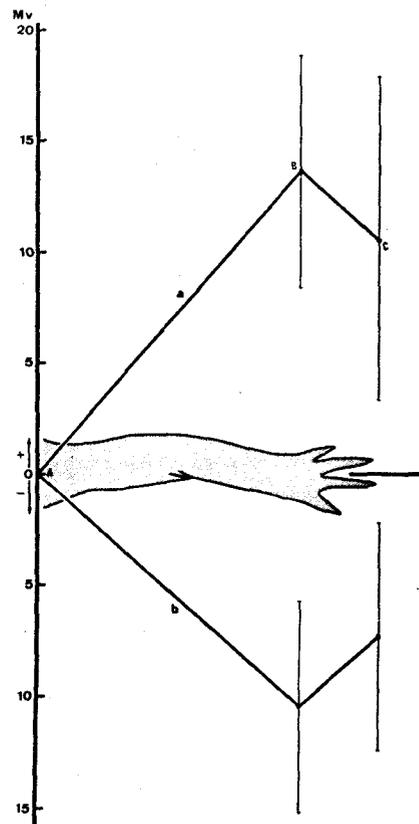


Figure 12 : Valeurs des PS le long de l'axe proximo-distal du membre de Pleurodèle (2ème groupe d'animaux).
a - 86 % des mesures
b - 14 % des mesures.

γ Larves de Pleurodèles

Les membres des larves de Pleurodèles ne présentent pas de PS.

b - Potentiels de surface d'autres Amphibiens

Seuls les PS le long de l'axe proximo-distal ont été enregistrés.

Les membres de *Triturus alpestris* et *Triturus vulgaris* présentent des PS dont le profil est tout à fait semblable à celui du Pleurodèle, l'amplitude étant cependant plus élevée (Tableau 4). Des inversions de gradient ont également été constatées.

	A	B	C
DDP DE LA FACE DORSALE. . . .	0	+29 ± 9.9 mV	+20 ± 6.75 mV

Tableau 4 : Différences de potentiel des régions A, B, C de la face dorsale du membre de *Triturus*.

Chez *Rana temporaria*, si les PS peuvent présenter un profil identique à celui de *Triturus*, la plupart du temps, ce profil est plus complexe (Fig. 13), un pic positif (région du coude) étant intercalé entre deux pics négatifs (région du bras et du poignet).

Enfin, les membres d'Axolotl ne présentent pas de PS.

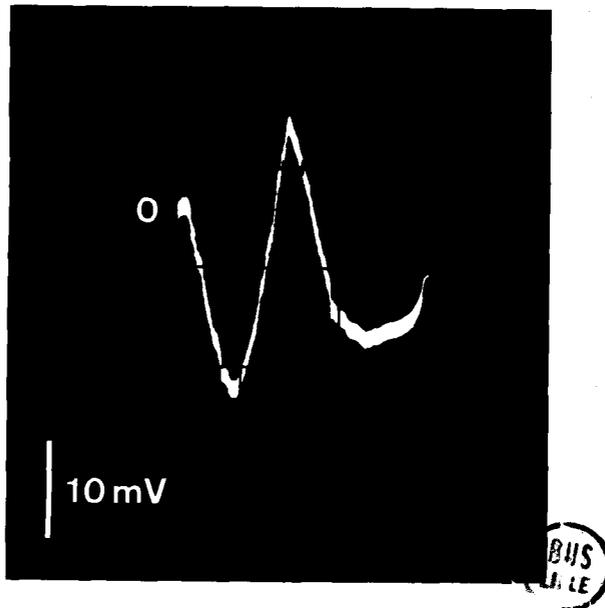


Figure 13 : Valeurs des PS le long de l'axe proximo-distal du membre de *Rana temporaria*.

3 - DISCUSSION

En dépit d'une variabilité interindividuelle importante comme en témoignent les écarts-types relativement grands et même des variations individuelles pouvant aller dans certains cas jusqu'à

l'inversion complète de la polarité électrique du membre, les résultats obtenus montrent cependant clairement que la surface des membres antérieurs des Amphibiens sont caractérisés par la présence de potentiels électriques répartis en gradient le long de l'axe proximo-distal. Des ddp sont également décelables sur les axes antéro-postérieur et dorso-ventral ; la faible valeur de ces potentiels et surtout leur grande variabilité nous a conduit à ne considérer dans notre étude que les potentiels de l'axe proximo-distal en raison de leur grande amplitude et de leur bonne reproductibilité. De plus, c'est la ddp entre les points A et B qui sera le plus souvent l'objet de notre analyse, le point C correspondant à une zone (l'extrémité des doigts) se prêtant relativement mal à une intervention expérimentale.

Dans la plupart de nos enregistrements et dans toutes leurs représentations graphiques, la valeur des PS croît de manière continue de la région proximale (potentiel 0) à la région distale (+13 mV en moyenne pour le point B). Le caractère régulier de ce gradient de potentiel pourrait suggérer que le membre se comporte comme un véritable dipôle dont les sources de potentiel seraient localisées au niveau de l'épaule et au niveau du poignet. En fait cette interprétation semble beaucoup trop schématique et ne peut rendre compte des potentiels complexes que l'on peut rencontrer dans certains cas (Fig. 11). Ces PS doivent plutôt être interprétés en terme de gradient continu de potentiels, chaque région ayant son propre potentiel, différent de celui de la région voisine ; il n'y aurait pas un seul dipôle mais tout un ensemble de dipôles placés en série.

Nos résultats confirment et précisent ceux obtenus chez *Triturus cristatus* par MONROY (1941) et sont en accord avec ceux présentés récemment par FONTAS et MAMBRINI (1977 a) chez *Rana esculenta* et par CARLSON (communication personnelle, 1977) chez *Triturus viridescens*. Par contre, ils diffèrent de ceux de BECKER (1960, 1962 a) puisque cet auteur signale la présence d'un gradient continu mais négatif et d'amplitude élevée au niveau des membres de *Triturus viridescens* (Fig. 2).

Chez les larves d'Amphibiens, nos résultats confirment les observations de SHURALEFF (1968) chez l'Axolotl mais aussi précisent que les larves normales (non néoténiques) d'Amphibiens Urodèles sont également dépourvues de PS.

CONCLUSION

Les membres des Amphibiens adultes sont caractérisés par la présence de PS répartis en gradient le long de l'axe proximo-distal. Dans la plupart des cas (86 %), l'extrémité du membre est positive par rapport à sa base. Des PS existent également au niveau des axes antéro-postérieur et dorso-ventral mais leur amplitude est faible et leur polarité variable.

Les membres des larves de Pleurodèle et d'Axolotl sont dépourvus de PS.

CHAPITRE II

SUPPORT TISSULAIRE DES POTENTIELS DE SURFACE

L'origine des PS des Amphibiens ayant conduit à des interprétations contradictoires (MONROY, 1941 ; BECKER, 1960), il convenait de reprendre cette étude afin de déterminer la nature exacte du tissu responsable de l'expression des PS.

1 - METHODOLOGIE

L'origine tissulaire des PS de Pleurodèle a été recherchée en procédant à l'élimination successive des tissus susceptibles d'intervenir dans l'expression des PS. Il s'agit :

- du système nerveux que BECKER (1960) estime être la source des PS ;
- du squelette, des PS ayant été détectés à la surface des os longs de mammifères (FRIEDENBERG et coll., 1971) ;
- de la peau et de l'épiderme sur lesquels ces potentiels sont finalement mesurés.

Nous avons aussi effectué des isolements de membre afin de soustraire celui-ci à toute influence systémique.

Les modes opératoires sont les suivants :

- dénervation : elle est réalisée par la section des nerfs formant le plexus brachial (FRANCIS, 1934) au niveau de l'épaule, la circulation sanguine étant respectée ou non. Nous avons vérifié que cette dénervation entraîne bien la perte des capacités régénératrices du membre.

- ablation de l'os : elle est obtenue par extirpation totale ou partielle de l'humérus après incision longitudinale de la peau et des muscles de la face dorsale, l'intégrité du nerf étant respectée.

- ablation de peau : l'ablation de peau est effectuée chirurgicalement sur une partie quelconque du membre et concerne des surfaces de taille différente.

- ablation de l'épiderme : elle est réalisée de deux façons différentes. premier type d'ablation : elle est effectuée sur des membres irradiés* ou régénérant une plaie ; dans ce cas,

* Les rayons X (2000 R) ne provoquent aucune modification significative des PS.

l'épiderme se détache facilement du tissu sous-jacent. Second type d'ablation : elle est réalisée sur des membres sains isolés placés pendant 15 mn à 37° C dans une solution à 1 °/oo d'EDTA dans le liquide de Steinberg sans Ca ni Mg.

- isolement de membre, les membres sont isolés par section, le plus près possible de l'épaule.

2 - RESULTATS

La plupart de ces résultats ont fait l'objet d'une note (LASSALLE, 1974).

a - Dénervation

La dénervation a pour effet immédiat d'inverser le gradient de potentiel proximo-distal (Tableau 5 et Fig. 14, b). On constate que la valeur moyenne obtenue pour le point B se situe vers - 4 mV. Cette moyenne est cependant affectée d'écart-types très importants traduisant une grande variabilité des résultats ;

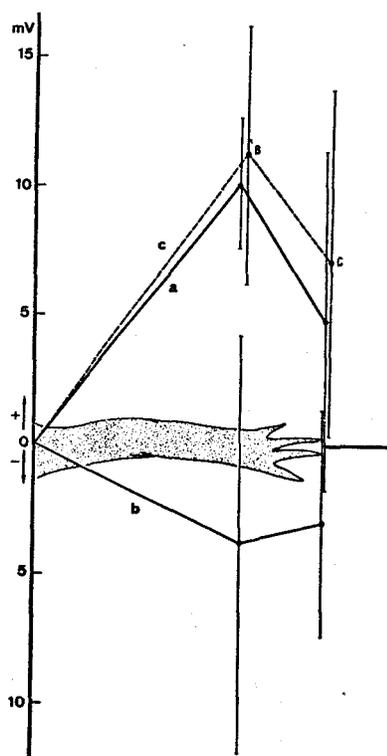


Figure 14 : Influence de la dénervation sur la valeur des PS le long de l'axe proximo-distal du membre de Pleurodèle (13 cas).
a - avant la dénervation
b - quelques minutes après l'opération
c - 48 H après l'opération.

en effet, l'inversion de potentiel peut être beaucoup plus prononcée (-15 à -20 mV) mais parfois cette inversion ne se produit pas et seule une diminution de la valeur initiale du gradient positif est simplement observée. Ces effets de la dénervation sur les PS sont tout à fait temporaires : 24 à 48 heures après la dénervation le gradient normal est rétabli (Fig. 14 et 15). Ces modifications

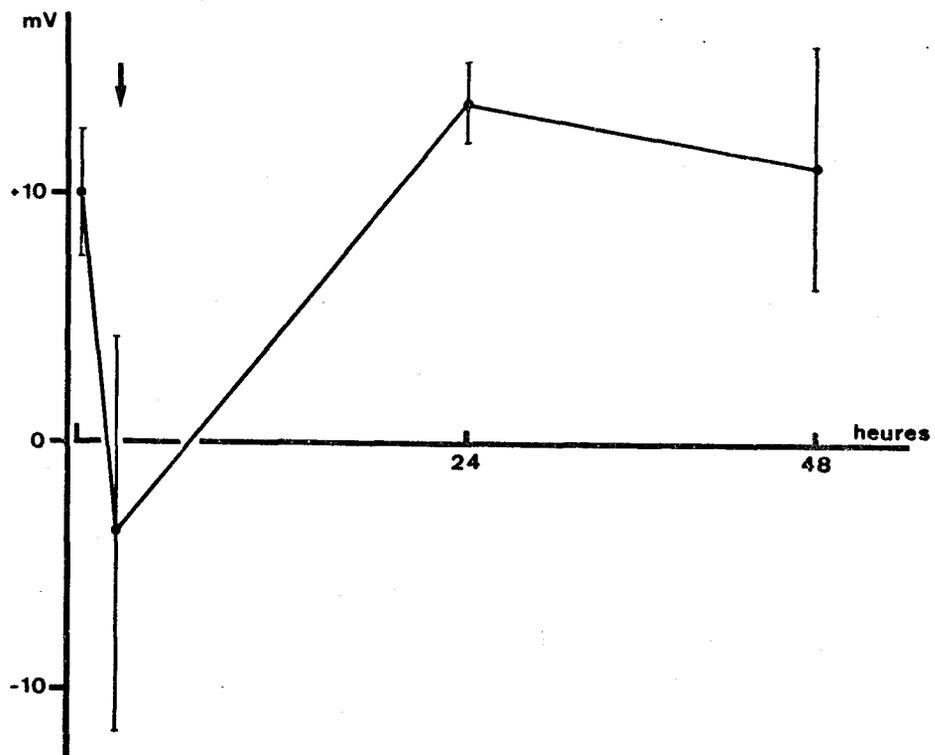


Figure 15 : Evolution des PS de la région B du membre de Pleurodèle après dénervation (ψ).

temporaires se produisent également chez les animaux témoins non dénervés ayant subi l'incision de peau et de muscle nécessaire au dégagement du nerf brachial (Tableau 5).

	EXPÉRIMENTÉS (13 CAS)		TÉMOINS (6 CAS)	
	B	C	B	C
AVANT L'OPÉRATION..	+ 10,1 ± 2,5	+ 4,8 ± 6,5	+ 11,8 ± 5,2	+ 5,6 ± 6,2
APRÈS DÉNERVATION.	- 3,8 ± 8,0	- 3 ± 4,4	- 5,1 ± 9,1	- 4,6 ± 6,7
48 H APRÈS LA DÉ- VATION.....	+ 11,2 ± 5,0	+ 7 ± 6,7	+ 12,3 ± 5,8	+ 6,7 ± 6,3

Tableau 5 : Influence de la dénervation sur les PS de l'axe proximo-distal du membre de Pleurodèle (les valeurs sont exprimés en mV).

b - Extirpation d'os

L'humérectomie totale ou partielle entraîne des perturbations du gradient de potentiel se traduisant par l'apparition d'une déflexion négative correspondant à la zone désossée (Fig. 16, b). Un mois après l'opération, le gradient de potentiel est complètement rétabli (Fig. 16, c) alors que l'os n'a pas régénéré. Les témoins ayant subi uniquement une incision longitudinale intéressant la peau et les muscles du bras présentent une évolution identique des PS.

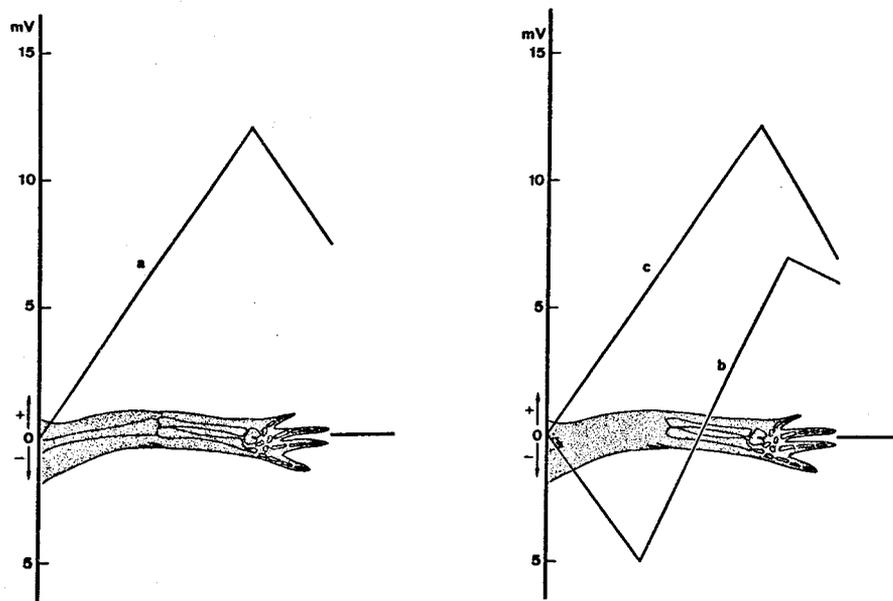


Figure 16 : Influence de l'humérectomie. a - avant l'opération ; b - quelques minutes après l'opération ; c - un mois après l'opération.

c - Ablation de peau et d'épiderme

L'ablation de la peau ou uniquement de l'épiderme entraîne dans 100 % des cas une disparition complète du gradient de potentiel dans la zone opérée c'est-à-dire au niveau où le muscle ou le derme est mis à nu. Cette région dépourvue de gradient de potentiel est cependant nettement positive par rapport au tégument (Fig. 17).

Des tentatives de mesure de PS réalisées sur des lambeaux de peau ou d'épiderme isolés du membre de Pleurodèle ont toujours donné des résultats décevants, la valeur des PS étant très faible dans ces conditions. Par contre, quelques essais réalisés sur des lambeaux de grande taille prélevés sur les membres antérieurs de Grenouille ont montré que le gradient de potentiel se conserve sur la peau isolée.

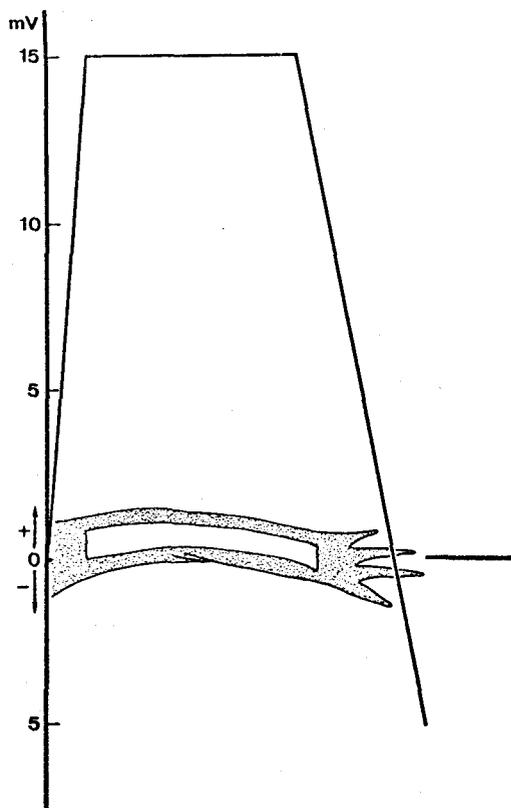


Figure 17 : Influence de l'excision d'un lambeau de peau intéressant la quasi-totalité de la face dorsale du membre de Pleurodèle.

d - Isolement de membre

L'isolement de membre provoque une inversion complète du gradient de potentiel pour dix membres sur onze possédant avant isolement un gradient positif (Fig. 18). Un seul membre a gardé inchangé son gradient de potentiel après isolement ; toutefois, il convient de signaler que dans ce cas la section passait à travers une zone de peau régénérée occupant la face dorsale de l'avant-bras. Les membres possédant avant isolement un gradient de potentiel négatif ont gardé le même profil (Fig. 19) après isolement bien que de valeur plus élevée (Tableau 6).

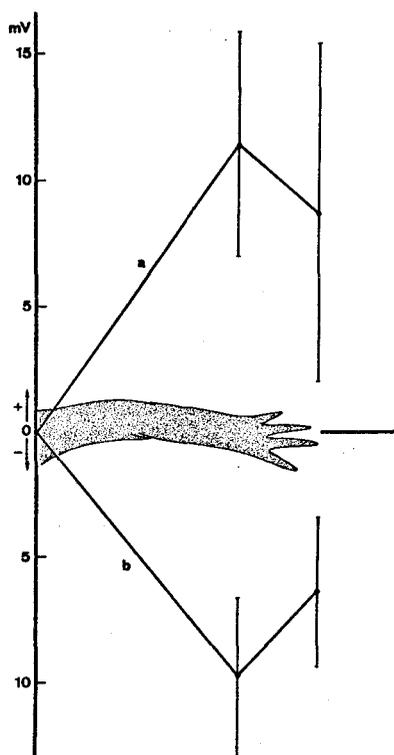


Fig.18

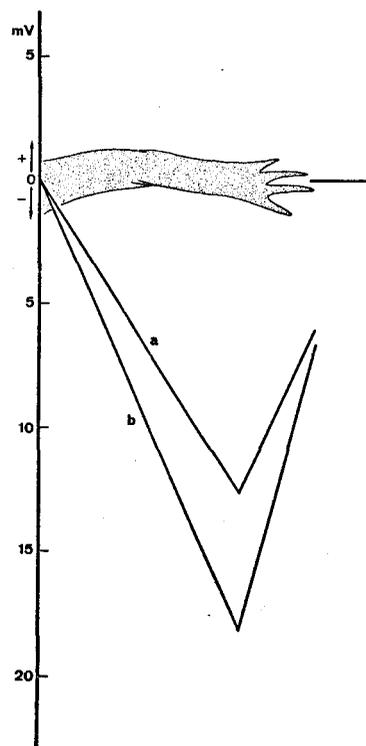


Fig.19

Figure 18 : Influence de l'isolement complet de membres présentant un gradient de potentiel à pente positive avant isolement.

a - avant isolement

b - quelques minutes après l'isolement.

Figure 19 : Influence de l'isolement complet de membres présentant un gradient de potentiel à pente négative avant isolement.

a - avant isolement

b - quelques minutes après l'isolement.

		B	C	B	C
GRADIENT POSITIF 11/13 : GRADIENT NÉGATIF 2/13					
AVANT ISOLEMENT.....		+11.4 ± 4.4	+8.7 ± 6.7	- 12.5	- 6.0

APRÈS	GRADIENT	:	:	:	:
	INVERSÉ (10/11)	-9,8 ± 3,2	- 6,3 ± 3,0	:	:
ISOLEMENT	GRADIENT	:	:	:	:
	INCHANGÉ (1/11)	+ 12	+ 10	- 18,0	- 6,5

Tableau 6 : Modifications des PS à la suite de l'isolement du membre de Pleurodèle (les valeurs sont exprimées en mV).

3 - DISCUSSION

Les diverses expériences d'ablation montrent que seule l'absence de peau ou d'épiderme entraîne une abolition complète et durable du gradient de potentiel proximo-distal. Ce gradient existe aussi à la surface des lambeaux de peau isolés à condition que ceux-ci soient de taille suffisante. Il est vraisemblable que la petite taille de certains lambeaux entraîne l'apparition d'artefacts de mesure (potentiels de lésion, court-circuits...) qui rendent celle-ci difficilement interprétable. La dénervation et l'extirpation d'os par contre ne provoquent que des perturbations temporaires du gradient. Des résultats semblables obtenus chez les témoins suggèrent que ces modifications temporaires résultent de lésions épidermiques occasionnées au cours des expériences de dénervation et d'humérectomie. L'état du tissu épidermique au moment de la mesure apparaît en effet jouer un grand rôle dans l'expression des PS puisque lors de l'isolement de membre, le seul cas de non inversion de gradient de potentiel concernait une patte dont la peau était engagée dans un processus de régénération.

Nos résultats sont donc contraires à ceux de BECKER (1960, 1961 a, 1961 b, 1962) qui estime que chez *Triturus viridescens* et *Rana catesbiana*, seul le nerf brachial est à l'origine des PS. Cependant, l'analyse des travaux de cet auteur montre que l'ablation

de la peau de la patte postérieure de *Rana* entraîne une diminution des PS. Cette observation nous incite à penser que chez les espèces étudiées par cet auteur la peau exerce aussi un rôle important dans l'expression des PS. Nos résultats ont d'ailleurs été confirmés par ROSE et ROSE (1974) qui ont montré que la dénervation de *Triturus viridescens* n'affecte pas les PS et récemment par FONTAS et MAMBRINI (1977 b) qui situent le générateur responsable des PS de *Rana esculenta* dans le tégument à l'exclusion des tissus musculaire et nerveux sous-jacents.

CONCLUSION

Le support tissulaire des PS du Pleurodèle est constitué par l'épiderme. Il correspond au seul tissu dont l'absence entraîne l'abolition des PS. Ce résultat remet en cause l'origine nerveuse des PS préalablement admise par BECKER.

CHAPITRE III

FACTEURS SUSCEPTIBLES DE MODIFIER

LES POTENTIELS DE SURFACE

Nous avons démontré que l'épiderme constitue le support tissulaire des PS ; nous envisagerons maintenant l'étude de leur origine au sein de ce tissu par l'analyse des modifications de PS induites par divers agents altérant la structure du tégument. Pression osmotique et blessures sont les deux facteurs qui ont été retenus en raison de l'importance qu'ils présentent dans le fonctionnement normal du tégument ; l'un modifie l'intégrité fonctionnelle de la peau (pression osmotique), l'autre son intégrité structurale (blessures).

I - PRESSION OSMOTIQUE

1 - METHODOLOGIE

Nous avons appliqué des solutions hypo et hypertoniques soit sur tout le membre, soit sur une partie seulement de celui-ci (région proximale ou région distale).

Les milieux hypotoniques sont constitués par l'eau d'élevage ou une solution de NaCl à 2 ‰.

Les milieux hypertoniques sont tous équilibrés à 720 mosM. Ils contiennent soit du NaCl à 21 ‰, soit du NaCl à 7 ‰ additionné d'une autre substance douée de propriétés particulières telles que :

- le chlorhydrate de choliné, substance permettant d'augmenter sélectivement la concentration en ions Cl^- , l'ion choliné étant considéré comme très peu pénétrant ;

- le propionate de sodium ; dans ce cas, seule la concentration de l'ion Na^+ est augmentée, l'ion propionate étant imperméant ;

- le saccharose, disaccharide non ionisable, non pénétrant ;

- l'urée, petite molécule non ionisable, très soluble et pénétrante.

2 - RESULTATS

a - Solutions appliquées sur tout le membre

α Milieus hypotoniques : ces milieux ne modifient pas le gradient de potentiel quel que soit le temps d'application.

β Milieus hypertoniques

. NaCl 21 ‰ : l'application de cette solution entraîne la disparition du gradient de potentiel au bout de cinq à dix minutes.

. NaCl 7 ‰ + propionate de sodium ou chlorhydrate de choline : l'augmentation sélective de la concentration en ions Na^+ ou en ions Cl^- entraîne une forte diminution de la valeur du gradient de potentiel sans toutefois l'annuler même après vingt minutes de contact.

. NaCl 7 ‰ + saccharose : on obtient une diminution d'environ 30 à 50 % de la valeurs du gradient de potentiel sans que le sens en soit modifié et ceci au bout d'un temps relativement long (vingt minutes).

. NaCl 7 ‰ + urée : l'utilisation de cette solution provoque au bout d'un temps très bref (deux à trois minutes) une disparition totale du gradient de potentiel.

Tous ces phénomènes sont réversibles au bout de soixante minutes ou plus.

b - Solutions appliquées sur une partie du membre

- NaCl 21 ‰ sur la partie proximale (Fig. 20) : deux cas sont à envisager selon le sens du gradient de potentiel mesuré avant l'application de la solution hypertonique :

. gradient de potentiel positif : dans ce cas, il se produit une inversion complète du gradient, la partie distale du membre devenant négative par rapport à la partie proximale (Fig. 20, a') c'est-à-dire que la partie traitée devient positive par rapport à la partie distale non traitée.

. gradient de potentiel négatif : dans ce cas, la polarité est inchangée mais l'amplitude augmente. La région

distale devient donc plus négative (Fig. 20, b') ce qui correspond à une augmentation de la positivité proximale.

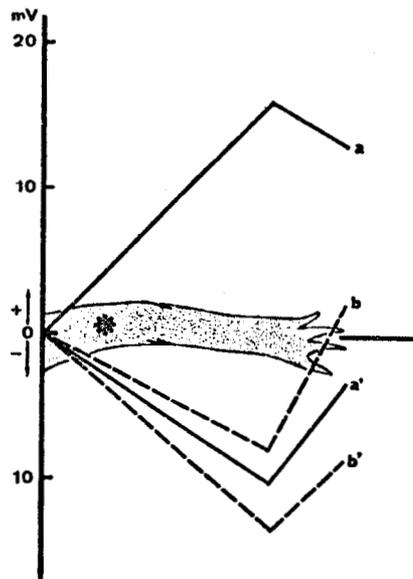


Fig.20

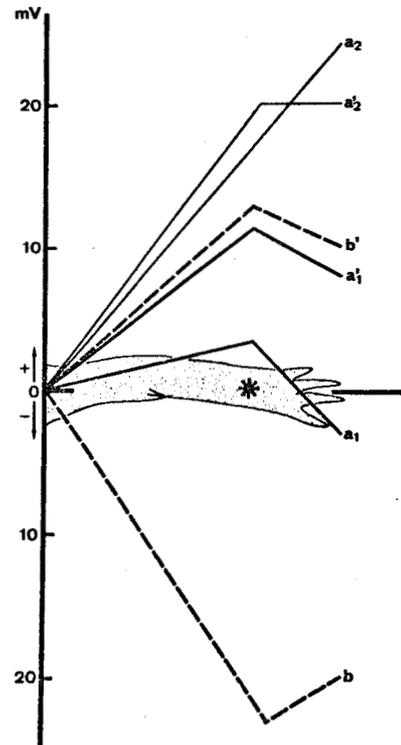


Fig.21

Figure 20 : Influence du NaCl 21 ‰ placé sur la partie proximale du membre (*) de Pleurodèle.

- a, a' : cas d'un gradient de potentiel positif
 - a : avant l'application de la solution
 - a' : après
- b, b' : cas d'un gradient de potentiel négatif
 - b : avant l'application de la solution
 - b' : après.

Figure 21 : Influence du NaCl 21 ‰ placé sur la partie distale du membre (*).

- a₁, a'₁ : cas d'un gradient de potentiel positif de faible amplitude.
 - a₁ : avant l'application de la solution
 - a'₁ : après
- a₂, a'₂ : cas d'un gradient de potentiel positif de forte amplitude.
 - a₂ : avant l'application de la solution
 - a'₂ : après
- b, b' : cas d'un gradient négatif.
 - b : avant l'application de la solution
 - b' : après.

- NaCl 21 o/oo sur la partie distale (Fig. 21) :
selon le sens et la valeur du gradient de potentiel avant l'application de la solution hypertonique, les modifications obtenues sont différentes :

- . gradient de potentiel positif de faible amplitude : la valeur du gradient augmente nettement (Fig. 21, a₁) ;
- . gradient de potentiel positif de forte amplitude : le gradient reste positif mais s'annule dans la zone traitée (Fig. 21, a₂) ;
- . gradient de potentiel négatif : le gradient s'inverse et devient positif (Fig. 21, b').

3 - DISCUSSION

L'application de diverses solutions hypertoniques de même osmolarité sur la peau des membres de Pleurodèle provoque réversiblement soit une disparition complète, soit une diminution plus ou moins forte du gradient de potentiel selon la substance utilisée. Il semble donc que l'augmentation de la pression osmotique à elle seule ne soit pas suffisante pour provoquer dans tous les cas la disparition du gradient de potentiel et qu'il est nécessaire de tenir compte de la nature chimique du soluté utilisé. Le fait que la molécule soit ionisable ou non n'est cependant pas le facteur déterminant puisque l'urée joue le même rôle que le NaCl et même agit plus rapidement que celui-ci. Ce serait donc plutôt le caractère perméant de la molécule qui rend la solution hyperosmotique active puisque seuls l'urée et le NaCl sont capables d'abolir complètement et dans un temps très court, le gradient de potentiel. Il est intéressant de souligner la relation qui existe entre nos observations et celles concernant les paramètres électriques mesurés de part et d'autre de la peau de grenouille isolée ou de la vessie de crapaud. En effet, les résultats obtenus dans ces deux cas après application de solutions hypertoniques du côté externe de la peau (USSING, 1965) ou sur la face muqueuse de la vessie (WADE et coll., 1973) montrent un parallélisme étroit avec les nôtres, tant en ce qui concerne l'intensité que la vitesse des réactions obtenues. C'est ainsi

qu'avec l'urée par exemple, la résistance électrique et la différence de potentiel chutent brutalement alors que l'utilisation d'un trisaccharide, le raffinose, provoque des modifications mineures. Ces perturbations des caractéristiques de la peau isolée et de l'épithélium vésical sont expliquées (WADE et coll., 1973 ; ERLIJ et MARTINEZ-PALOMO, 1972 ; WADE et KARNOVSKY, 1974) par l'ouverture de jonctions cellulaires ("tight-junctions") sous l'effet combiné de la pression osmotique et de la présence dans le milieu de molécules perméantes ; cette ouverture permet alors un passage passif important desions du milieu extérieur vers le milieu intérieur. Dans ces conditions, la disparition du gradient de potentiel du membre s'expliquerait par l'ouverture de telles jonctions, le milieu extérieur venant alors en contact avec le milieu intérieur c'est-à-dire avec un milieu chargé positivement par rapport au milieu externe (Fig. 22). La possibilité d'obtenir des inversions de gradient après application localisée

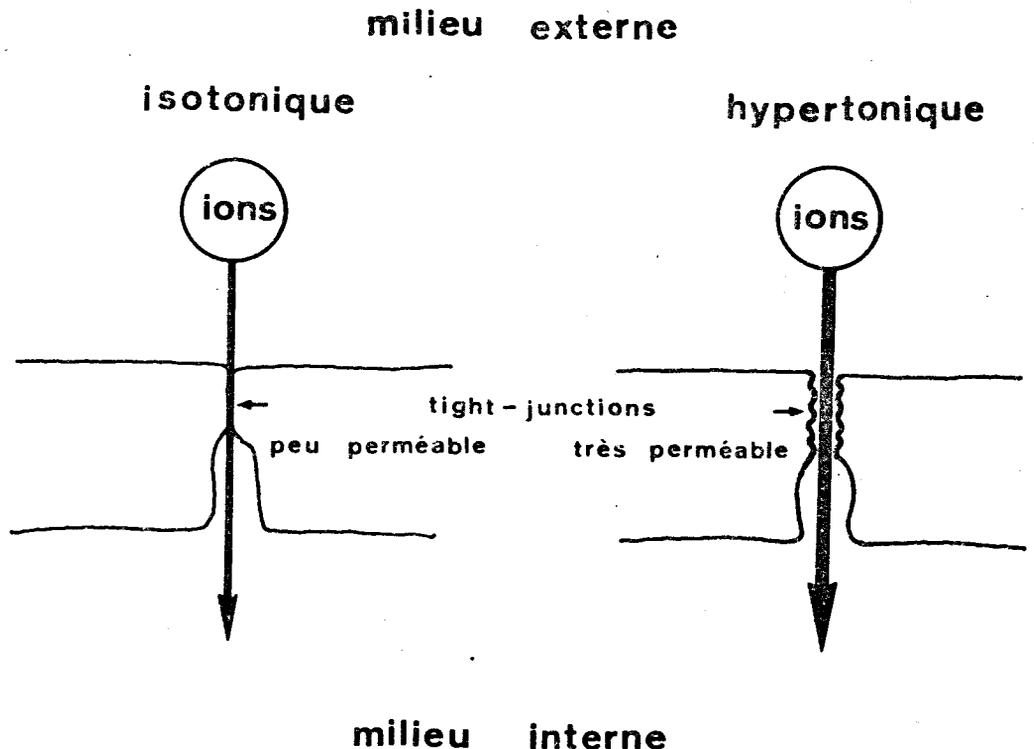


Figure 22 : Schéma résumant l'influence d'un milieu externe hyperosmotique sur la perméabilité passive du tégument. Seule la première couche de cellules vivantes a été représentée.

de solutions hypertoniques confirme cette hypothèse ; les zones où le milieu extérieur est rendu hyperosmotique deviennent positives par rapport aux zones où la pression osmotique est normale.

L'étude des effets des milieux hyperosmotiques permet donc de conclure qu'une augmentation locale de la perméabilité passive du tégument et donc de la diminution de la ddp existant de part et d'autre de ce tégument (entre milieux externe et interne) provoque une modification corrélative des PS par augmentation de la positivité de la zone traitée.

II - INFLUENCE DES BLESSURES

1 - METHODOLOGIE

Différents types de blessures ont été réalisés soit au niveau du membre, soit sur toute autre partie du corps :

- incisions de peau ou d'épiderme seul : dans ce dernier cas, sont utilisés des Pleurodèles dont les membres ont été irradiés ;

- ablation d'un lambeau ou d'un manchon de peau d'étendue variée en divers endroits du membre ;

- amputation du membre par section dans la région distale de l'avant-bras.

Les mesures sont effectuées immédiatement après l'opération et quelques heures plus tard.

2 - RESULTATS

a - Blessures provoquées au niveau du membre

Les incisions de peau, les ablations de peau sur une zone plus ou moins étendue ou les amputations de membres modifient dans tous les cas le gradient de potentiel de la surface du membre (Fig. 23 à 26). Cette modification se traduit toujours, au niveau de la zone blessée, par l'apparition d'une valeur de potentiel positive ; cette positivité est encore décelable sur les trois à quatre mm de peau qui bordent la blessure. Les valeurs de potentiel obtenues

immédiatement après l'opération se situent généralement entre 15 et 20 mV ; elles atteignent souvent 35 à 40 mV après quelques heures.

Les incisions ou les ablations d'épiderme seul entraînent les mêmes effets c'est-à-dire l'apparition d'une positivité au niveau de la zone blessée. Les valeurs mesurées immédiatement après l'opération sont plus élevées (+ 40 mV) que celles obtenues après l'ablation de la peau complète et restent stables au cours du temps.

Les incisions de peau pratiquées au voisinage de l'électrode de référence provoquent l'apparition de gradients de potentiel plus ou moins complexes (Fig. 23, a, b, c). Des incisions pratiquées à un autre endroit du membre (Fig. 24) entraînent une

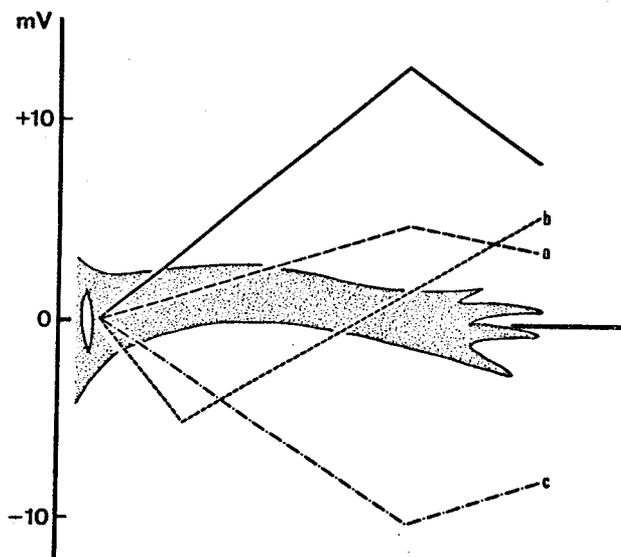


Fig.23

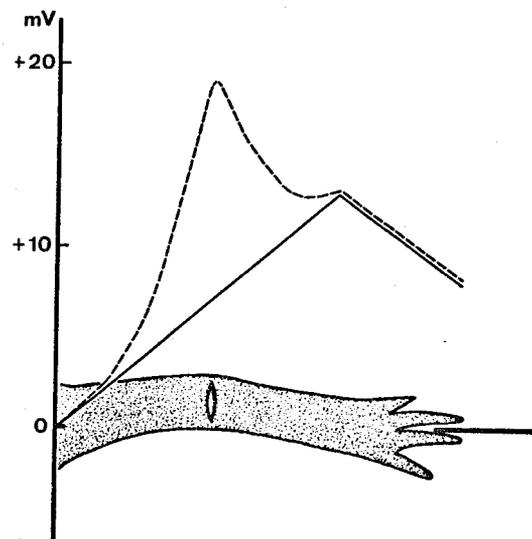


Fig.24

Figure 23 : Gradients de potentiel obtenus après incision de la peau près de l'électrode de référence :
—: avant l'incision
---: après l'incision.

Figure 24 : Gradient de potentiel obtenu après incision de la peau dans la région moyenne du membre :
— : avant l'incision
--- : après l'incision.

déformation du gradient de potentiel par apparition d'un pic positif au niveau correspondant à la blessure. Un phénomène similaire se produit lorsqu'une ablation de peau est pratiquée soit sous forme de manchon, soit sous forme de lambeau longitudinal (Fig. 25) ; le pic positif se prolonge alors en un plateau isopotential correspondant à l'étendue de la blessure. Par contre, le gradient de potentiel des moignons obtenus après amputation présente un profil régulier dont la valeur est souvent égale ou même supérieure à celle du membre complet (Fig. 26).

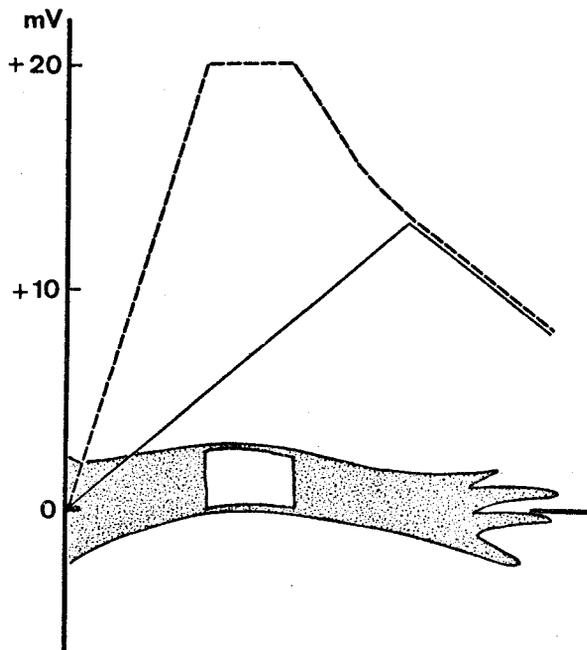


Fig.25

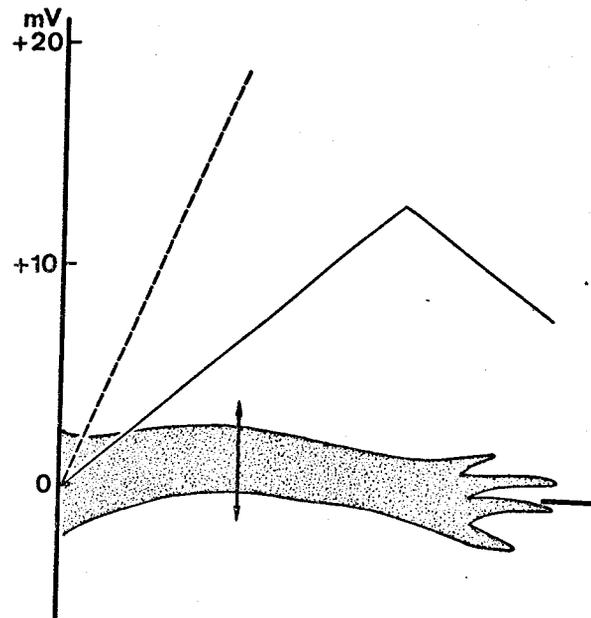


Fig.26

Figure 25 : Gradient de potentiel obtenu après ablation d'un lambeau de peau sur la face dorsale du membre.

— : avant l'ablation

--- : après l'ablation

Figure 26 : Gradient de potentiel obtenu après section du membre.

— : avant section

--- : après section.

b - Ablation de peau dans une zone éloignée du membre

Une ablation de peau pratiquée sur le dos de l'animal n'affecte pas le gradient de potentiel du membre, que l'électrode soit posée sur la peau intacte (Fig. 27, point A) ou sur la plaie

(Fig. 27, point B). Dans ce dernier cas, la valeur du potentiel de référence étant modifiée, la courbe se trouve décalée d'autant (Fig. 27, b). Ce décalage représente la négativité de la peau de la région proximale du membre par rapport à la nouvelle référence (ou la positivité de la zone de référence par rapport à la peau).

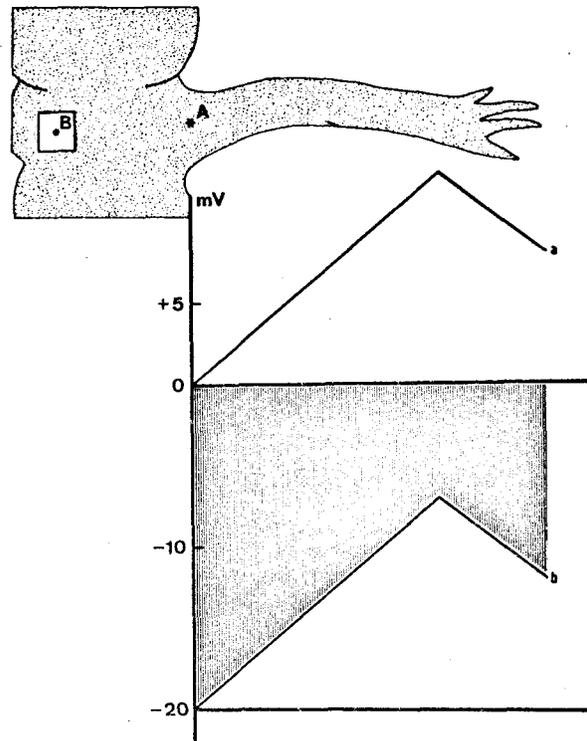


Figure 27 : Gradient de potentiel positif d'amplitude moyenne obtenu après déplacement de l'électrode de référence de la région A (zone de peau intacte) à la région B (zone où la peau est excisée). Les profils a et b sont identiques : la zone en grisé représente la valeur du potentiel transépithélial.

Il est important de souligner que la valeur du gradient de potentiel n'est jamais supérieure à celle de la ddp existant entre la peau et la référence musculaire. Ainsi lorsque cette ddp est de valeur élevée, le gradient de potentiel est toujours à pente positive et de forte amplitude (Fig. 27) ; par contre, lorsque la ddp entre la référence musculaire et la peau de la partie proximale du membre est faible, le gradient de potentiel longitudinal est également de faible amplitude (Fig. 28) ;

lorsque le gradient possède une valeur importante, il présente une pente négative (Fig. 29).

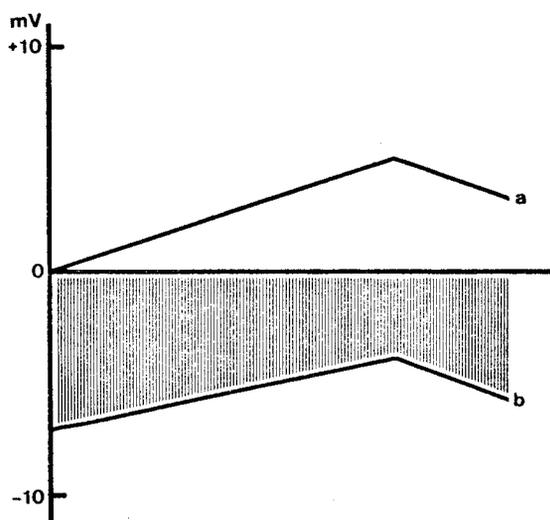


Fig.28

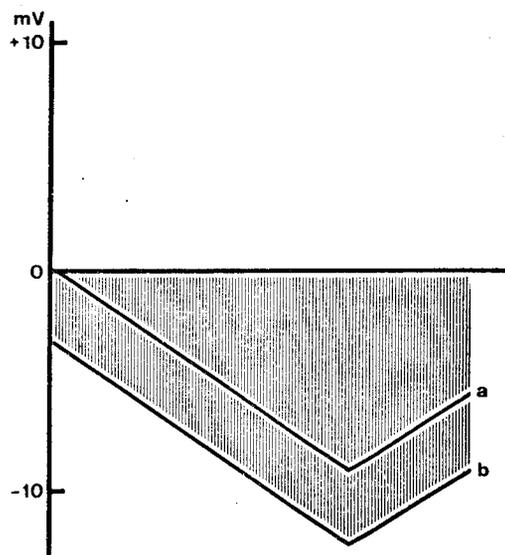


Fig.29

Figure 28 : Influence du déplacement de l'électrode de référence de A en B (voir Fig. 27) lorsque le gradient de potentiel est positif mais de faible amplitude.

Figure 29 : Influence du déplacement de l'électrode de référence de A en B (voir Fig. 27) lorsque le gradient de potentiel est négatif.

3 - DISCUSSION

Ces résultats montrent qu'une positivité apparaît chaque fois que l'intégrité de la peau ou même de l'épiderme seul est atteinte. Dans nos conditions d'enregistrement, cela signifie que chaque fois que l'une des électrodes vient en contact avec le derme ou le tissu musculaire, c'est-à-dire avec les liquides internes extracellulaires de l'animal, elle enregistre un potentiel positif par rapport à l'autre électrode posée sur la face externe de la peau intacte (Fig. 30). Cette ddp ne peut que refléter la ddp

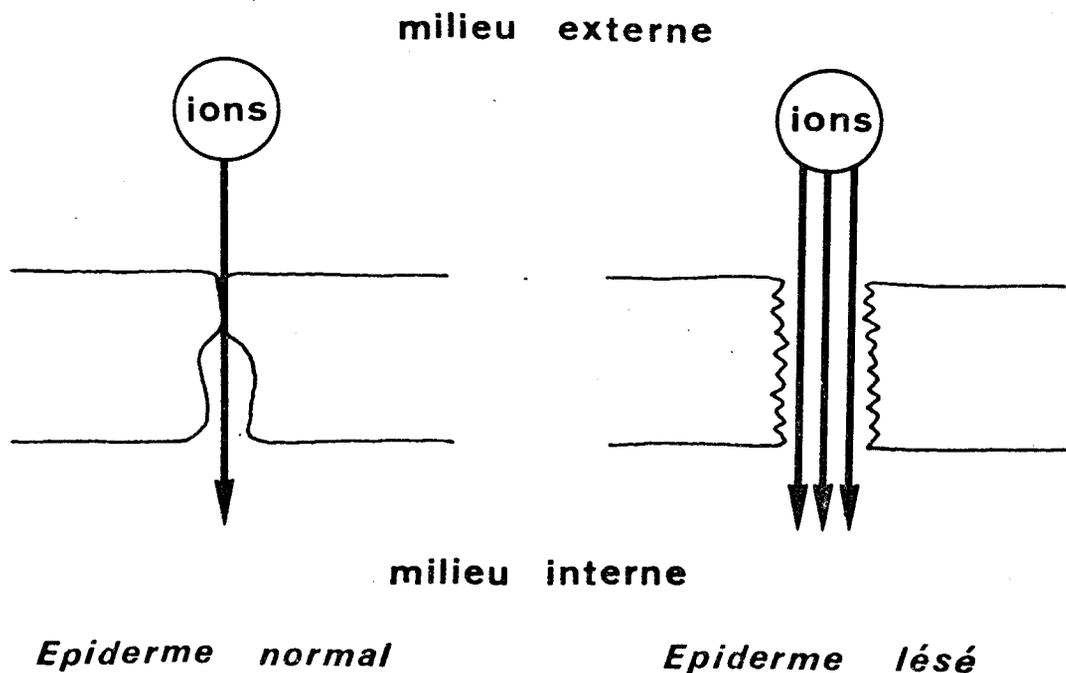


Figure 30 : Schéma résumant l'influence des blessures sur la perméabilité passive du tégument. Seule la première couche de cellules vivantes a été représentée.

transépithéliale de la peau. Ce type d'enregistrement est d'ailleurs, dans son principe, similaire à celui employé par quelques auteurs pour mesurer *in vivo* les ddp transépithéliales de la peau de divers Amphibiens Anoures et Urodèles (BROWN, 1962 ; BENTLEY, 1975) par l'introduction d'une électrode sous la peau, une deuxième électrode faisant face à celle-ci sur la partie externe de la peau. Dans notre cas, le milieu interne est atteint par excision d'un lambeau de peau ; cette opération provoque inévitablement des lésions plus ou moins importantes des tissus sous-jacents créant des potentiels de lésion qui diminuent ainsi la valeur du potentiel enregistré à la surface du muscle. Ceci explique la différence existant entre les valeurs de potentiel des références musculaires lorsque la mesure est effectuée à quelques heures d'intervalle c'est-à-dire avant et après que les processus de cicatrisation aient été mis en jeu. Il est fort probable que de tels phénomènes n'interviennent pas ou très peu lors de l'ablation de l'épiderme seul puisque la positivité

obtenue dans ce cas est élevée et stable. Le fait que l'on retrouve le gradient de potentiel le long de la surface du membre lorsque l'électrode de référence est placée sur une plaie située loin du membre implique donc qu'il doit exister une régionalisation des ddp transépithéliales mesurées le long de l'axe proximo-distal : au niveau proximal, la ddp transépithéliale serait forte alors qu'au niveau distal elle serait plus faible (Fig. 27, zone hachurée).

CONCLUSION

L'application de solutions hyperosmotiques sur l'ensemble du membre ou la création de lésions épidermiques intéressant la totalité du membre entraînent l'abolition des PS. Lorsque l'action de ces facteurs est limitée à une petite région du membre, la zone traitée devient positive par rapport à la zone non traitée. Ces effets traduisent une diminution de la ddp transépithéliale consécutive à une augmentation de la perméabilité passive extracellulaire de l'épiderme. Ces résultats permettent d'interpréter les PS comme le reflet d'une régionalisation des ddp transépithéliales le long de l'axe proximo-distal.

CHAPITRE IV

RELATIONS ENTRE LES POTENTIELS DE SURFACE

ET LES POTENTIELS TRANSEPITHELIAUX

Les expériences d'ablation de peau suggèrent que les PS auraient pour origine une régionalisation des ddp transépithéliales le long de l'axe proximo-distal du membre. L'extrémité distale, positive par rapport à l'épaule, correspondrait à une région où la ddp transépithéliale serait plus faible que celle de la région ~~distale~~ proximale.

La démonstration du bien-fondé de cette hypothèse peut être envisagée :

1 - par la modification de l'amplitude des PS *in situ* obtenue en changeant expérimentalement la valeur des potentiels transépithéliaux (soit au niveau proximal, soit au niveau distal) à l'aide de substances que l'on sait agir sur ce paramètre ;

2 - par la mesure à la fois *in vivo* et *in vitro* de la valeur de ces potentiels transépithéliaux aux niveaux proximal et distal.

Nous analyserons successivement les résultats de ces différentes expérimentations.

I - MODIFICATIONS EXPERIMENTALES DE L'AMPLITUDE DES POTENTIELS DE SURFACE IN VIVO

Les modifications des ddp transépithéliales ont été envisagées compte-tenu du fonctionnement normal du tégument des Amphibiens. La Figure 31 résume les connaissances actuelles en ce domaine. Ces données ont été obtenues surtout chez les Anoures mais aussi chez quelques Urodèles (BENTLEY et coll., 1964).

Les ions Na^+ présents dans le milieu externe pénètrent dans le cytoplasme de la première couche de cellules vivantes en traversant passivement la couche de cellules kératinisées et la membrane externe des cellules sous-jacentes (première couche de cellules vivantes) (USSING et coll., 1974). Ces ions diffusent alors dans toutes les cellules épidermiques (MOREL et LEBLANC, 1975 ; NAGEL, 1976) par l'intermédiaire de jonctions de faible résistance, probablement de type "gap" (FARQHAR et PALADE, 1965) conférant à l'épiderme le rôle d'un véritable syncytium physiologique (NAGEL, 1977). Les ions Na^+ sont ensuite expulsés dans le milieu extracellulaire par la pompe Na/K (USSING et ZERHAN, 1951) dont le

fonctionnement qui requiert de l'énergie est dépendant du métabolisme. Ce courant actif de cations enrichit sélectivement le milieu interne

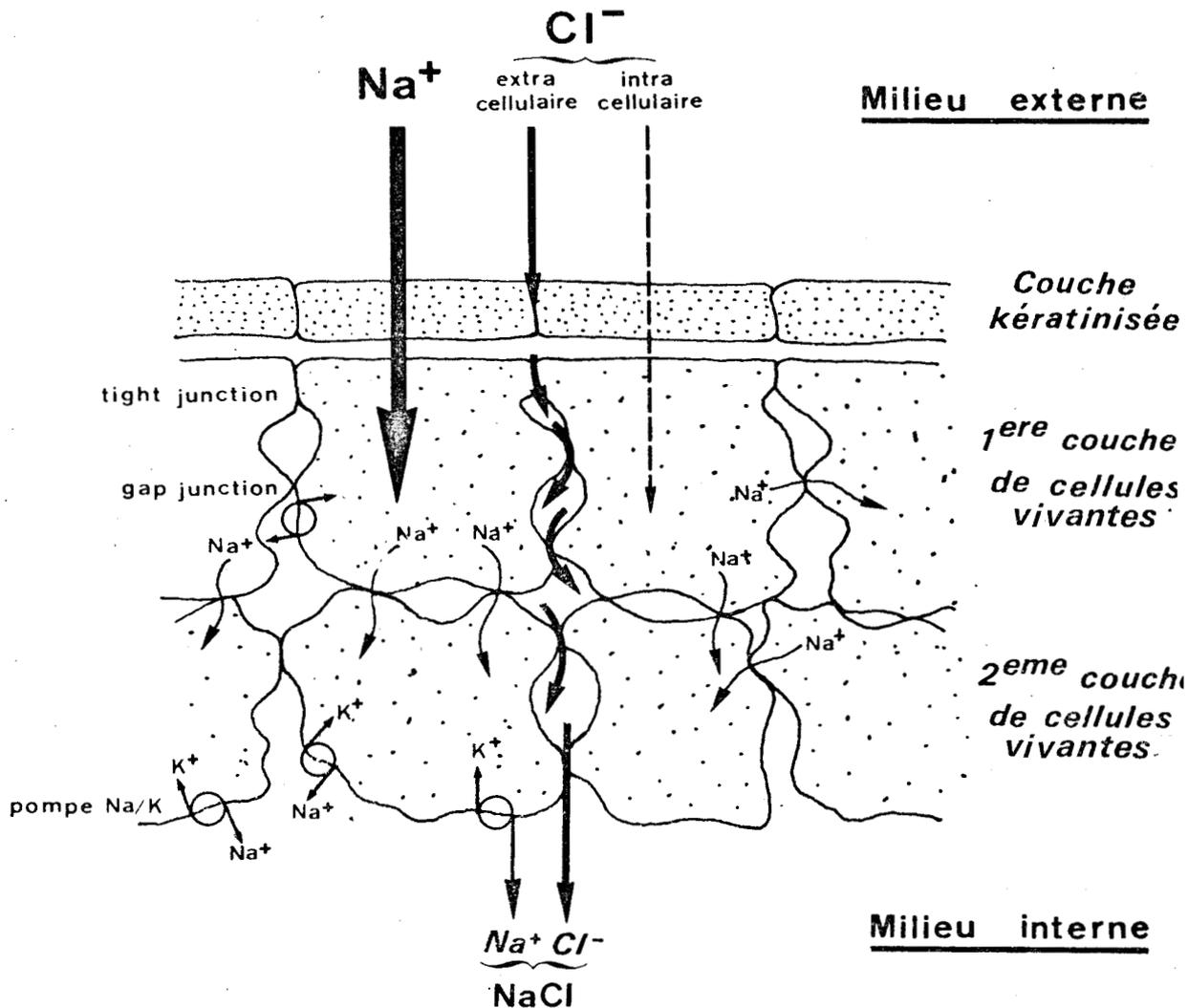


Figure 31 : Schéma des principaux transports ioniques du milieu externe vers le milieu interne de la peau de Batracien. Explications données dans le texte (p.47 à 49).

en ions chargés positivement et crée ainsi une ddp entre les milieux interne et externe. Toutefois, l'électroneutralité de ce milieu interne est maintenue grâce à l'établissement d'un courant d'anions

(essentiellement les ions Cl^-) du milieu externe vers le milieu interne. Il a été montré qu'une toute petite partie de ce courant d'ions Cl^- est actif (KRISTENSEN, 1972 ; LOTE, 1976) mais que la majorité de ces ions se distribue passivement selon le gradient électrochimique créé par le courant sodique (KOEFOED-JOHNSON et coll., 1952). Les chemins de migrations passives des ions Cl^- sont à la fois trans et extracellulaires (USSING et coll., 1974). Les "tight-junctions" présentes seulement au niveau des cellules situées sous la couche kératinisée seraient un passage extracellulaire privilégié (USSING et WINDHAGER, 1964 ; KRISTENSEN, 1972 ; MANDEL et CURRAN, 1972 a, b).

Ce fonctionnement complexe de la peau d'Amphibiens a conduit à l'établissement de schémas électriques équivalents. La finalité de tels schémas n'est pas seulement de traduire en termes purement physiques le comportement physiologique d'une structure vivante mais aussi de faire progresser les connaissances sur le fonctionnement de cette structure par la vérification expérimentale des considérations théoriques que le schéma permet d'élaborer. Divers schémas ont été proposés pour la peau d'Amphibien ; le plus récent rend compte de toutes les caractéristiques connues de cet épithélium (SCHULTZ et coll., 1977). En ce qui nous concerne, nous retiendrons le schéma simplifié de USSING et ZERHAN (1951), la somme d'information qu'il comporte étant suffisante pour l'interprétation de nos résultats (Fig. 32). Dans ce schéma, E représente la valeur de la ddp créée par le flux sodique, R_t la résistance associée au transport actif d'ions Na^+ et R_s symbolise la résistance des shunts électriques (matérialisés essentiellement par les "tight-junctions"). La valeur U représente la ddp transépithéliale mesurable entre les milieux interne et externe ; elle correspond à la valeur E modulée par la présence de la résistance R_s placé en parallèle.

Ce schéma permet de prévoir :

- 1 - qu'une diminution de la valeur de la ddp transépithéliale U sera obtenue soit en diminuant E, soit en diminuant R_s ;
- 2 - qu'une augmentation de la valeur de la ddp transépithéliale U sera obtenue soit en augmentant E, soit en augmentant R_s .

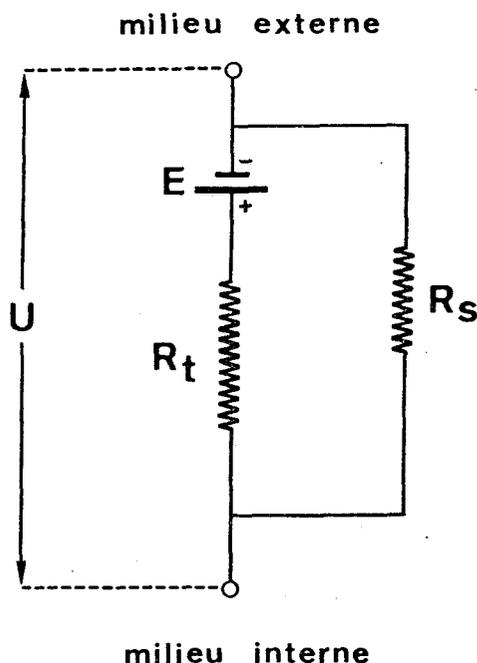


Figure 32 : Equivalent électrique de la peau de Batracien.
 U = ddp transépithéliale.
 E = ddp créée par le transport actif d'ions Na^+ .
 R_t = résistance associée au transport actif.
 R_s = résistance des shunts (d'après USSING et ZERHAN, 1951).

En postulant que la peau de Pleurodèle obéit à ces lois, nous nous proposons de modifier la valeur de la ddp transépithéliale et de suivre les variations éventuelles de l'amplitude des PS.

1 - METHODOLOGIE

Les expérimentations ayant lieu *in vivo*, seules les modifications du milieu externe pouvaient être envisagées pour obtenir les variations souhaitées du potentiel transépithélial.

a - Diminution de la ddp transépithéliale U'

Elle a été obtenue en annulant E c'est-à-dire en supprimant le flux sodique entrant, par substitution des ions Na^+ du milieu externe par des ions choline non pénétrants. L'annulation de E peut être également obtenue en diminuant R_s c'est-à-dire en augmentant le flux passif d'ions par l'ouverture des "tight-junctions"; nous rappellerons que l'augmentation de l'osmolarité du milieu externe provoque un tel phénomène (voir chapitre 3).

b - Augmentation de la ddp transépithéliale U'

Elle a été obtenue en augmentant R_s c'est-à-dire en

diminuant le flux passif d'ions ; pour cela, les ions Cl^- du milieu externe sont remplacés par des ions propionate non pénétrants.

Ces différents milieux ont été appliqués soit sur le membre complet soit sur une partie de celui-ci (région proximale ou distale).

2 - RESULTATS

a - Milieu externe dépourvu d'ions Na^+ appliqué sur tout le membre

La suppression des ions Na^+ du milieu externe provoque une très forte diminution du gradient de PS (Fig. 33). Cette diminution qui peut aller jusqu'à l'abolition totale des PS est obtenue au bout de vingt à trente minutes. La réversibilité est complète et rapide (quelques minutes).

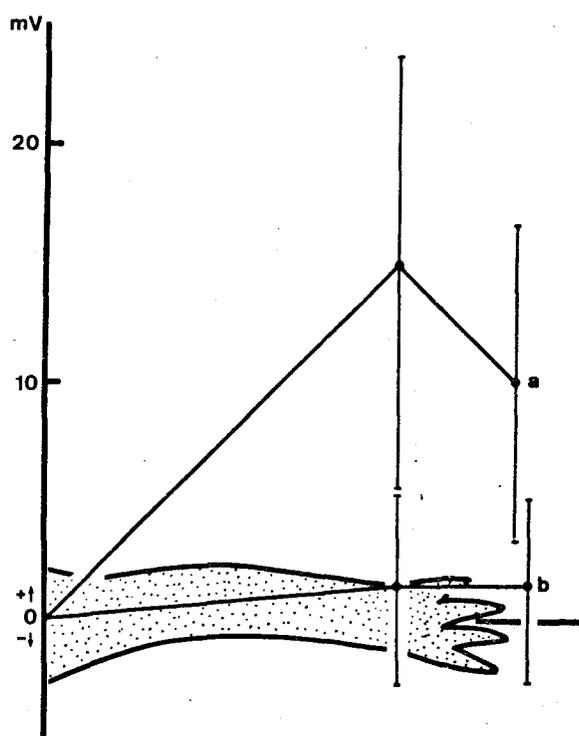


Figure 33 : Influence de la suppression des ions Na^+ du milieu externe sur la valeur des PS du membre de Pleurodèle.
a, avant la suppression
b, après.

b - Milieu externe dépourvu d'ions Na^+ appliqué sur une partie du membre

Appliqués sur la région proximale du membre, les

milieux sans Na^+ provoquent généralement une légère inversion du gradient de potentiel (Fig. 34 A, b). Appliqués sur la région distale, ces mêmes milieux augmentent légèrement l'amplitude des PS (Fig. 34 B, b).

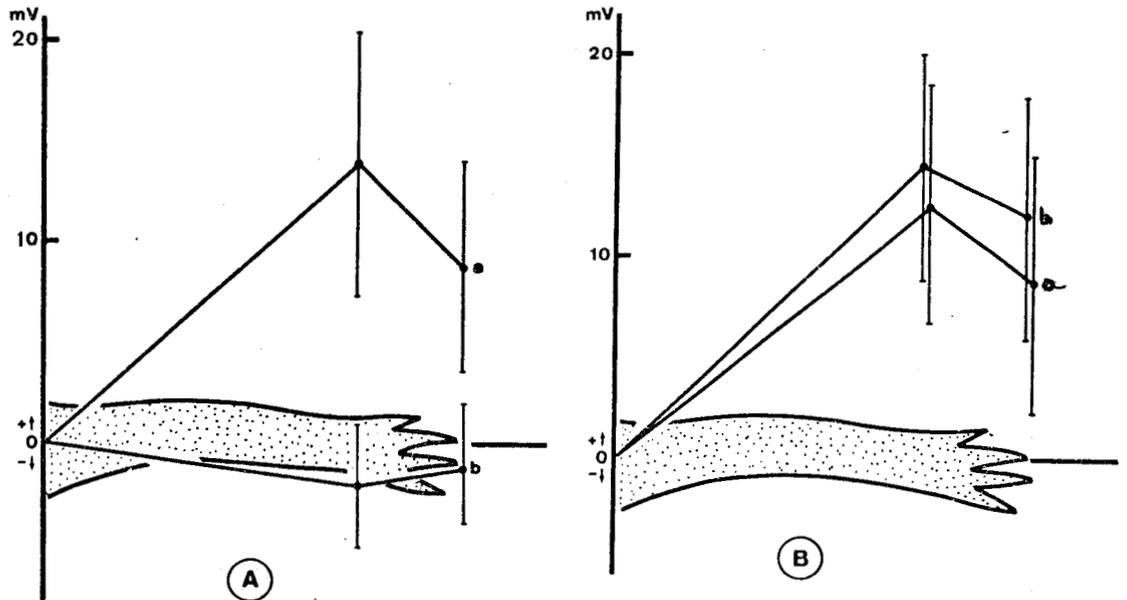


Figure 34 : Modification des PS du membre de Pleurodèle sous l'influence d'un milieu externe dépourvu d'ions Na^+ appliqué soit sur la région proximale(A) soit sur la région distale (B). a, PS initial ; b, PS modifié.

c - Milieu externe dépourvu d'ions Cl^- appliqué sur tout le membre

La suppression des ions Cl^- du milieu externe se traduit en moyenne par une diminution de la positivité distale du membre lorsque le gradient est de type positif (Fig. 35, b) et par une augmentation de la négativité distale lorsque le gradient est de type négatif (Fig. 35, b'). Cependant, dans certains cas, le gradient n'est pas modifié ou même augmente légèrement d'amplitude. Les grands écarts-types rendent compte de ces diverses variations.

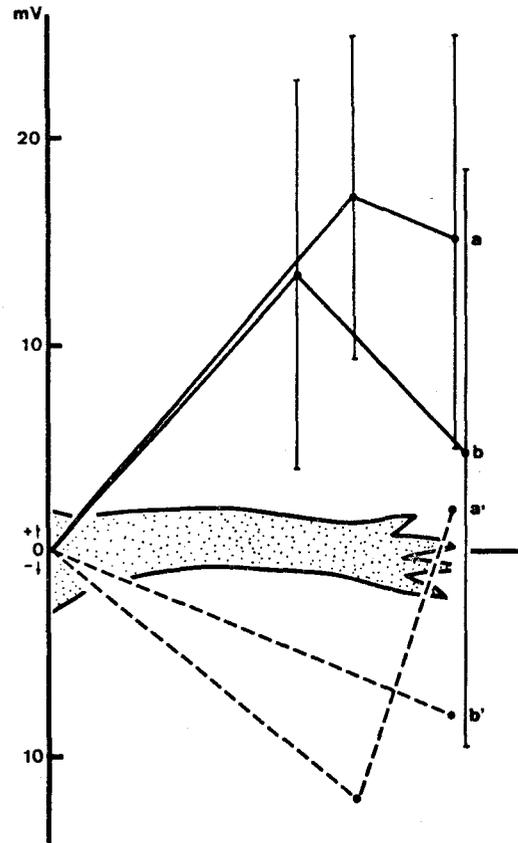


Figure 35 : Influence de la suppression des ions Cl^- du milieu externe sur la valeur des PS du membre de Pleurodèle.
 a et b, gradients positifs
 a' et b', gradients négatifs
 a et a', avant la suppression
 b et b', après.

d - Milieu externe dépourvu d'ions Cl^- appliqué sur une partie du membre

Les résultats obtenus ont été consignés dans le tableau 7. Les milieux sans Cl^- appliqués sur la région proximale du membre provoque une augmentation importante de l'amplitude du gradient de PS (+ 217 %). Par contre, si ces mêmes milieux sont appliqués sur

RÉGION DU MEMBRE	: AVANT ACTION : DES MILIEUX : SANS Cl^-	: APRÈS ACTION : DES MILIEUX : SANS Cl^-	: VARIATIONS : OBSERVÉES	: TAUX : DE : VARIATIONS
PROXIMALE...	: + 15,3 ± 4,8 mV	: +48,6 ± 13,0 mV	: 33,3 ± 14,6 mV	: 217 %
DISTALE.....	: +20,7 ± 8,2 mV	: -28,3 ± 11,7 mV	: 49,0 ± 14,1 mV	: 236 %

Tableau 7 : Modifications de l'amplitude et de la polarité des PS du membre de Pleurodèle sous l'influence d'un milieu externe dépourvus d'ions Cl^- appliqué soit sur la région proximale soit sur la région distale du membre.

l'extrémité distale, le gradient de potentiel s'inverse, la région distale du membre devenant très négative par rapport à la région proximale. La variation de potentiel observée dans ce dernier cas est significativement plus élevée (236 %) que celle constatée précédemment.

3 - DISCUSSION

Les résultats démontrent qu'une modification de la valeur des potentiels transépithéliaux entraîne une variation corrélative de l'amplitude des PS. L'interprétation de ces résultats est relativement aisée si l'on suppose que les PS représentent tout ou partie de la différence existant entre les valeurs de potentiels transépithéliaux proximal et distal. En admettant que A (Fig. 36 a) représente la valeur de la ddp transépithéliale de la région proximale et B celle de la région distale, on peut concevoir que les PS correspondent à la différence A-B. Dans ces conditions, toute altération de A et /ou de B sera suivie ou non d'une modification des PS si la variation imposée affecte de manière respectivement inégale ou identique A et B.

La forte diminution de A et B aura pour conséquence de réduire ou d'annuler leur différence et par conséquent d'annuler les PS (Fig. 36, b). La suppression des ions Na^+ (bloquant le courant actif d'ions) ou l'augmentation de la pression osmotique du milieu externe (augmentant la perméabilité passive) conduisent à un tel résultat. Si la diminution n'intéresse que A ou B (cas des milieux sans Na^+ appliqués localement) les résultats obtenus seront opposés : quand A diminue seul (A'), le gradient de PS s'inverse (Fig. 36, c) ; quand B diminue seul (B'), le gradient de PS augmente (Fig. 36, d). Par contre, l'augmentation simultanée de A et B aura des conséquences multiples selon que la variation de A (ΔA) sera égale ou non à la variation de B (ΔB). Si $\Delta B = \Delta A$, les PS seront inchangés (Fig. 36, e, trait continu), si $\Delta B < \Delta A$, les PS augmenteront légèrement (Fig. 36, e, trait pointillé) si $\Delta B > \Delta A$, les PS diminueront (Fig. 36, e, trait discontinu). Ces différents cas de figures sont observés lorsque les ddp transépithéliales des régions proximale et distale sont augmentées simultanément par la suppression des ions Cl^- du milieu externe. Une fréquence plus élevée pour le troisième cas de

figure révèle une réactivité plus grande de la région distale à l'absence d'ions Cl^- .

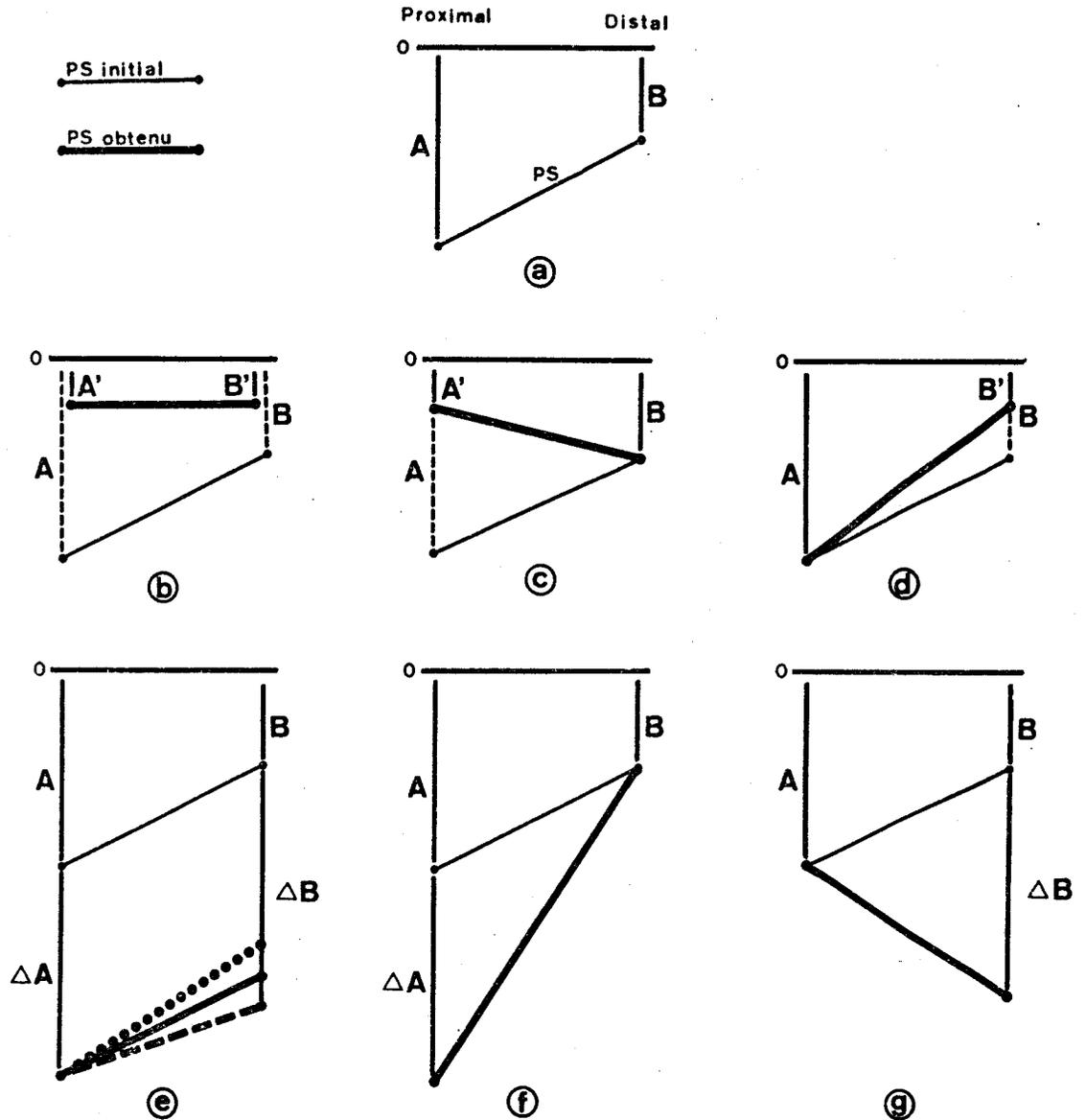


Figure 36 : Schémas résumant les variations de PS obtenues après modifications des potentiels transépithéiliaux.
 A = ddp transépithéiliaire de la région proximale
 B = ddp transépithéiliaire de la région distale
 A', B' = ddp transépithéiliaires proximale et distale obtenues après diminution de leur valeur.
 $\Delta A, \Delta B$ correspondent à l'augmentation des ddp transépithéiliaires des régions proximale et distale.

Suite de la légende (Fig. 36).

- a : PS dans les conditions normales
- b : PS obtenus après suppression des ions Na^+ du milieu externe
- c : PS obtenus après application sur la région proximale d'un milieu externe sans Na
- d : PS obtenus après application sur la région distale d'un milieu externe sans Na
- e : PS obtenus après suppression des ions Cl^- du milieu externe
- f : PS obtenus après application sur la région proximale d'un milieu externe dépourvu de Cl
- g : PS obtenus après application sur la région distale d'un milieu externe dépourvu de Cl .

Enfin, l'augmentation préférentielle de A ou B se traduira par des modifications très importantes des PS. Si $\Delta A \gg \Delta B$ (Fig. 36, f), les PS augmenteront considérablement d'amplitude. L'application d'un milieu externe sans Cl^- localisée au niveau proximal provoque un tel résultat puisque la valeur des PS augmente de 217 %. Si $\Delta B \gg \Delta A$ (Fig. 36, g), les PS conserveront une grande amplitude mais le gradient sera complètement inversé. C'est ce que l'on constate lorsque les milieux sans Cl^- sont appliqués localement sur la région distale. La variation de potentiel observée est très importante et même plus forte que celle obtenue au niveau proximal, ce qui confirme la plus grande sensibilité de cette région à l'absence d'ions Cl^- . Puisque l'on sait que ces ions se distribuent passivement de part et d'autre de la peau, on peut supposer que la plus grande sensibilité de la région distale à l'absence de Cl^- traduit une perméabilité aux migrations ioniques passives plus élevée.

II - MESURE DES POTENTIELS TRANSEPITHÉLIAUX IN VIVO

Les variations concomitantes des potentiels trans-épithéiliaux et des PS obtenus dans les expérimentations précédentes ont été interprétés en supposant qu'un lien très étroit unit ces phénomènes bioélectriques ; toutefois, l'approche expérimentale utilisée ne permettait pas de quantifier les rapports précis existant entre ces deux paramètres. Les PS représentent-ils tout ou partie de la différence de valeur existant entre les potentiels transépithéiliaux proximal et distal ? Dans le but d'élucider ce point, nous nous

proposons de mesurer simultanément *in vivo* les PS et les potentiels transépithéiliaux des niveaux proximal et distal du membre de Pleurodèle.

1 - METHODOLOGIE

La mesure des ddp transépithéiliales proximale et distale est effectuée *in vivo* en enfonçant sous la peau une électrode dite interne (Fig. 37, 1 et 4) par une incision pratiquée dans le tégument aux deux extrémités du membre. Chaque électrode est constituée d'un fin tube de verre rempli d'une solution physiologique gélifiée par de l'agar. Ces électrodes parfaitement isoélectriques sont enfoncées sous la peau suffisamment loin de la plaie

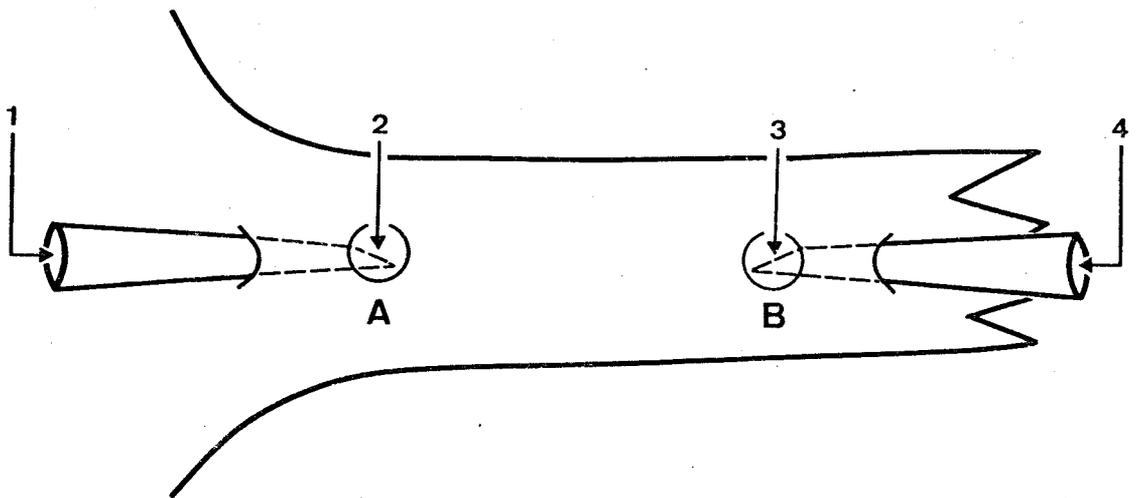


Figure 37 : Technique d'enregistrement simultané *in vivo* des potentiels transépithéiliaux et des PS des régions proximale (A) et distale (B) d'un membre d'Amphibien.

1 et 4 : électrodes internes
2 et 3 : électrodes externes.

pour éviter tout artefact de mesure. Les électrodes externes (Fig. 37, 2 et 3) sont posées sur la face muqueuse du tégument en regard des électrodes internes. Cette technique permet de mesurer simultanément le potentiel transépithélial de la région proximale (Fig. 37, point A) du membre entre les électrodes 1 et 2, le potentiel transépithélial de la région distale (Fig. 37, point B) entre les électrodes 3 et 4 et la ddp de surface existant entre ces mêmes régions grâce aux électrodes 2 et 3.

Ces mesures ont d'abord été effectuées dans les conditions normales puis en modifiant soit au niveau proximal soit au niveau distal le milieu externe par des solutions dont les ions Cl^- ont été remplacés par des ions propionate.

2 - RESULTATS

a - Mesure simultanée des potentiels transépithéliaux et des potentiels de surface dans les conditions normales

α Chez les Pleurodèles adultes

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 8. Dans le cas d'un gradient positif (cas n° 1 à 11), la région proximale (A) du membre possède une ddp transépithéliale supérieure à celle de la région distale (B) ; par contre, dans le cas d'un gradient de PS négatif (cas n° 12 et 13), c'est la région distale qui possède la ddp transépithéliale la plus élevée. Dans les deux cas, la valeur du gradient de PS est exactement égale à la différence des valeurs des ddp transépithéliales des régions A et B (colonne 4 et 5).

Les milieux internes ont été considérés comme iso-électriques (colonne 6), les ddp enregistrées entre les électrodes 1 et 4 étant toujours inférieures ou au plus égales à 0,5 mV.

β Chez l'Axolotl

Les mesures révèlent l'absence presque totale (0 à + 2 mV) de potentiels transépithéliaux quelle que soit la région du membre analysée.

N°	DDP PROXIMALE (A)	DDP DISTALE (B)	DIFFERENCE CALCULÉE	PS (DIFFÉRENCE MESURÉE)	DDP INTERNE
1	- 14	- 6	8	+ 8	0
2	- 30	- 7	23	+ 23	
3	- 33	- 21	12	+ 12	
4	- 11	- 6	5	+ 5	
5	- 20	- 10	10	+ 10	
6	- 8	- 3	5	+ 5	
7	- 20	- 5	15	+ 15	
8	- 17	- 8	9	+ 9	
9	- 25	- 9	16	+ 16	
10	- 15	- 6	9	+ 9	
11	- 20	- 6	14	+ 14	
12	- 5	- 15	10	- 10	
13	- 8	- 19	11	- 11	

Tableau 8 : Mesure simultanée *in vivo* des ddp transépithéliales proximale et distale et des PS.

b - Mesure simultanée des potentiels transépithéliaux et des potentiels de surface en l'absence d'ions Cl^- dans le milieu externe

Après dix minutes d'action d'un milieu externe dépourvu d'ions Cl^- , les valeurs du potentiel transépithélial de la région traitée (proximale ou distale) est considérablement augmentée (Tableau 9, colonne 4 et 5). Cette variation de potentiel est accompagnée d'une variation identique de la valeur des PS (colonnes 6 et 9).



CAS	DDP TRANSÉPITHÉLIALE EN MILIEU NORMAL		DDP TRANSÉPITHÉLIALE EN MILIEU SANS IONS Cl^-		VARIATIONS DES DDP TRANSÉPITHÉLIALES	PS EN MILIEU NORMAL	PS EN MILIEU SANS Cl^-	VARIATIONS DE PS
	RÉGION		RÉGION					
	PROXIMALE	DISTALE	PROXIMALE	DISTALE				
1	- 33	- 13	- 63		30	+ 20	+ 50	30
2	- 21	- 5	- 50		29	+ 16	+ 45	29
3	- 14	- 6	- 34		20	+ 8	+ 28	20
4	- 34	- 20	- 63		29	+ 14	+ 43	29
5	- 3	- 3	- 24		21	0	+ 21	21
6	- 8	- 33	- 43		35	- 25	+ 10	35
7	- 18	- 4		- 40	36	+ 14	- 22	36
8	- 9	- 6		- 26	20	+ 3	- 17	20
9	- 20	- 7		- 52	45	+ 13	- 32	45
10	- 34	- 54		- 72	18	- 20	- 38	18

Tableau 9 : Variations simultanées des ddp transépithéliales et des PS sous l'influence d'un milieu externe dépourvu d'ions Cl^- . Ce milieu est appliqué localement soit au niveau proximal (n° 1 à 6), soit au niveau distal (n° 7 à 10). Les valeurs sont exprimées en mV.

3 - DISCUSSION

La mesure simultanée des potentiels transépithéliaux et des PS dans les conditions normales ou sous l'influence de milieux externes dépourvus d'ions Cl^- démontre que les PS correspondent à la différence de valeur existant entre les potentiels transépithéliaux de deux régions distinctes du tégument recouvrant le membre de Pleurodèle. En outre, la mesure *in vivo* des potentiels transépithéliaux permet d'affirmer que l'absence de PS chez l'*Axolotl* correspond à une absence de potentiels transépithéliaux et non à une valeur uniforme de ces potentiels le long de l'axe proximo-distal du membre.

III - MESURE DES POTENTIELS TRANSEPITHÉLIAUX IN VITRO

Lors de l'étude du support tissulaire des PS, nous avons précisé que les tentatives de mesure de ces potentiels sur des lambeaux de peau isolés avaient toujours donné des résultats décevants. Nous avons alors incriminé la petite taille des lambeaux

source d'artefacts de mesure (lésions, court-circuits, etc...). Connaissant l'origine des PS, il convenait alors de reprendre cette étude en mesurant *in vitro* à l'aide d'une technique appropriée les PS et les ddp transépithéliales des régions extrêmes d'un lambeau isolé.

1 - METHODOLOGIE

L'étude des ddp transépithéliales de lambeaux de peau isolés a été classiquement réalisée à l'aide de la technique de USSING et ZERAHN (1951). Cette technique a d'abord été adaptée à l'étude des ddp transépithéliales d'un lambeau de peau dont la surface découverte ($1,8 \text{ mm}^2$) est comparable à celle de la peau située sous les électrodes lors des mesures de potentiel de surface. Pour éviter les lésions périphériques qui constituent très souvent une source d'erreur non négligeable dans la mesure des ddp transépithéliales, l'isolement électrique et l'étanchéité entre les compartiments interne et externe sont assurés par de la vaseline et un serrage modéré des plaques de "plexiglas" l'une contre l'autre (Fig. 38). Ce dispositif s'étant révélé satisfaisant, un second

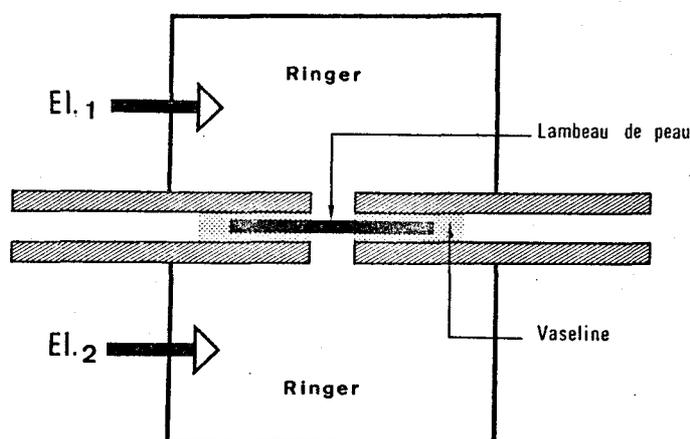


Figure 38 : Cuve d'expérimentation permettant l'étude de la ddp transépithéliale au niveau d'une seule région d'un lambeau de peau.
El₁ : électrode du compartiment externe.
El₂ : électrode du compartiment interne.

dispositif utilisant les mêmes principes a été mis au point (Fig. 39) pour permettre l'étude simultanée des ddp transépithéliales de deux zones de peau de même surface, séparées par une distance de 9 mm, et provenant d'un lambeau de peau prélevé sur la face dorsale, le long de l'axe proximodistal du membre antérieur de Pleurodèle.

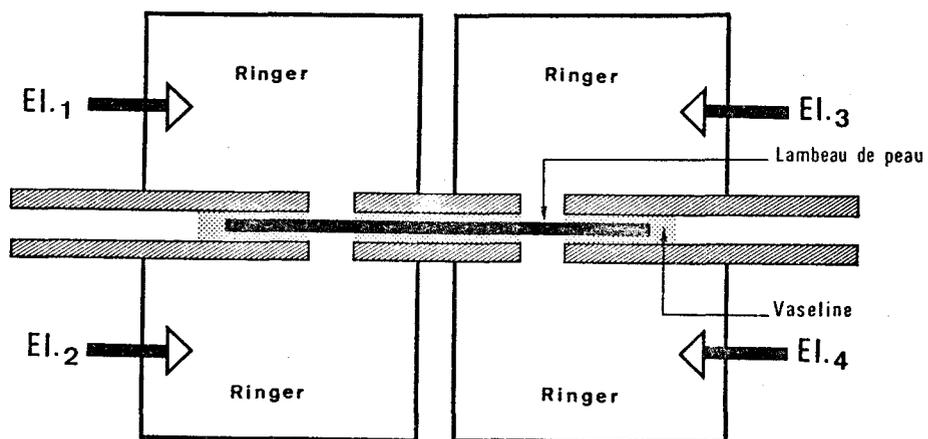


Figure 39 : Cuve d'expérimentation permettant l'étude de la ddp transépithéliale au niveau de deux régions identiques d'un lambeau de peau.

El₁ et El₃ : électrodes des compartiments externes

El₂ et El₄ : électrodes des compartiments internes.

Dans un cas comme dans l'autre, les faces découvertes externe et interne de la peau sont baignées par du liquide de Ringer aéré de façon continue.

2 - RESULTATS

Ces résultats ont fait l'objet d'une note (LASSALLE, 1977b).
a - Premier dispositif expérimental

Les valeurs de potentiel transépithélial obtenue sur des lambeaux de peau de Pleurodèle sont comprises entre -4 et -66 mV (moyenne -33 mV) le milieu externe étant négatif par rapport au

milieu interne. Les lambeaux de peau prélevés chez l'Axolotl ont toujours présentés des valeurs de potentiel très faible (0 à - 2 mV).

b - Second dispositif expérimental

Les valeurs obtenues avec le second dispositif expérimental sont reportées dans le Tableau 10 ; elles ont été enregistrées sur des lambeaux de peau semblables prélevés uniquement chez les Pleurodèles (17 animaux différents).

N°	DDP IN VITRO				IN VIVO POTENTIELS DE SURFACE
	TRANSÉPITHÉLIALES		ENTRE LES 2 COMPARTIMENTS		
	DISTALES	PROXIMALES	EXTERNES	INTERNES	
1	- 13	- 18	+ 5	0	+ 8
2	- 12	- 24	+ 12	0	+ 10
3	- 10	- 19	+ 7	0	+ 10
4	- 10	- 11	+ 1	0	0
5	- 4	- 9	+ 5	0	+ 4
6	- 33	- 43	+ 10	0	+ 10
7	- 36	- 42	+ 6	0	+ 8
8	- 50	- 62	+ 12	0	+ 10
9	- 32	- 48	+ 16	0	+ 18
10	- 57	- 80	+ 23	0	+ 25
11	- 39	- 68	+ 29	0	+ 28
12	- 62	- 68	+ 6	0	+ 8
13	- 14	- 22	+ 8	0	+ 8
14	- 25	- 38	+ 13	0	+ 16
15	- 5	- 20	+ 15	0	+ 14
16	- 9	- 25	+ 16	0	+ 14
17	- 21	- 33	+ 12	0	+ 10

Tableau 10 : Valeurs en millivolts des différences de potentiel enregistrées sur des lambeaux de peau de membre antérieur de Pleurodèle (17 individus). Colonnes 2 et 3 : le signe - indique la polarité de la face externe par rapport à la face interne. Colonnes 4 et 6 : le signe + indique la polarité de la région distale par rapport à la région proximale. Colonne 5 : les valeurs inférieures à 0,2 mV ont été considérées comme nulles.

On constate que :

1. Les valeurs de potentiel transépithélial sont comprises entre - 4 mV (région distale du lambeau n° 5) et - 80 mV (région proximale du lambeau n° 10);
2. Les régions distale et proximale d'un même lambeau de peau ne possèdent pas les mêmes valeurs de potentiel transépithélial, la région proximale présentant la valeur absolue la plus élevée (colonne 3) ;
3. Les compartiments correspondants à la face interne des régions proximale et distale du lambeau sont isoélectriques (colonne 5) ;
4. Les compartiments externes ne sont pas au même potentiel, le compartiment correspondant à la région distale du lambeau étant positif par rapport au compartiment de la région proximale (colonne 4) ;

Les potentiels de surface mesurés *in vivo* sur le membre avant l'excision du lambeau de peau ont été reportés également dans le tableau (colonne 6). L'extrémité distale est positive par rapport à la partie proximale.

3 - DISCUSSION

Les valeurs de potentiel transépithélial obtenues avec la première cuve d'expérimentation montrent qu'une toute petite surface de peau peut être analysée à condition d'éviter la création des shunts électriques qui se produisent habituellement dans ce type d'étude (HELMAN et coll., 1973). Récemment, SVELTO et coll. (1975) ont obtenu des résultats similaires sur de plus grandes surfaces de peau (20 à 209 mm²) en réduisant également les zones de compression à la périphérie des lambeaux de peau étudiés. Les potentiels transépithéliaux de la peau de Pleurodèle mesurés dans ces conditions présentent des valeurs semblables à celles obtenues chez divers Tritons par BENTLEY et HELLER (1964). Si l'absence de potentiels transépithéliaux chez les larves d'Amphibiens n'est pas un cas général, elle a cependant été signalé chez *Necturus* et chez *Ambystoma tigrinum* (BENTLEY et HELLER, 1964) et chez les larves d'Anoures (*Rana catesbiana*) par TAYLOR et BARKER (1965).

La seconde cuve d'expérimentation permet de montrer que la différence existant entre les valeurs de potentiel trans-épithélial des régions proximale et distale d'un lambeau de peau, différence que l'on peut calculer (colonne 3-colonne 2) s'exprime entièrement à la surface externe de la peau (colonne 4) puisque le milieu interne est isoélectrique vraisemblablement en raison de la libre circulation du liquide interstitiel dans le milieu extracellulaire.

Les valeurs de ces potentiels de surface mesurés ainsi *in vitro* (colonne 4) sont très semblables à celles des potentiels de surface mesurés préalablement *in situ* (colonne 6). L'analyse statistique (Fig. 40) montre d'ailleurs qu'il existe une très bonne corrélation ($r = 0,97$) entre ces deux séries de valeurs ; les légères variations observées ont probablement pour origine les difficultés de faire coïncider avec précision les zones de peau situées sous les électrodes lors des mesures effectuées *in situ* avec celles dont le potentiel transépithélial est mesuré *in vitro*.

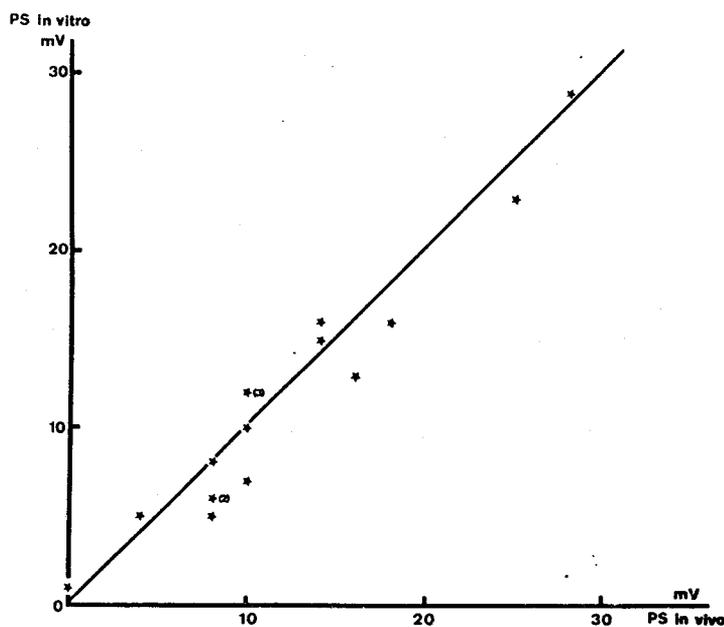


Figure 40 : Droite de régression des valeurs de PS obtenues *in vivo* puis *in vitro* après isolement du lambeau de peau ($r = 0,97$).

Ces derniers résultats ont été confirmés par FONTAS et MAMBRINI (1977b) sur des lambeaux de peau isolés de Grenouille placés dans une cuve expérimentale permettant la mesure simultanée des ddp transépithéliales de diverses régions du même lambeau.

CONCLUSION

L'ensemble de nos résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* démontrent clairement que les PS ont pour origine une régionalisation des ddp transépithéliales au niveau d'un même lambeau de peau. Cette hétérogénéité physiologique du tégument peut se traduire sous la forme d'un schéma électrique équivalent (Fig. 41) résumant les

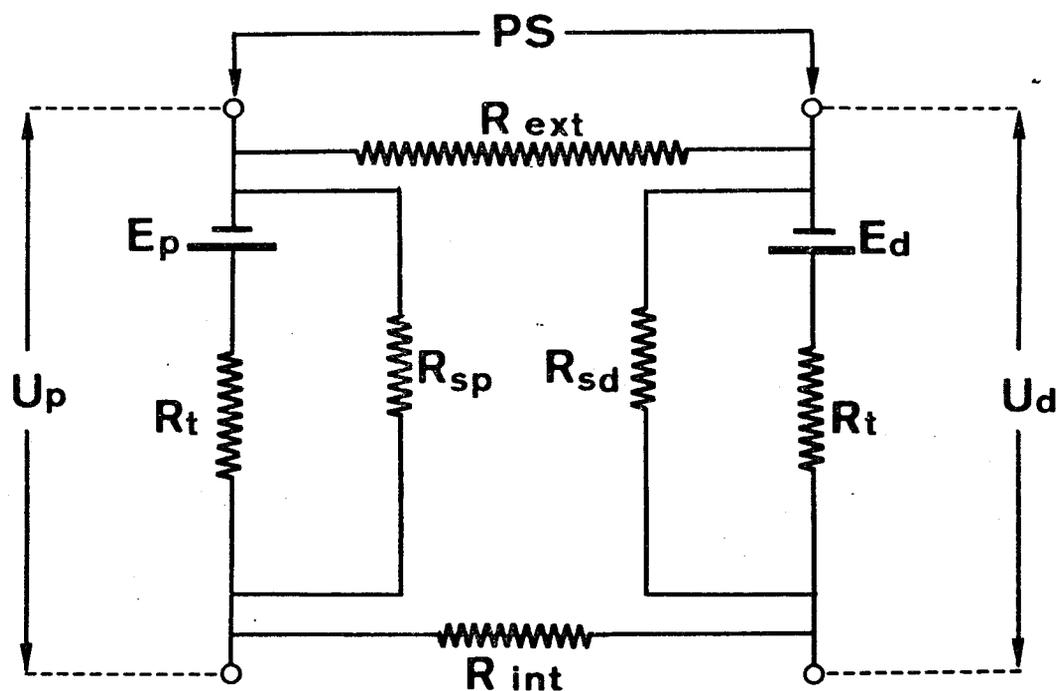


Figure 41 : Schéma électrique équivalent de l'épiderme du membre de Pleurodèle.
Up et Ud : ddp transépithéliales des régions proximale et distale
Ep et Ed : ddp créées par le transport actif d'ions Na⁺ au niveau proximal et au niveau distal
Rt : résistance associée au transport actif
Rsp et Rsd : résistance des shunts des niveaux proximal et distal
Rint : résistance interne très faible
Rext : résistance externe très élevée
PS : potentiels de surface.

caractéristiques électriques de l'épiderme.

Les régions proximale et distale sont caractérisées par la valeur de leur potentiel transépithélial U_p et U_d . Cette ddp résulte des flux d'ions Na^+ et Cl^- du milieu externe vers le milieu interne. Ces régions proximale et distale sont en outre reliées électriquement entre elles par une résistance interne (R_{int}) de faible valeur puisque le milieu interne est isoélectrique. Par contre, la résistance externe (R_{ext}) est de forte valeur tout au moins dans nos conditions de mesure c'est-à-dire lorsque l'animal est placé hors de l'eau. Les PS représentent la différence entre U_p et U_d .

CHAPITRE V

ROLE DES PERMEABILITES TRANSEPITHELIALES

DANS L'EXPRESSION DES POTENTIELS DE SURFACE

Nous avons montré que les PS représentent la manifestation externe d'une hétérogénéité physiologique du tégument qui s'exprime par des valeurs inégales de potentiel transépithélial au niveau proximal et au niveau distal du membre d'Amphibien adulte. On peut supposer que cette différenciation électrophysiologique dépend des mécanismes qui déterminent l'amplitude des potentiels transépithéliaux c'est-à-dire du transport actif (E) et des flux passifs d'ions (Rs) du milieu externe vers le milieu interne (Fig. 41, p. 66). La différence de potentiel existant entre les régions proximale et distale ($PS = U_p - U_d$) peut être attribuée soit à des valeurs inégales des courants actifs proximal et distal (E_p différent de E_d) soit à des valeurs inégales des flux passifs proximal et distal (R_{sp} différent de R_{sd}).

Dans ce chapitre, nous déterminerons la participation respective de ces deux facteurs.

I - ROLE DE LA PERMEABILITE ACTIVE

La mesure de la perméabilité active a été abordée par des techniques biochimiques*. Les ions Na^+ qui proviennent du milieu externe transitent dans les cellules avant d'être expulsés dans le milieu extracellulaire par la pompe sodium-potassium (Na/K) dont le fonctionnement requiert de l'énergie. Celle-ci, présente au niveau cellulaire sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), est libérée par une enzyme spécifique, la Na/K ATPase localisée dans les membranes basolatérales des cellules de l'épiderme (FARQUHAR et PALADE, 1964 ; MILLS et coll., 1977 a et b). La mesure de cette activité enzymatique traduit l'intensité du flux d'ions Na^+ vers le milieu interne, générateur de la ddp E (FERREIRA et coll., 1976).

1 - METHODOLOGIE

La méthode utilisée pour séparer l'épiderme des tissus

* Je remercie Messieurs VERBERT et CACAN du Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université de Lille I sans lesquels ce travail n'aurait pu être mené à bien.

sous-jacents a l'avantage de ne recourir à aucune substance chimique. Elle consiste après avoir mesuré les PS, à découper à l'emporte-pièce l'épiderme de cicatrisation de plaies pratiquées deux à trois semaines auparavant au niveau distal et au niveau proximal du membre. Les lambeaux épidermiques ont une surface identique (6,15 mm²) ; la quantité de tissus représentant chaque échantillon a été appréciée par le dosage des protéines totales par la méthode de LOWRY (1951). L'activité ATPasique est ensuite évaluée par la mesure de la dégradation d'ATP radioactif (voir Techniques, p.16).

2 - RESULTATS

a - Dosage des protéines

Le dosage de dix lambeaux épidermiques proximaux et distaux révèlent qu'à 5 % près, la quantité de protéines est équivalente dans chaque lambeau (moyenne 125 µg).

b - Réaction témoin

La détermination de la quantité de [8-³H] ADP présente au temps 0 (Fig. 42) montre que celle-ci représente 5 % de la radioactivité totale. Cette valeur est retranchée de celles obtenues après soixante minutes d'incubation.

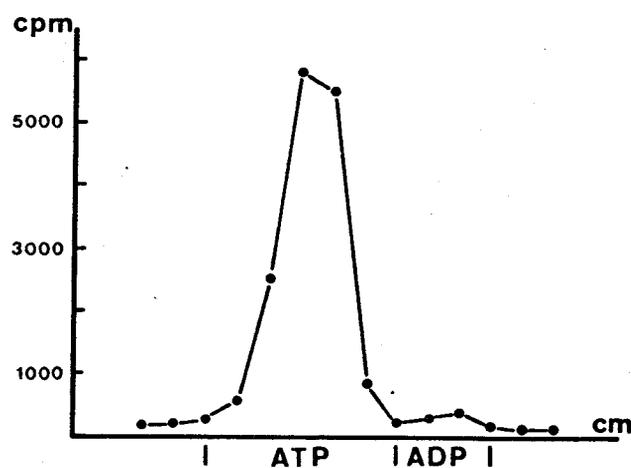


Figure 42 : Détermination de la quantité de [8-³H] ADP présente au temps 0. cpm = coups par minute ; cm = centimètres.

c - Cinétique de la réaction enzymatique

La vitesse de la réaction enzymatique est constante jusqu'à soixante minutes d'incubation (Fig. 43). Ce temps a été choisi pour toutes les expérimentations ; il correspond au moment où 15 à 25 % de l'ATP a été dégradé en ADP.

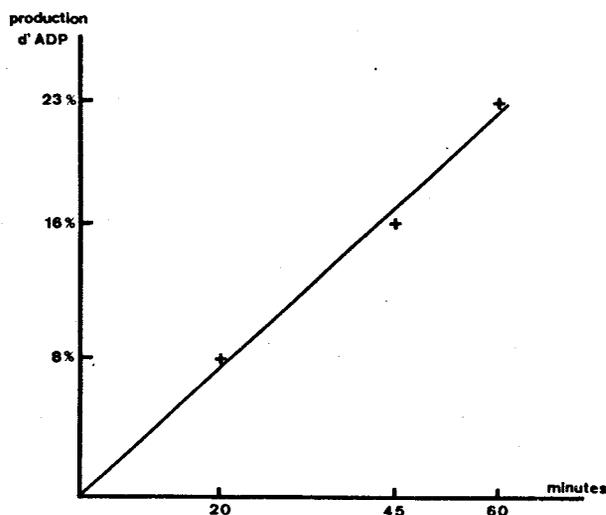


Figure 43 : Cinétique de la réaction enzymatique.

d - Activité ATPasique des lambeaux épidermiques

α Chez le Pleurodèle

La Figure 44 montre un exemple de dégradation de l'ATP en ADP sous l'influence de l'activité enzymatique de lambeaux épidermiques proximal et distal prélevés sur le même animal.

Les résultats obtenus sur les divers lambeaux étudiés

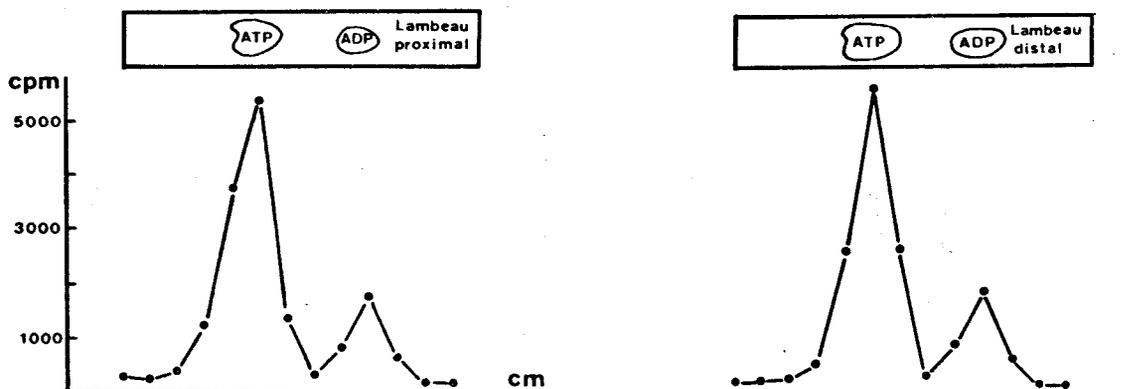


Figure 44 : Chromatogrammes et pics de radioactivité correspondant aux composés obtenus après 60 mn d'incubation de lambeaux épidermiques des régions proximale et distale du membre de Pleurodèle. cpm = coups par minute ; cm = centimètres.

ont été reportés dans le tableau (on constate que l'activité ATPasique totale (cas n° 1 à 5) du niveau proximal (moyenne 148 ± 36 nM/h/1) est équivalente à celle du niveau distal (moyenne 148 ± 31 nM/h/1) quelle que soit la valeur des PS préalablement mesurés. En présence d'ouabaine (cas n° 6 et 7), l'ATP formé provient du fonctionnement de l'ATPase liée au Mg^{2+} ; elle correspond à 56 % de l'activité enzymatique totale. Ramenée au mg de protéines, la production d'ADP liée au fonctionnement de la Na/K ATPase est égale à $0,67 \mu M/h/mg$. Le rapport Na/K ATPase/Mg ATPase est égal à 1,3.

β Chez l'Axolotl (cas n° 8 et 9)

Les mesures révèlent une activité ATPasique très faible, dix à vingt fois moins élevée que chez le Pleurodèle.

CAS	ESPÈCE ÉTUDIÉE	OUABAÏNE $5 \cdot 10^{-4}$ M	QUANTITÉ D'ADP FORMÉE EN 1 H		VALEUR DE P̄S
			LAMBEAU PROXIMAL	LAMBEAU DISTAL	
1	PLEURODÈLE	-	210	180	+ 25 mV
2	"	-	130	110	+ 30 mV
3	"	-	150	170	+ 40 mV
4	"	-	120	120	+ 10 mV
5	"	-	130	160	+ 12 mV
6	"	+	70	70	+ 44 mV
7	"	+	60	60	+ 35 mV
8	AXOLOTL	-	13	18	0 mV
9	"	-	16	12	0 mV

Tableau 11 : Mesure de l'activité ATPasique de lambeaux d'épiderme proximal et distal prélevés chez le Pleurodèle et chez l'Axolotl. Les résultats sont exprimés en nanomoles/heure/lambeau. Les lambeaux ont une surface de $6,15 \text{ mm}^2$ et une teneur moyenne en protéines de $125 \mu g$.

3 - DISCUSSION

L'évaluation de l'activité ATPasique que nous avons effectuée est relativement proche de celle obtenue par des techniques différentes chez d'autres Amphibiens ; KAWADA et coll. (1969) signalent en effet chez *Rana catesbiana* et chez *Rana pipiens* un rapport Na/K ATPase/MgATPase respectivement égal à 0,56 et 1,51 et une production d'ADP égale chez les deux espèces à 1 μ M/h/mg de protéines.

Nos résultats montrent que les PS ne sont pas liés à une différence de transport actif d'ions Na⁺ du milieu externe vers le milieu interne puisque l'activité ATPasique liée au Na/K est identique au niveau proximal et au niveau distal.

L'absence de PS chez les Axolotls, correspondant à l'absence de potentiel transépithélial, peut être attribuée à la faible activité ATPasique décelée chez ces animaux. Cette interprétation rejoint celle de KAWADA et coll. (1969) qui expliquent également l'absence de ddp transépithéliales chez les têtards de Grenouille par la faible activité ATPasique présente dans l'épiderme larvaire.

II - ROLE DE LA PERMEABILITE PASSIVE

Il a été montré par de nombreux auteurs que la perméabilité passive extracellulaire des épithéliums est localisée au niveau des "tight-junctions" qui séparent le milieu externe du milieu interne. La technique la plus couramment utilisée fait appel à un traceur visible au microscope électronique, le lanthane. Ajoutés sous forme ionique dans les solutions en contact avec la face externe des épithéliums non fixés, les sels de lanthane pénètrent dans les "tight-junctions" et envahissent les espaces intercellulaires lorsque le tissu présente une perméabilité passive élevée comme le tubule rénal proximal de Crapaud (WHITTEMBURY et RAWLINS, 1971) ou la vésicule biliaire et l'iléon de Lapin (MACHEN et coll., 1972). Par contre, si les tissus présentent une perméabilité

passive faible, le lanthane est arrêté par les "tight-junctions" (cas de la peau de Grenouille, MARTINEZ-PALOMO et coll., 1971).

Si les PS de la peau de Pleurodèle résultent d'une perméabilité passive inégale des niveaux proximal et distal comme le suggèrent les résultats obtenus après modification de la composition ionique du milieu externe (Chapitre IV), les sels de lanthane constituent alors un marqueur de choix pour visualiser cette perméabilité différentielle si celle-ci est liée aux "tight-junctions".

Nous analyserons ce phénomène sur les téguments de membres placés dans des conditions normales et également sur ceux dont la perméabilité passive a été artificiellement augmentée par élévation de la pression osmotique du milieu externe (Chapitre III).

1 - METHODOLOGIE

Les membres de Pleurodèle dont les PS ont été préalablement mesurés sont immergés soit dans une solution physiologique isotonique soit dans une solution physiologique rendue hyperosmotique (720 mosM) par addition de NaCl ou d'urée. Dans chaque solution sont ajoutées 1 à 20 mM/l de LaCl_3 (pH 7,0). Au bout d'une heure d'immersion, les PS sont mesurés à nouveau et les lambeaux de peau sont prélevés au niveau proximal et au niveau distal du membre. Ils sont ensuite préparés pour la microscopie électronique par les techniques habituelles. Les coupes sont ou non contrastées.

2 - RESULTATS

Avant d'exposer les résultats obtenus sur les lambeaux soumis aux sels de lanthane, nous décrirons rapidement la structure de l'épiderme de Pleurodèle telle qu'elle apparaît au microscope électronique.

a - Ultrastructure de l'épiderme de Pleurodèle adulte

L'épiderme est constitué de quatre à cinq couches de cellules présentant des modifications morphologiques en relation

avec le processus de kératinisation (Pl. I, Fig. 1). La couche la plus interne de cellules (assise génératrice) repose sur la lame basale qui marque la limite entre le derme et l'épiderme. Les cellules de cette assise génératrice présentent une forme cuboïde et possèdent un noyau qui occupe la plus grande partie du cytoplasme. Celui-ci contient de nombreuses mitochondries, des ribosomes isolés ou associés au reticulum endoplasmique et quelques granules denses aux électrons. La membrane plasmique adjacente à la lame basale développe de nombreuses vésicules de pinocytose (Pl. I, Fig. 2). Au fur et à mesure que la différenciation épidermique progresse, les cellules s'aplatissent et se chargent de granules denses aux électrons et de filaments cytoplasmiques. Ces derniers sont réunis en faisceaux particulièrement nombreux dans la couche de cellules située sous la couche kératinisée (Pl. II, Fig. 1 et Pl. III, Fig. 1). L'épiderme est limité extérieurement par une couche de cellules mortes entièrement kératinisée, très dense aux électrons et dans laquelle plus aucun organite n'est visible (Pl. III, Fig. 1). La membrane plasmique de toutes les cellules vivantes émet de nombreuses digitations dans les espaces intercellulaires. Lorsque les prolongements cytoplasmiques de deux cellules voisines se rencontrent, une structure de type desmosome les unit (Pl. I, Fig. 1 ; Pl. II, Fig. 1, 2). Ces jonctions cellulaires qui apparaissent en très grand nombre lorsque la coupe traverse tangentiellement un espace intercellulaire (Pl. II, Fig. 2) assurent la cohésion des cellules. Un autre type de jonctions cellulaires, les "tight-junctions" existent uniquement à l'apex de la première couche de cellules vivantes située immédiatement sous la couche kératinisée (Pl. III, Fig. 1). Ces jonctions sont formés par la fusion des feuillettes externes des membranes plasmiques de deux cellules contigües (Pl. III, Fig. 2). Ce sont ces jonctions qui assurent l'isolement des milieux externe et interne. On peut donc considérer que le milieu externe correspond aux liquides en contact avec la face externe de la peau, à la couche de cellules kératinisées et à l'espace intercellulaire situé entre ces cellules mortes et la première couche de cellules vivantes alors que le milieu interne correspond à tous les espaces intercellulaires situés en deçà des "tight-junctions".

b - Perméabilité passive de l'épiderme de Pleurodèle en présence d'un milieu externe hyperosmotique

L'action des milieux hyperosmotiques se traduit par une dilatation des cellules situées sous la couche kératinisée et l'apparition de grandes vacuoles limitées par une membrane dans la deuxième couche de cellules vivantes (Pl. IV, Fig. 1). L'espace intercellulaire située entre ces deux couches est également dilaté ; il est limité par les membranes plasmiques dont les digitations sont presque totalement disparues. Les zones de jonctions cellulaires apparaissent alors nettement ; elles sont constituées par les desmosomes et par des contacts qui ne présentent pas de différenciation particulière (Pl. IV, Fig. 2). Ces derniers correspondent probablement aux jonctions de type "gap" qui assurent les échanges entre cellules. Les milieux hyperosmotiques tendent également à modifier la structure des "tight-junctions" ; en effet, la plupart d'entre elles présentent des dilatations qui semblent désunir les feuilletts membranaires normalement associés (Pl. IV, Fig. 3).

Ajoutés au liquide hyperosmotique, les sels de lanthane se déposent dans les espaces intercellulaires (Pl. V, Fig. 1), au niveau des jonctions qu'elles soient du type "tight" ou du type desmosome (Pl. V, Fig. 3) et à l'intérieur de la couche kératinisée (Pl. V, Fig. 2).

c - Perméabilité passive de l'épiderme de Pleurodèle en présence d'un milieu externe isotonique

L'observation de très nombreuses coupes de lambeaux de peau prélevés sur des membres de Pleurodèle équilibrés avec une solution physiologique isotonique contenant du chlorure de lanthane a permis de constater la présence de ce traceur dans les espaces intercellulaires de la couche kératinisée (Pl. VI, Fig. 4), sous cette couche kératinisée (Pl. VI, Fig. 2 et 3) mais également dans certaines "tight-junctions" (Pl. VI, Fig. 2 et 5) et les espaces intercellulaires profonds (Pl. VI, Fig. 1, 2, 3). L'analyse des "tight-junctions" envahies par le lanthane a été effectuée systématiquement sur des coupes non contrastées de lambeaux de peau proximaux et distaux. Les résultats ont été reportés dans le

Tableau 12. On constate qu'il existe une assez bonne corrélation entre le nombre de "tight-junctions" perméables au lanthane et la valeur des PS : les régions à potentiel positif sont celles qui possèdent le plus grand nombre de jonctions où des précipités de sels de lanthane sont visibles.

LAMBEAU PROXIMAL	:	LAMBEAU DISTAL	:	PS
0	:	++	:	+ 11 mV
+	:	++	:	+ 8 mV
0	:	+	:	+ 6 mV
+	:	+	:	0 mV
++	:	0	:	- 8 mV
++	:	0	:	- 8 mV
++	:	0	:	- 10 mV

Tableau 12 : Comparaison entre la valeur des PS et le nombre de "tight-junctions" envahies par le lanthane au niveau proximal et distal d'un même nombre de Pleurodèle. La valeur des PS correspond à celle mesurée après une heure de contact avec la solution physiologique contenant le lanthane. Les symboles indiquent le nombre de "tight-junctions" envahies par le lanthane par rapport à celle qui ne le sont pas.
 0 = nombre de tight-junctions inférieur à 10 %
 + = 10 à 30 %
 ++ = 50 à 60 %.

3 - DISCUSSION

L'utilisation d'un traceur visible au microscope électronique nous a permis de montrer que la perméabilité passive extracellulaire de l'épiderme de Pleurodèle est localisée comme dans d'autres épithéliums au niveau des "tight-junctions" puisque les sels de lanthane se déposent uniquement dans les espaces intercellulaires et jamais dans les cellules, mises à part celles de la couche kératinisée. Cette dernière observation confirme d'ailleurs que ces cellules jouent un rôle tout à fait passif et

peuvent être considérées comme appartenant au milieu externe. Nos résultats semblent en outre confirmer qu'il existe une relation entre les PS et la perméabilité de ces jonctions. En effet, dans les conditions normales (isotonicité), c'est la région du membre la plus positive qui possède globalement la perméabilité extracellulaire la plus élevée. Par contre, lorsque l'on abolit expérimentalement les PS par augmentation de la pression osmotique du milieu externe, la perméabilité passive devient très élevée et uniforme quelle que soit la région du membre analysée.

Ces résultats montrent un certain nombre de points communs mais aussi de divergences avec ceux obtenus par d'autres auteurs. En ce qui concerne l'action des milieux hyperosmotiques, nos observations sont tout à fait similaires à celles de ERLIJ et coll., (1972) sur la peau de Grenouille isolée et à celles de WADE et coll. (1973-1974) sur la vessie de Crapaud. Quel que soit le moyen d'étude utilisé (coupes de microscopie électronique avec ou sans traceur, cryodécapage), tous les auteurs s'accordent à penser que les milieux hypertoniques augmentent la perméabilité passive en provoquant l'ouverture des "tight-junctions" par augmentation de la pression hydrostatique due à l'efflux d'eau cellulaire (WADE et coll., 1973). Par contre, en ce qui concerne la perméabilité des "tight-junctions" dans les conditions isotoniques, nos résultats sont en contradiction avec ceux de MARTINEZ-PALOMO et coll. (1971). Ces auteurs montrent que les "tight-junctions" de la peau de Grenouille sont imperméables au lanthane, les précipités de ce sel étant visibles uniquement dans la couche kératinisée et dans l'espace intercellulaire sous-jacent mais jamais dans ceux situés entre les couches de cellules vivantes. Cette différence de résultats peut être expliquée selon nous par le fait que ces auteurs utilisent des lambeaux de peau isolés dont la ddp transépithéliale est très élevée (80 à 90 mV) ; or, il a été montré que ces ddp de peau isolée sont très supérieures à celles mesurées *in vivo* chez le même animal et que cette différence est due en grande partie à la diminution de la perméabilité passive de la peau placée dans des conditions artificielles (BROWN, 1962). Cette faible perméabilité passive de la peau isolée pourrait expliquer la différence de

comportement des téguments de Grenouille *in vitro* et celui du Pleurodèle *in vivo*. D'ailleurs, les mesures que nous avons réalisées *in vivo* chez le Pleurodèle (Tableau 8, p. 59) avaient révélé des valeurs assez faibles traduisant fort probablement une perméabilité passive élevée. Les résultats obtenus avec les sels de lanthane semblent donc confirmer cette hypothèse.

Nos observations peuvent être rapprochées de celles réalisées électrophysiologiquement sur le tubule rénal d'Amphibiens et de Mammifères (BOULPAEP et coll., 1971 ; WRIGHT, 1971). Dans ce tissu, la région proximale possède une faible ddp transépithéliale associée à une forte conductance alors que la région distale possède une ddp transépithéliale élevée et une conductance faible. Les études de la perméabilité extracellulaire de ce tissu font apparaître que les "tight-junctions" de la région proximale mais aussi de la région distale sont perméables au lanthane (WHITTEMBURY et RAWLINS, 1971 ; RAWLINS et coll., 1975). Ces derniers résultats sont quelque peu différents des nôtres, cependant il faut préciser que la structure des "tight-junctions" des deux régions analysées est très différente : celles de la région proximale apparaissent très ouvertes et très peu hautes alors que celles de la région distale sont étroites et très hautes (MARTINEZ-PALOMO et coll., 1973).

CONCLUSION

La mesure de l'activité ATPasique des régions proximale et distale du membre de Pleurodèle révèle que ces régions possèdent une perméabilité active identique. Par contre, l'utilisation du chlorure de lanthane comme marqueur extracellulaire montre que ces mêmes régions présentent une perméabilité passive différente, les "tight-junctions" de la région positive (habituellement la région distale du membre) étant globalement plus perméables que celles de la région négative. Cette perméabilité différentielle des "tight-junctions" peut rendre compte de la différenciation proximo-distale des potentiels transépithéliaux qui donne naissance aux PS.

CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE

Les membres de Pleurodèle sont caractérisés par la présence de PS répartis en gradient le long de l'axe proximo-distal. Lorsque les mesures sont effectuées sur une population d'âge varié, dans 86 % des cas, la région distale du membre (région du poignet) est positive (+ 13 mV) par rapport à la région proximale (épaule) ; dans le reste des cas, la polarité est complètement inversée (- 10 mV). Des PS ont également été détectés sur les axes antéro-postérieur et dorso-ventral mais leur amplitude est faible et leur polarité variable. Les PS sont caractéristiques des adultes, les larves (de Pleurodèle) et les Axolotls (larve néoténique d'Ambystome) en étant dépourvus.

Le tissu responsable de l'expression de ces PS est l'épiderme ; son ablation entraîne l'abolition complète des PS. La dénervation, l'extirpation d'os ou l'arrêt de la circulation sanguine ne provoquent que des modifications temporaires des PS dues aux incisions de peau nécessaire à la réalisation de telles opérations.

Les modifications de l'intégrité structurale (par les blessures) ou fonctionnelle (par l'augmentation de la pression osmotique du milieu externe) de l'épiderme se traduisent par des modifications de l'amplitude et de la polarité des PS. Lorsque l'action de ces facteurs est limitée soit à la partie distale, soit à la partie proximale du membre, la région traitée devient positive par rapport à la région non traitée. Dans les deux cas, l'apparition de la positivité correspond à l'augmentation de la perméabilité passive de l'épiderme, le milieu externe venant en contact avec le milieu interne directement au niveau d'une blessure, par l'ouverture des "tight-junctions" sous l'effet d'un milieu externe hyperosmotique.

La relation existant entre les PS et la perméabilité épidermique nous a conduit à considérer les PS comme le résultat d'une régionalisation le long de l'axe proximo-distal des ddp transépithéliales existant de part et d'autre du tégument. Cette hypothèse a été vérifiée :

1 - par les modifications de l'amplitude et de la polarité des PS consécutives aux changements de la composition ionique du milieu externe qui altèrent la valeur des potentiels transépithéliaux ;

2 - par la mesure simultanée *in vivo* et *in vitro* des potentiels transépithéliaux et des PS.

Les PS correspondent à la mesure sur la face externe de la peau des Amphibiens à la différence de valeur existant entre le potentiel transépithélial de la région proximale et le potentiel transépithélial de la région distale. Dans le cas d'un gradient

positif de potentiel de surface (86 % des cas), la région proximale est celle qui possède le potentiel transépithélial le plus élevé. L'absence de potentiel transépithélial chez les larves explique l'absence de PS.

L'origine de cette différenciation proximo-distale des ddp transépithéliales a été recherchée dans les facteurs qui contrôlent l'amplitude de ces potentiels transépithéliaux ; il s'agit d'une part, de l'activité ATPasique liée au Na/K qui traduit l'intensité du flux sodique générateur de la ddp transépithéliale et d'autre part, de la perméabilité passive extracellulaire qui module l'amplitude de cette ddp transépithéliale.

La mesure de la dégradation de l'ATP sous l'influence de l'ATPase des lambeaux épidermiques proximalet distal montre que l'activité enzymatique est identique aux deux niveaux du membre. Par contre, la visualisation de la perméabilité passive extracellulaire (localisée au niveau des "tight-junctions") par un marqueur visible au microscope électronique, le lanthane, révèle que la région la plus positive (habituellement la région distale) est globalement plus perméable que la région négative (région proximale).

L'absence de potentiel transépithélial chez les larves (entraînant l'absence de PS) est due à l'activité ATPasique très faible de l'épiderme larvaire.

Les PS présents le long de l'axe proximo-distal du membre des Amphibiens adulte correspondent donc à une hétérogénéité physiologique du tégument qui s'exprime par une perméabilité extracellulaire plus élevée de la région distale par rapport à la région proximale.

DEUXIEME PARTIE

EVOLUTION DES POTENTIELS DE SURFACE AU COURS

DU DEVELOPPEMENT ET DE LA REGENERATION

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré que les PS détectés le long des membres d'Amphibiens adultes résultent d'une hétérogénéité fonctionnelle de l'épiderme liée à la perméabilité différentielle des "tight-junctions". Or, cet épiderme subit de profondes modifications au cours d'évènements biologiques tels que la métamorphose, la mue et la régénération. Ainsi, à la métamorphose, l'épiderme est le siège d'importants remaniements aboutissant à une différenciation morphologique et fonctionnelle nouvelle ; au moment de la mue, l'élimination de la couche de cellules épidermiques kératinisées est l'aboutissement d'un processus permanent de multiplication et de différenciation cellulaire ; au cours de la régénération interviennent des phénomènes complexes de migration et de réorganisation des cellules épidermiques. A la lumière des résultats que nous avons apportés sur l'origine des PS, nous nous proposons dans cette deuxième partie, d'étudier les relations qui s'établissent entre ces divers états anatomo-physiologiques et les PS.

CHAPITRE VI

LES POTENTIELS DE SURFACE AU COURS

DE LA VIE DES AMPHIBIENS

Les PS ont été examinés au moment de leur apparition c'est-à-dire lors du passage de l'état larvaire à l'état adulte et au cours des mues et des intermues qui caractérisent la vie adulte.

I - LES POTENTIELS DE SURFACE ET LA METAMORPHOSE

Le développement des Amphibiens est marqué par une étape importante, la métamorphose, qui transforme la larve en adulte. Toutefois, chez certains Amphibiens qualifiés de néoténiques (cas de l'*Axolotl*) cette étape n'a pas lieu et ces animaux conservent toute leur vie leurs caractères larvaires (nageoires dorsale et caudale, branchies externes, épiderme non kératinisé, etc...). Cette persistance des caractères larvaires due à un hypofonctionnement thyroïdien, se manifeste également au niveau des PS, ces animaux comme les larves normales en étant totalement dépourvus (voir Chapitre I). Les PS qui sont typiques des adultes apparaissent donc selon toute vraisemblance au moment de la métamorphose. Il était donc intéressant de suivre l'apparition des PS en relation avec les transformations morphologiques qui affectent l'épiderme au cours de l'induction expérimentale de la métamorphose chez ces Amphibiens néoténiques.

1 - METHODOLOGIE

La métamorphose a été induite chez l'*Axolotl* (*Ambystoma mexicanum*), Amphibien néoténique facultatif c'est-à-dire capable de se transformer en adulte sous l'effet de la thyroxine. L'étude de la métamorphose provoquée chez ces animaux présente un double avantage par rapport à la métamorphose naturelle des larves de Pleurodèles : la grande taille des Axolotls (vingt centimètres en moyenne) favorise la mesure des PS ; en outre, le début de la transformation imposée par l'expérimentateur est strictement contrôlé et ne dépend plus comme chez les larves de Pleurodèle de facteurs hormonaux internes peu accessibles à l'expérimentation. L'induction de la

métamorphose chez l'Axolotl est obtenue par l'adjonction de 100 µg/l de thyroxine synthétique dans l'eau d'élevage, celle-ci étant renouvelée quotidiennement. La mesure des PS et les prélèvements d'épiderme destiné à l'étude ultrastructurale sont effectués tous les deux jours à partir du début de l'expérimentation (premier bain de thyroxine) jusqu'à la métamorphose complète (vingt à trente jours plus tard) caractérisée par la disparition des nageoires dorsale et caudale, l'exorbitation et la cyclisation de la mue.

2 - RESULTATS

Jusqu'au dix ou douzième jour suivant le premier bain de thyroxine, aucun PS n'est décelable à la surface des membres d'Axolotl bien que pendant cette période l'épiderme subit de profondes modifications.

L'épiderme larvaire d'Axolotl (Pl. VII) est constitué de deux types cellulaires : d'une part, les cellules de Leydig (Pl. VII, Fig. 1), volumineuses à noyau central et cytoplasme clair contenant de nombreuses vacuoles et des granules denses aux électrons et d'autre part, les cellules épidermiques proprement dites d'aspect sombre réparties dans toute l'épaisseur de l'épiderme entre les cellules de Leydig (Pl. VII, Fig. 1). A la périphérie de l'épiderme, ces cellules épithéliales banales s'aplatissent et leur région apicale est occupée par de nombreuses vacuoles (Pl. VII, Fig. 2 et 3) contenant un matériel filamenteux semblable au "cell coat" nettement visible à la périphérie des digitations de la surface cellulaire (Pl. VII, Fig. 4).

Après six jours de contact avec la thyroxine, la structure de l'épiderme commence à se modifier à partir de sa surface (Pl. VIII, Fig. 1). Les cellules de la couche externe perdent leurs vacuoles et le cytoplasme devient très dense aux électrons (Pl. VIII, Fig. 2) signe apparent de la kératinisation. Les cellules de Leydig sont encore nombreuses dans la couche profonde de l'épiderme.

Après dix jours, à l'exception de quelques rares cellules de Leydig, l'épiderme n'est plus constitué que de cellules

dont le cytoplasme contient de nombreuses fibrilles caractéristiques de cellules engagées dans un processus de kératinisation (Pl. VIII, Fig. 3). Les animaux parvenus à ce stade présentent les premiers signes de mue, la couche superficielle de l'épiderme se détachant par petits lambeaux (Pl. VIII, Fig. 4).

Après douze jours de contact avec la thyroxine, l'épiderme a acquis une structure adulte (Pl. IX, Fig. 1). Le nombre de couches cellulaires est plus élevé que chez le Pleurodèle mais la structure générale est identique : les cellules basales ovoïdes possèdent un noyau qui occupe une grande partie du cytoplasme puis les cellules s'aplatissent et se chargent de fibrilles (Pl. IX, Fig. 2) ; enfin, l'épiderme est recouvert d'une couche continue de cellules keratinisées très denses aux électrons. C'est à ce stade de différenciation épidermique que les PS apparaissent (Pl. X, Fig. 1). Ces PS évoluent de jour en jour mais ne présentent pas de profil typique (Pl. X, Fig. 1, 2, 3, 4). C'est au bout d'un mois environ qu'un profil stable apparaît (Pl. X, Fig. 5) identique en amplitude et en polarité à celui présent chez le Pleurodèle.

3 - DISCUSSION

Nos résultats montrent que les PS apparaissent au cours de la métamorphose lorsque la transformation de l'épiderme de type larvaire en type adulte est achevée ; l'obtention d'un profil de PS stable en amplitude et en polarité n'est cependant obtenu que quelques semaines plus tard. Etant donné que les PS résultent d'une régionalisation des ddp transépithéliales il apparaît donc que la métamorphose a pour effet d'induire d'une part, l'apparition des ddp transépithéliales qui sont très faibles chez les larves (Chapitre IV) en raison de la faible activité ATPasique de l'épiderme (Chapitre V) et d'autre part, la mise en place d'un gradient de perméabilité différentielle des "tight-junctions" indispensable à la régionalisation de ces ddp transépithéliales. Nos résultats semblent indiquer que ces phénomènes apparaissent successivement au cours de la métamorphose. On peut en effet supposer que lorsque la

différenciation morphologique de l'épiderme est acquise c'est-à-dire après dix à douze jours de contact avec la thyroxine, les cellules sont alors toutes équipées des enzymes nécessaires au transport actif d'ions (Na/K ATPase) c'est-à-dire à la création d'une ddp transépithéliale. Bien qu'une étude biochimique soit indispensable pour vérifier cette hypothèse, l'apparition des PS au deuxième jour témoigne de l'acquisition au moins partielle de cette activité. Le délai de vingt jours environ nécessaire à l'établissement d'un profil typique de PS correspond vraisemblablement à la mise en place du synchronisme des divisions cellulaires conduisant à la mue ; en effet, pendant cette période l'animal perd continuellement de petits lambeaux de couche kératinisée. Après un mois environ, la mue devient cyclique et la couche kératinisée se détache en bloc de l'animal ; or, c'est à ce moment que les PS se stabilisent en amplitude et en polarité.

II - LES POTENTIELS DE SURFACE ET LA MUE

Chez les Amphibiens adultes, les cellules épidermiques de l'assise génératrice migrent vers la région externe du tégument et se différencient progressivement en une couche de cellules kératinisées qui finalement se détache au moment de la mue. Cette dynamique cellulaire nécessite la formation périodique de nouvelles "tight-junctions" au niveau des cellules situées sous la nouvelle couche kératinisée (ancienne première couche de cellules vivantes). Compte-tenu du rôle que jouent ces jonctions dans l'expression des PS, il convenait d'apprécier les conséquences de cette différenciation cellulaire sur les PS.

1 - METHODOLOGIE

Les PS sont mesurés chaque jour entre les régions proximale et distale (régions A et B précédemment définies) des membres antérieurs de Pleurodèles adultes. Le jour de la mue est aisément repérable puisque la couche kératinisée se détache en bloc et flotte autour de l'animal pendant 48 H avant que celui-ci s'en débarrasse. Avant d'effectuer la mesure des PS, l'animal est dépouillé de sa mue.

2 - RESULTATS

La Figure 45 représente les résultats des mesures de PS obtenus pendant trois semaines sur des animaux différents. Ces graphiques montrent très clairement que pendant les phases d'intermues, l'amplitude des PS varie notablement mais que leur polarité reste identique ; la région distale du membre est positive par rapport à la partie proximale. Par contre, le jour de la mue et seulement pendant ce jour, deux cas ont été observés : ou le gradient de PS s'inverse et la région distale du membre devient négative de 10 mV environ ou les PS disparaissent et le membre est alors isopotentiel (Fig. 45, cas n° 2). A chaque fois que ce dernier cas s'est présenté, nous avons pu constater que la valeur des ddp transépithéliales mesurées *in vivo* était très faible voire nulle.

3 - DISCUSSION

Les graphiques de la Figure 45 montrent que la mue survient environ tous les sept jours et qu'à ce moment le gradient de PS s'inverse. Cette inversion de la polarité du membre avait été constatée également lors des mesures réalisées sur un groupe hétérogène de Pleurodèle (Chapitre I) avec une fréquence d'apparition de 14 %. Or, si l'on considère une population d'individus suffisamment grande dont chaque membre mue tous les sept jours de manière asynchrone, on peut en déduire que chaque jour $1/7$ soit 14 % de la population va muer ; au bout de sept jours tous les animaux auront donc mué. La similitude entre cette fréquence calculée et celle observée nous amène à considérer les gradients de PS négatifs comme ceux résultant d'animaux en cours de mue. L'inversion ou l'annulation des PS s'explique par le fait qu'au moment de la mue, les "tight-junctions" n'assurent plus pendant un certain temps (plusieurs heures) leur fonction d'isolement vis-à-vis du milieu externe. Cette explication repose sur l'interprétation des résultats obtenus par divers auteurs sur la peau de Grenouille isolée. En effet, l'induction *in vitro* de la mue sous l'action de l'aldostérone (NIELSEN, 1969 ; VOUTE et coll., 1969 ;

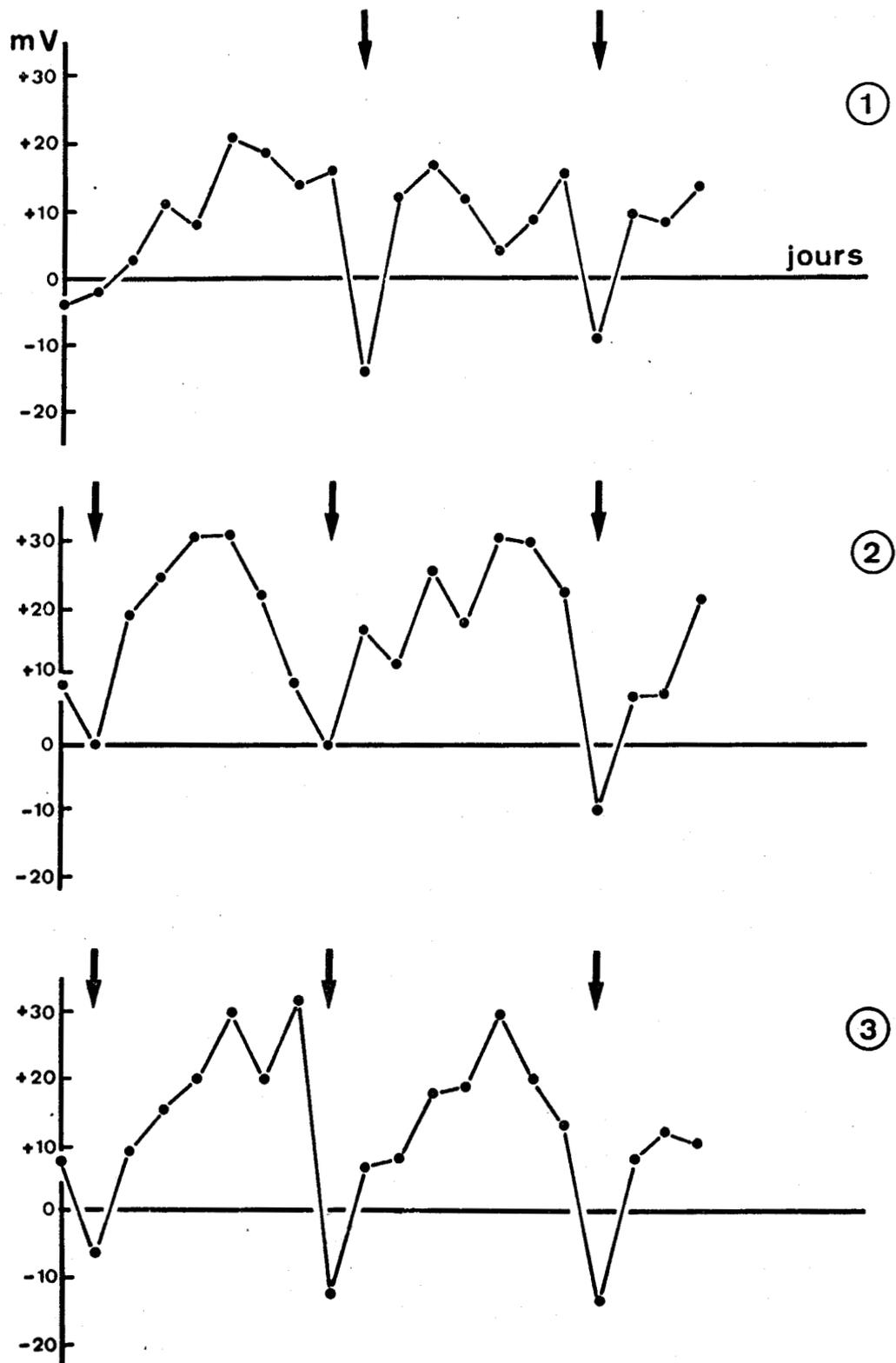


Figure 45 : Evolution des PS des membres de trois Pleurodèles différents en fonction du temps. Chaque point représente la valeur de la ddp mesurée chaque jour entre la région proximale et la région distale du membre (régions A et B précédemment définies). ↓ = jour de la mue.

BUS
LILLE

LARSEN, 1970 ; SMITH, 1975) provoque une diminution très importante de la résistance et de la ddp transépithéliales. Cette diminution qui se prolonge pendant plusieurs heures résulte, selon ces auteurs, de la mise en place des "tight-junctions" au niveau de la couche cellulaire située sous la nouvelle couche kératinisée ; au cours de cette période, les feuilletts externes des membranes de ces futures "tight-junctions" n'apparaissent pas encore fusionnés (BUDTZ et coll., 1975).

CONCLUSION

Les PS apparaissent au moment de la métamorphose qu'elle soit naturelle (Pleurodèle) ou induite par la thyroxine (Axolotl). Ils subissent au cours de la vie de ces animaux des modifications en rapport avec les transformations épidermiques périodiques (mue) qui caractérisent la vie des Amphibiens adultes. En effet, au moment de la mue, les membres deviennent isopotentiels (les PS s'annulent) ou leur polarité s'inverse (l'extrémité des membres devient négative par rapport à leur région proximale). Ces modifications temporaires des PS correspondent vraisemblablement à la formation des "tight-junctions" nouvelles qui s'établissent à l'apex de la deuxième couche de cellules vivantes.

CHAPITRE VII

EVOLUTION DES POTENTIELS DE SURFACE AU COURS

DE LA REGENERATION DES MEMBRES

La régénération complète d'un membre d'Amphibien Urodèle représente le terme ultime d'une suite de transformations qui se succèdent dans le temps et dont le déroulement est conditionné par l'intervention de divers facteurs (nerveux, hormonaux...). Immédiatement après l'amputation d'un membre, les cellules épidermiques qui bordent le moignon migrent sur le front de section et assurent la fermeture rapide de la plaie. Les cellules de la partie distale des tissus de la souche subissent de profondes modifications qui conduisent à la perte de leurs caractéristiques morphologiques et ultrastructurales. Cette dédifférenciation cellulaire aboutit à la formation d'une masse de cellules indifférenciées qui s'accumulent sous l'épiderme de cicatrisation et forment ainsi un blastème. C'est la croissance et la différenciation de ce blastème qui assurera la régénération des parties manquantes du membre. Il a été montré (TASSAVA et coll., 1977) que la lésion et la migration des cellules épidermiques sont indispensables à l'initiation des processus de morphogenèse régénératrice même si tous les autres facteurs sont réunis. Compte-tenu de l'origine des PS que nous avons établie, ces modifications impliquent une altération profonde des PS. Ce sont ces modifications de PS en relation avec les processus de cicatrisation et de régénération que nous nous proposons d'analyser maintenant.

1 - METHODOLOGIE

La régénération a été étudiée chez les Pleurodèles dont les membres ont été sectionnés au milieu de l'avant-bras.

Les expérimentations témoins ont consisté à mesurer les PS sur des animaux cicatrisant une plaie. Deux groupes d'animaux ont été analysés. Le premier groupe est constitué de Pleurodèles ayant subi l'excision d'un lambeau de peau sur une partie quelconque de la face dorsale du membre. Le deuxième groupe est constitué de Pleurodèles chez lesquels la régénération du membre a été bloquée soit par irradiation X soit par dénervation. Les membres irradiés sont sectionnés quinze jours après l'irradiation ;

les membres dénervés dont la circulation sanguine a été respectée pour éviter leur régression (REVARDEL et coll., 1975) sont sectionnés immédiatement après l'opération.

Dans quelques cas, des mesures ont également été effectuées au niveau des moignons d'amputation d'espèces (*Rana esculenta*) ayant naturellement perdu leurs capacités régénératrices.

Dans tous ces groupes, les PS sont mesurés tous les deux à trois jours. L'électrode d'enregistrement (E_1) est posée sur la région blessée, l'électrode de référence (E_2) étant placée proximale à environ 4 mm de la première (Fig. 46, b et c). Avant l'amputation ou l'excision d'un lambeau de peau, la polarité de la région du membre qui subira l'opération est relevée (Fig. 46 a).

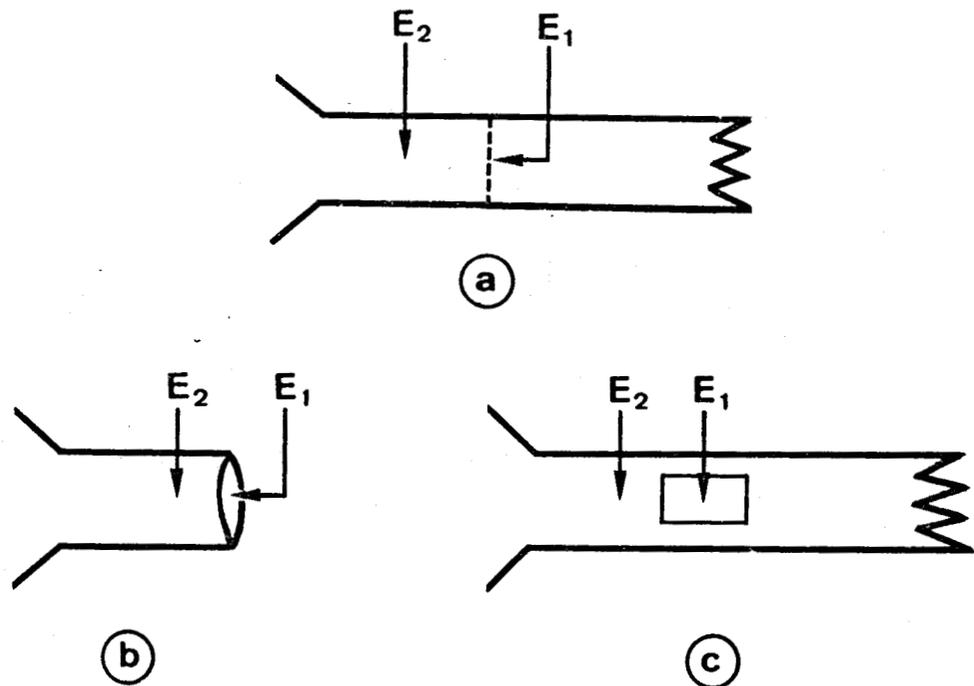


Figure 46 : Position des électrodes lors de la mesure des PS d'une région du membre en régénération. E_1 : électrode d'enregistrement ; E_2 : électrode de référence.
a : avant l'amputation ----- = futur front de section
b : après l'amputation
c : après l'excision d'un lambeau de peau sur la face dorsale du membre.

2 - RESULTATS

a - Membres en régénération

Les enregistrements (douze cas) de PS réalisés chez le Pleurodèle (Fig. 47) montrent que l'amputation est suivie par l'apparition d'une forte positivité dont le maximum d'intensité ($\bar{x} = +18$ mV) est obtenu généralement quatre à six jours après l'opération. Cette positivité décroît rapidement et vers le quinzième jour, la polarité du moignon s'inverse ($\bar{x} = -4$ mV) pendant environ deux semaines. Enfin, vers le trentième jour suivant l'amputation la polarité de l'extrémité du membre en régénération

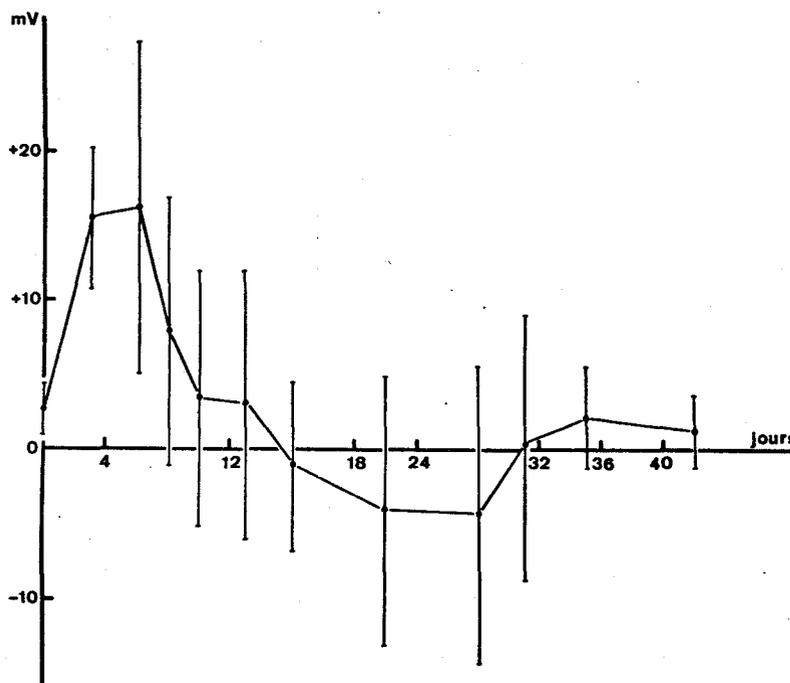


Figure 47 : Evolution des PS au cours de la régénération des membres de Pleurodèles (moyenne de 12 enregistrements).

possède une valeur proche de celle mesurée avant l'amputation. La Figure 47 montre en outre que les écarts-types affectés à chaque moyenne sont relativement faibles avant l'amputation et à partir du trentième jour après l'opération mais sont par contre très importants entre ces deux périodes. Les causes de

cette variabilité apparaissent nettement lorsque les courbes d'évolution des PS sont analysées individuellement (Fig. 48).

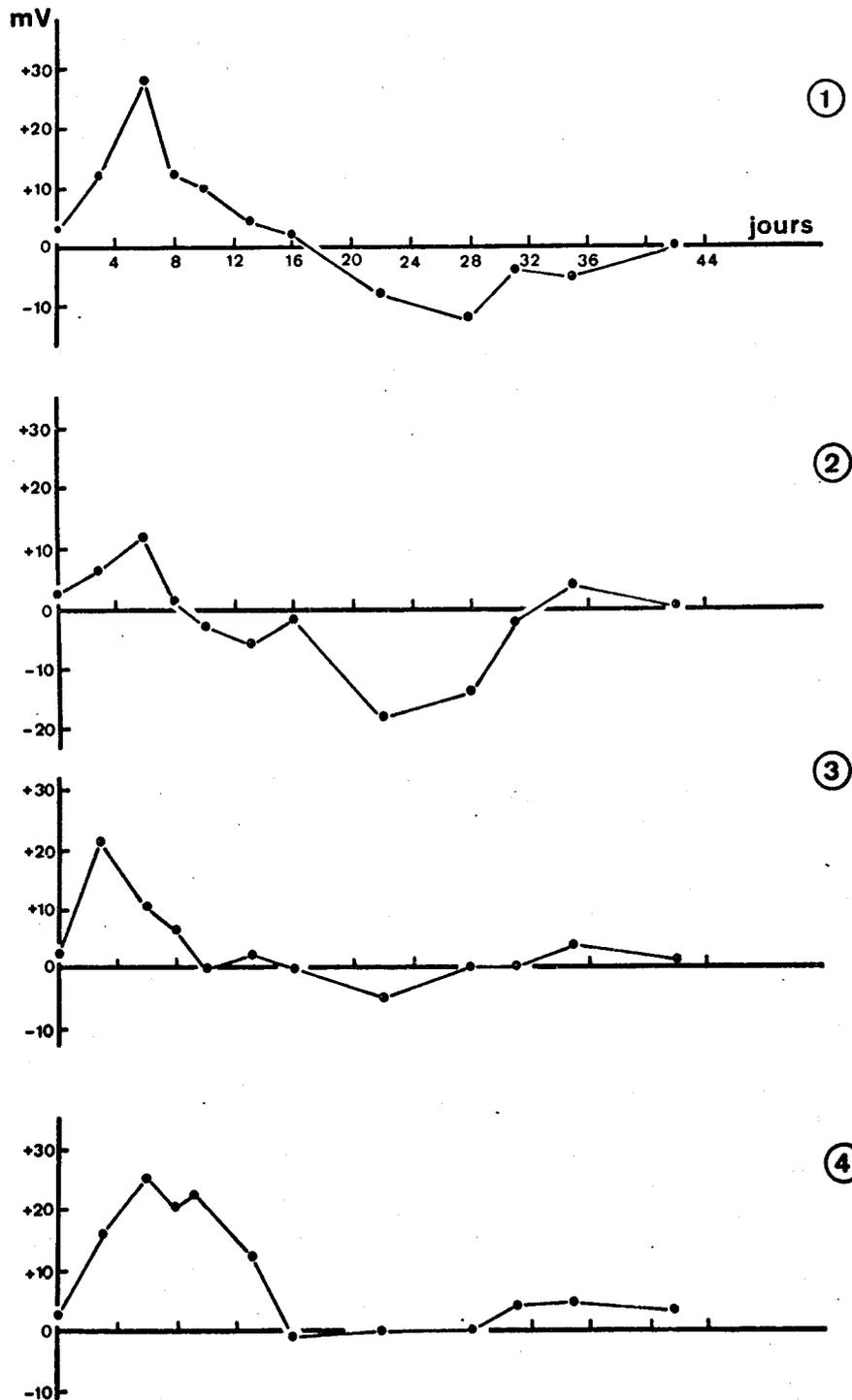


Figure 48 : Exemples d'évolution des PS au cours de la régénération de membres de quatre Pleurodèles différents.



Il apparaît que l'amplitude et la durée des phases positives et négatives sont très variables d'un membre à l'autre ; ainsi, la phase positive dont l'amplitude maximale varie entre + 12 mV (cas n° 2) et + 28 mV (cas n° 1) peut être atteinte au bout de trois (cas n° 3) à six jours (cas n° 1, 2, 4) et sa durée totale s'échelonne entre huit (cas n° 2) à seize jours (cas n° 1, 3, 4). De même, la phase négative présente parfois une amplitude très élevée (- 18 mV pour le cas n° 2) mais peut être aussi très faible (cas n° 3) voire même inexistante (cas n° 4), sa durée variant entre douze (cas n° 3) et vingt-deux jours (cas n° 2). Aucune relation n'a pu être décelée entre l'amplitude de ces diverses phases et la vitesse de régénération.

L'étude parallèle des remaniements histologiques révèle que la cicatrisation intervient rapidement ; huit heures après l'amputation, la migration épidermique est déjà très avancée (Pl. XI, Fig. 1) et vingt-quatre heures plus tard, la plaie est recouverte de plusieurs couches de cellules (Pl. XII, Fig. 1). L'épiderme présente alors un aspect indifférencié (Pl. XI, Fig. 2). La différenciation réapparaît très rapidement ; trois à quatre jours plus tard, la couche kératinisée se reconstitue (Pl. XI, Fig. 3) mais à ce stade l'épiderme présente encore une perméabilité passive très élevée (visualisée par le lanthane, Pl. XI, Fig. 4). Sous l'épiderme, les premiers signes de dégénérescence tissulaire apparaissent : l'os est considérablement érodé, les tissus mous sont envahis par les vaisseaux sanguins et par des languettes épidermiques (Pl. XII, Fig. 2), celles-ci contribuant à la phagocytose (SINGER et coll., 1961) des cellules lésées. Dix à quatorze jours après l'amputation (Pl. XII, Fig. 3 et 4), la phase de dégénérescence tissulaire s'achève et les parties distales des tissus sectionnés se dédifférencient. Les cellules mésenchymateuses qui résultent de cette dédifférenciation s'accumulent sous l'épiderme (Pl. XII, Fig. 5) et donnent naissance environ trois semaines après l'amputation à une masse de cellules homogènes (Pl. XII, Fig. 6) constituant le blastème. Ce dernier s'accroît en volume et en longueur jusqu'au quarantième jour environ puis commence à se différencier.

b - Membres cicatrisant une plaie

α Régénération d'un lambeau de peau sur la face dorsale d'un membre de Pleurodèle

La Figure 49 représentant trois exemples de variations

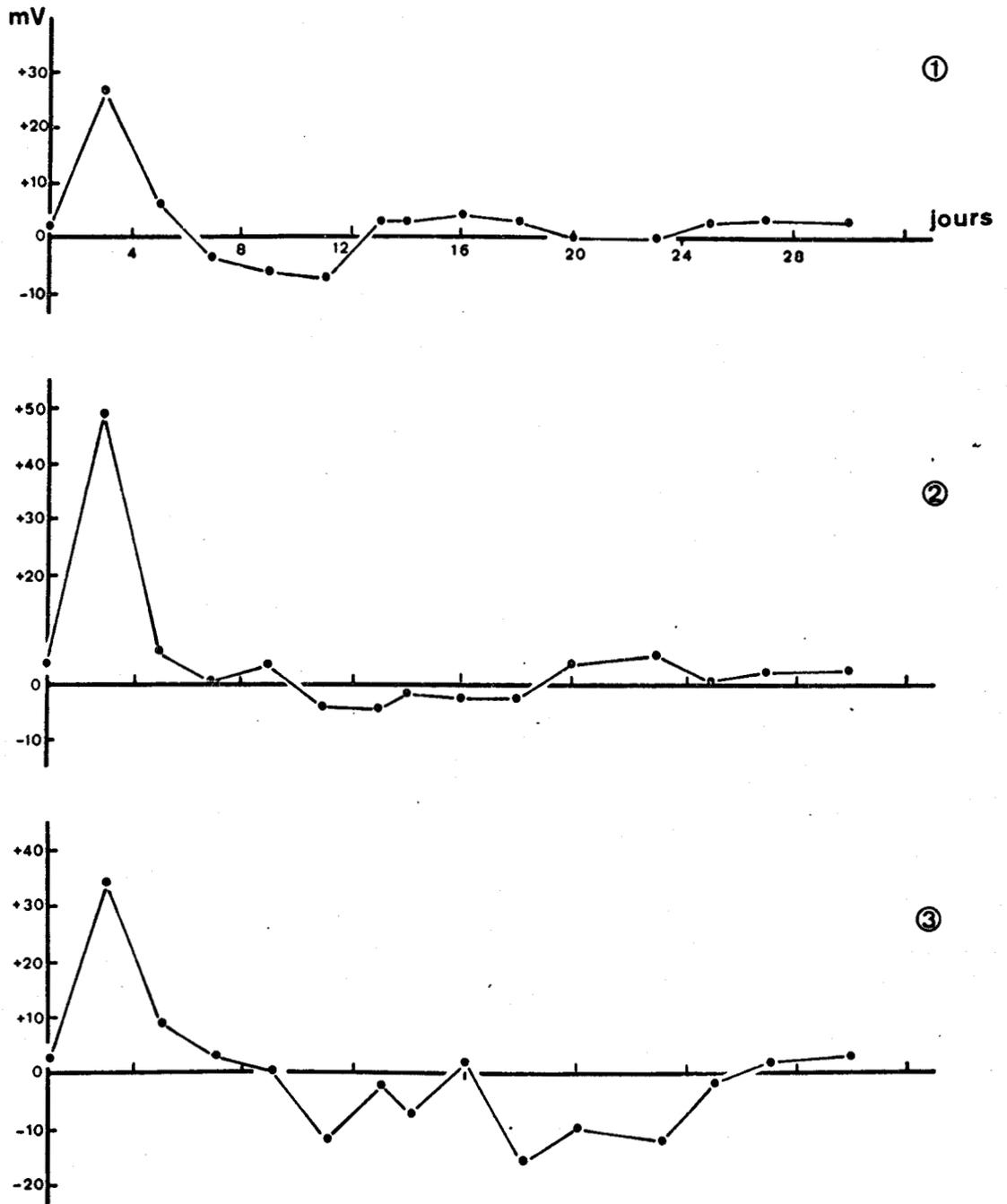


Figure 49 : Evolution des PS au cours de la cicatrisation de lambeaux de peau sur la face dorsale de trois Pleurodèles différents.



de PS au cours de la régénération d'un lambeau de peau de Pleurodèle montre que l'évolution des PS est identique à celle observée sur l'extrémité d'un membre en régénération. La phase positive initiale dure environ dix jours, puis la phase négative d'amplitude variable selon les cas (faible pour le cas n° 2, plus élevée pour le cas n° 3) s'installe pour une durée comprise entre huit (cas n° 1) à dix huit jours (cas n° 3). Si pendant cette phase négative au lieu de mesurer uniquement la ddp existant entre la zone de cicatrisation et les tissus sains environnants, ou enregistre le profil des PS présents le long de l'axe proximo-distal, la zone de cicatrisation apparaît nettement (Fig. 50) sous la forme d'une déflexion négative. Enfin, au bout de quinze à vingt-cinq jours, la polarité initiale de la région lésée se rétablit.

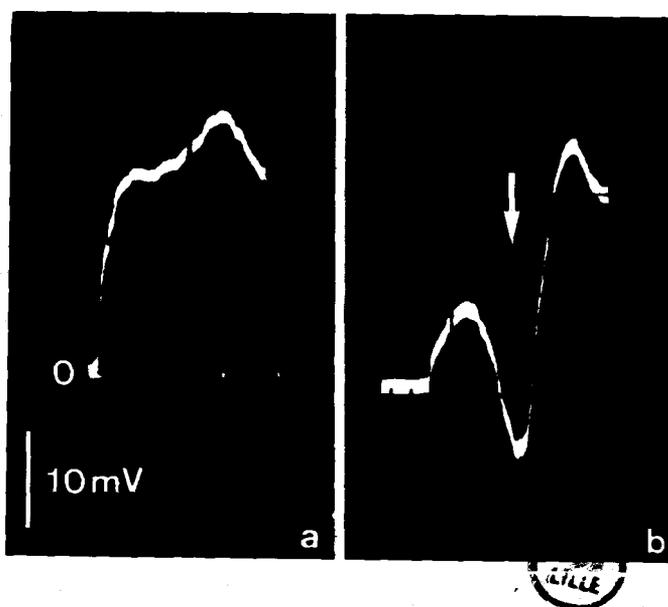


Figure 50 : Modification du gradient de PS obtenue au cours de la cicatrisation d'une plaie située dans la région moyenne de la face dorsale d'un membre de Pleurodèle.
a - profil de PS du membre normal ;
b - profil de PS enregistré 10 à 15 jours après l'excision du lambeau de peau. Pendant cette phase, la zone de cicatrisation est négative par rapport aux régions environnantes. Elle se traduit sur le profil de PS par l'apparition d'une déflexion (↓) négative.

β Cicatrisation de membres de Pleurodèles irradiés ou dénervés

Les membres de Pleurodèles dont les capacités régénératrices ont été bloquées soit par les rayons X soit par la section des nerfs brachiaux montrent la même évolution des PS que celle

décrite précédemment sur les membres normaux amputés (Fig. 51 et 52). Sur le plan histologique, la cicatrisation correspond à la fermeture de la plaie, à la phagocytose des tissus lésés et à l'érosion des parties distales des tissus de la souche.

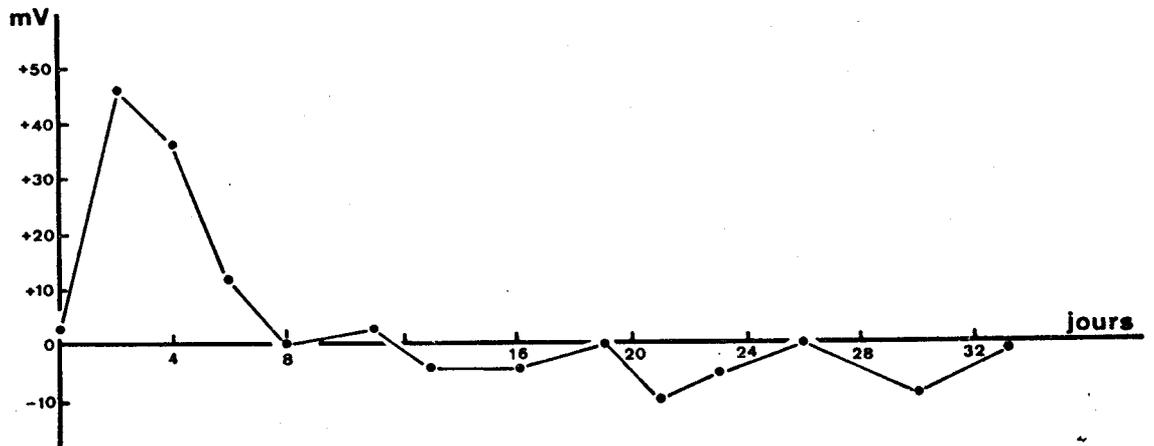


Figure 51 : Evolution des PS au cours de la cicatrisation d'un membre irradié de Pleurodèle.

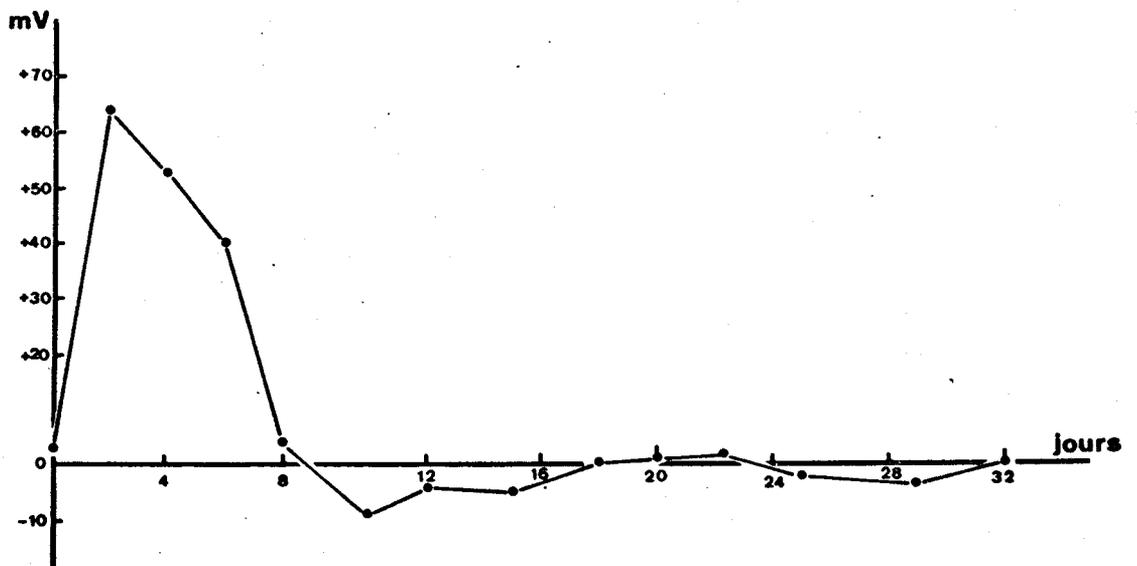


Figure 52 : Evolution des PS au cours de la cicatrisation d'un membre dénervé de Pleurodèle.

γ Cicatrisation de membres de Grenouille

Chez la Grenouille comme chez le Triton, l'amputation du membre est également suivi par l'apparition d'une phase positive (Fig. 53) dont l'amplitude maximale atteinte vers le cinquième jour est cependant plus importante (+ 60 à + 70 mV) que celle observée chez le Pleurodèle (+ 12 à + 30 mV). Très rapidement, la positivité décroît et à partir du dixième jour après l'amputation, les PS reviennent lentement, en subissant quelques fluctuations d'amplitude, à leur valeur initiale jusqu'à la cicatrisation complète du membre. La phase négative n'a pas été observée chez les animaux que nous avons utilisés.

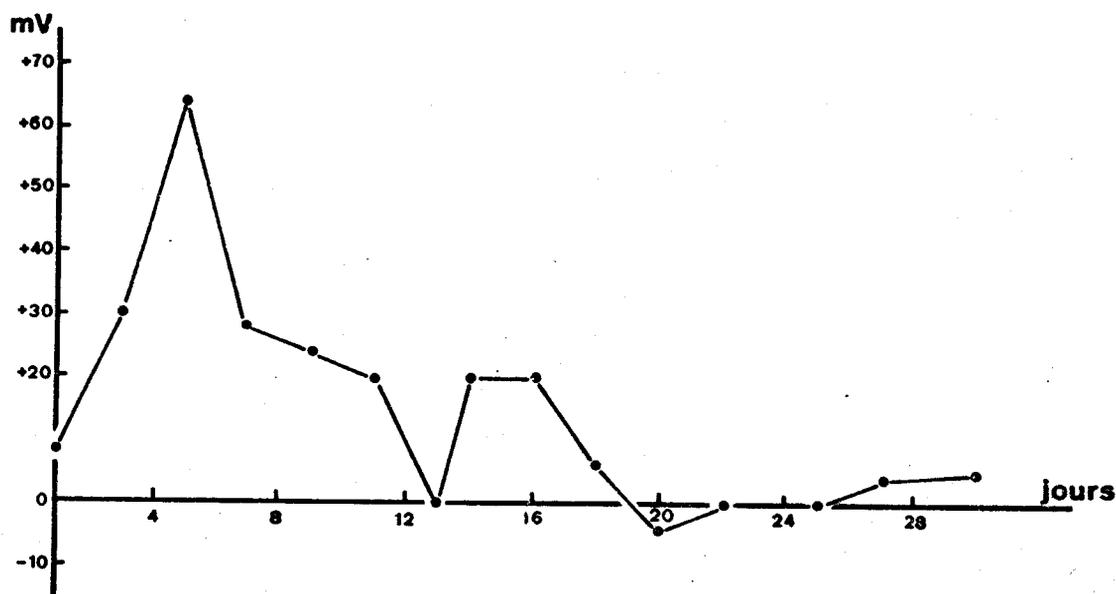


Figure 53 : Evolution des PS au cours de la cicatrisation d'un membre de Grenouille (*Rana esculenta*).

3 - DISCUSSION

Nos résultats montrent que :

1. La régénération de l'extrémité distale de membres normaux de Pleurodèle est accompagnée d'une modification des PS. L'évolution de ces derniers est caractérisée par l'apparition successive de deux phases de durée équivalente mais de polarité opposée.

La première phase positive correspond sur le plan histologique à la fermeture de la plaie, à la phagocytose des tissus lésés et au début de la dédifférenciation cellulaire. Sa présence a été constatée dans tous les cas étudiés. La seconde phase négative correspond à la fin de la dédifférenciation, à l'édification et à la croissance du blastème. Sa présence n'est pas régulière.

2. La régénération des animaux témoins qui est en fait limitée à la cicatrisation d'une plaie (fermeture de la plaie, phagocytose des tissus lésés et début de différenciation) présente une évolution identique des PS.

Ces derniers résultats permettent d'affirmer que les modifications des PS observées sur les membres en régénération sont entièrement attribuables aux processus de réparation épidermique consécutifs à l'amputation et non aux mécanismes conduisant à l'édification et à la croissance d'un blastème de régénération comme le suggérait BECKER (1961 a). Compte-tenu des résultats que nous avons obtenus sur l'origine des PS, il est relativement aisé d'établir une relation entre l'évolution des PS au cours de la régénération et l'état physiologique de l'épiderme. L'augmentation de la positivité qui apparaît immédiatement après la section correspond à l'enregistrement simultanée de deux types de potentiel : - les potentiels transépithéliaux existant entre le milieu externe (négatif) et le milieu interne (positif) de la peau, ce dernier étant rendu accessible à l'électrode d'enregistrement par l'écoulement des liquides internes ; - les potentiels de lésion qui apparaissent entre la région saine et la région lésée, la partie lésée étant négative par rapport à la partie saine ; dans ces conditions l'électrode posée sur le front de section du membre enregistre la résultante de ces potentiels de polarité opposée.

Quelques jours plus tard (sixième jour généralement), lorsque les processus de cicatrisation ont progressé, les potentiels de lésion n'interviennent plus : comme à ce moment l'épiderme de cicatrisation est encore très perméable, seul le potentiel transépithélial (positif) est enregistré. Dans ces conditions, les PS atteignent un maximum de positivité. Progressivement, l'épiderme réacquiert une structure normale, isole le milieu interne du

milieu externe ; la perméabilité passive et, par conséquent, la positivité diminuent et il est vraisemblable que pendant quelques jours, la perméabilité devient inférieure à celle de la peau bordant la plaie, lorsque les PS de la zone en régénération sont négatifs. Finalement, la perméabilité initiale se rétablit lorsque la cicatrisation est achevée.

La comparaison de nos résultats avec ceux décrits dans la littérature montre dans l'ensemble de nombreuses similitudes. La phase positive initiale en particulier a été signalée par tous les auteurs, seule l'interprétation qui en a été donnée varie d'un auteur à l'autre. En effet, BECKER (1961 a) attribue la positivité qui suit l'amputation à un arrêt du flux d'électrons qui circulerait dans les nerfs brachiaux tout en excluant l'intervention des potentiels de lésion ; MONROY (1941) donne une interprétation plus proche de la nôtre puisque pour cet auteur, la phase positive correspond au potentiel de lésion provoqué par l'amputation. Très récemment, BORGENS et coll. (1977b) ont proposé une interprétation en tous points identique à la nôtre. Quant à la phase négative, sa présence plus ou moins constante comme en témoignent les enregistrements obtenus chez la Grenouille et chez certains Pleurodèles explique qu'elle soit signalée très irrégulièrement par les différents auteurs et qu'elle n'ait donné lieu à aucune tentative d'interprétation ; ainsi MONROY ne la décrit pas, BORGENS et coll. (1977b) la signalent comme épisodique, BECKER (1961 a) la décrit uniquement chez les Tritons ; seuls ROSE et ROSE (1974) constatent son existence régulière à la fois chez les Tritons en régénération et chez ceux dont la régénération a été bloquée par les rayons X ou la dénervation. Cette phase négative que BECKER (1961 a) avait attribué à la croissance et à la différenciation du blastème apparaît en définitive comme très aléatoire et indépendante de la présence d'un blastème.

CONCLUSION

Les modifications de PS qui interviennent au cours de la régénération des membres de Pleurodèles apparaissent liées à la cicatrisation épidermique. Bien que recouvrant très rapidement la plaie, l'épiderme de cicatrisation présente une perméabilité passive

très élevée pendant quelques jours ; l'extrémité distale du membre est alors positive par rapport à sa région immédiatement proximale. Puis la perméabilité revient à sa valeur initiale ou même devient pendant quelque temps, un peu inférieure à celle de l'épiderme non lésé ; l'extrémité du membre est alors négative par rapport à la souche.



CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE

Les PS ont été étudiés au cours des étapes importantes qui marquent la vie des Amphibiens, la métamorphose et la mue et au cours des processus de morphogenèse régénératrice qui suivent l'amputation d'un membre. Tous ces événements biologiques ont en commun la mise en place d'une réorganisation épidermique conduisant à une modification de la perméabilité extracellulaire et donc des PS.

Au cours de la métamorphose expérimentale de l'*Axolotl*, les PS apparaissent lorsque l'épiderme a perdu ses caractéristiques larvaires et qu'il présente une structure adulte typique (douze jours après le début de l'expérimentation). L'apparition d'un profil de PS identique à celui observé chez le *Pleurodèle* coïncide avec la cyclisation de la mue. Ces phénomènes s'expliquent par le développement de l'activité ATPasique nécessaire à la création d'une ddp transépithéliale et à la mise en place progressive de la régionalisation de ces ddp transépithéliales.

Au cours de la mue, les PS subissent des modifications importantes ; alors que l'extrémité distale du membre est positive au cours des intermues, le jour de la mue lorsque la couche kératinisée est rejetée, la polarité s'inverse brusquement et l'extrémité distale devient négative par rapport à la région proximale. La mise en place progressive de nouvelles "tight-junctions" au niveau de la couche cellulaire située sous la nouvelle couche kératinisée provoque des perturbations temporaires de la perméabilité extracellulaire de l'épiderme qui expliquent les modifications de PS.

Au cours de la régénération des membres, les PS présentent une évolution caractérisée par la succession de deux phases, l'une positive, l'autre négative. La phase positive apparaît immédiatement après l'amputation, atteint un maximum d'amplitude quelques jours plus tard, puis décroît rapidement pour s'annuler environ quinze jours après l'amputation. Bien que son amplitude soit variable, la présence de cette phase est constante. La phase négative qui suit la phase positive dure environ quinze jours mais sa présence n'est pas régulière et aucun lien apparent n'a pu être décelé entre la régénération et cette phase négative. Les modifications de ces PS sont en fait attribuables aux processus de réparation épidermique qui surviennent après l'amputation, l'évolution des PS étant identique lors de la cicatrisation de membre dont la régénération a été bloquée par dénervation ou irradiation X ou lors de la cicatrisation de plaies concernant la face dorsale du membre. La phase positive correspond à une période où l'épiderme de cicatrisation est très perméable au milieu externe, la phase négative à celle où l'épiderme devient temporairement moins perméable que l'épiderme environnant.

Les PS représentent donc la manifestation externe des changements qui affectent la structure et la physiologie de l'épiderme. Ils constituent une approche rapide permettant de localiser les variations qui affectent les relations existant entre le milieu interne de l'animal et le milieu externe.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'étude de l'évolution des potentiels de surface au cours de la régénération ou de la cicatrisation de membres amputés d'Amphibiens ainsi que l'augmentation des capacités régénératrices des membres de Grenouilles par les courants électriques avaient conduit un certain nombre d'auteurs à attribuer à ces potentiels de surface un rôle important dans la régénération d'autant plus que le système nerveux en avait été considéré comme le support tissulaire.

L'ambiguïté de certains résultats notamment de ceux ayant trait à l'origine des potentiels de surface nous a amené à reprendre ces travaux en considérant tout particulièrement la signification des potentiels de surface présents le long de l'axe proximo-distal du membre antérieur de *Pleurodeles waltlii*. Nous avons constaté que :

- dans la majorité des cas (86 %) l'extrémité distale du membre d'individus adultes est positive ($+ 12,5 \pm 6$ mV) par rapport à sa région proximale mais que les membres de larves de Pleurodèles ou d'Axolotl sont complètement dépourvus de potentiels de surface ;

- la dénervation du membre n'entraîne pas la disparition des potentiels de surface contrairement à ce qui avait été rapporté (BECKER, 1961 a);

- seule l'absence de l'épiderme provoque l'abolition totale des potentiels de surface ;

- la lésion de la peau ou de l'épiderme seul provoque l'apparition d'une forte positivité au niveau de la région blessée ;

- l'augmentation de la pression osmotique du milieu externe entraîne l'apparition d'une positivité élevée au niveau de la zone traitée ;

- les modifications de la composition ionique du milieu externe qui affectent le fonctionnement et les caractéristiques bioélectriques du tégument des Amphibiens provoquent des modifications corrélatives des potentiels de surface.

L'analyse des résultats obtenus chez le Pleurodèle, nous a permis de considérer que les potentiels de surface résultent d'une régionalisation des ddp transépithéliales le long de l'axe proximo-distal du membre. Cette hypothèse a été vérifiée en mesurant tant *in vivo* qu'*in vitro* les potentiels transépithéliaux des régions proximale et distale. Ces mesures ont révélé que la région distale (dans le cas d'un gradient de potentiel de surface positif) possède une ddp transépithéliale plus faible que celle de la région proximale. Les mécanismes qui président à l'expression de cette régionalisation des ddp transépithéliales ont été analysés d'une part, par la mesure de l'activité ATPasique liée au Na-K qui traduit l'intensité du flux actif d'ions du milieu externe vers le milieu interne et d'autre part, par l'étude de la perméabilité passive extracellulaire du tégument à l'aide d'un traceur visible au microscope électronique (le lanthane), l'action combinée de ces deux facteurs (perméabilité active liée à l'activité ATPasique et perméabilité passive extracellulaire) donnant naissance à la ddp transépithéliale. Nous avons ainsi pu montrer que les potentiels de surface résultent de la perméabilité différentielle des "tight-junctions" le long de l'axe proximo-distal du membre, la région distale habituellement positive étant globalement la plus perméable.

L'origine des potentiels de surface n'est donc pas liée au système nerveux mais à un gradient de perméabilité des jonctions cellulaires le long de l'axe proximo-distal du membre.

Compte-tenu de cette origine des potentiels de surface, nous avons pu expliquer les modifications de potentiel survenant au cours de divers évènements tels que la métamorphose, la mue et la régénération.

La métamorphose correspond au moment où les potentiels de surface apparaissent en raison du développement de l'activité

ATPasique de l'épiderme jusqu'alors faible, celle-ci étant indispensable à l'établissement des potentiels transépithéliaux dont la régionalisation donne naissance aux potentiels de surface.

La mue qui se traduit par l'élimination périodique de la couche kératinisée aboutit à la mise en place progressive de nouvelles "tight-junctions" au niveau de la première couche de cellules vivantes ; elle entraîne des perturbations importantes de la perméabilité extracellulaire et par voie de conséquence des potentiels de surface (disparition des potentiels de surface ou inversion de la polarité électrique du membre).

La régénération provoque des modifications des potentiels de surface, celles-ci relevant uniquement des processus de cicatrisation épidermique consécutifs à l'amputation. Les mécanismes de cicatrisation entraînent en effet une augmentation passagère de la perméabilité extracellulaire de l'épiderme conduisant à l'apparition d'une positivité importante au niveau du moignon. Cette positivité disparaît lorsque l'épiderme de cicatrisation réacquiert une structure identique à celle de l'épiderme environnant. Dans certains cas, la région en cours de cicatrisation devient négative immédiatement après la disparition de la phase positive lorsque la perméabilité de cette région est inférieure à celle de la souche.

Cette étude qui a permis d'élucider les mécanismes qui donnent naissance aux potentiels de surface et d'apprécier les interactions existant entre ce paramètre bioélectrique et divers états biologiques, posent un certain nombre de problèmes. Ils concernent :

- les causes de la différenciation proximo-distale de la perméabilité des "tight-junctions" (responsable de l'apparition des potentiels de surface) ;

- la signification de ces potentiels de surface du membre normal dans la vie de l'animal ;

- le rôle éventuel de ces potentiels de surface dans la régénération du membre.

Nous examinerons successivement chacun de ces problèmes et tenterons d'apporter des éléments de réponses à chacune des questions soulevées.

1 - Mécanismes à l'origine de la différenciation des "tight-junctions" le long de l'axe proximo-distal.

Bien que les mécanismes qui régissent la perméabilité des "tight-junctions" soient encore actuellement inconnus, l'une des observations que nous avons rapportées lors de l'étude de la cicatrisation de plaies épidermiques nous permet cependant d'envisager une explication des processus à l'origine de la perméabilité différentielle des "tight-junctions". Nous avons en effet constaté qu'il existe une relation entre la perméabilité des "tight-junctions" et l'âge des cellules, le tissu épidermique qui participe à la cicatrisation (cellules jeunes) étant souvent pendant deux à trois semaines (voir Fig. 50) moins perméable au milieu externe que les tissus environnants (cellules plus âgées). Cette observation permet de supposer qu'au niveau du membre normal, la région proximale où la perméabilité des "tight-junctions" est la plus faible serait constituée de cellules plus jeunes que celles de la région distale qui présente une perméabilité plus élevée, les "tight-junctions" de cette région étant plus lâches vraisemblablement en raison des modifications affectant les caractéristiques des surfaces cellulaires. L'hypothèse de l'existence d'un tel gradient de cellules d'âge différent le long de l'axe proximo-distal du membre semble corroborée par les résultats de travaux récents (LHEUREUX, communication personnelle) concernant le comportement de l'épiderme de Pleurodèle. Cet auteur a pu constater en effet, par marquage cellulaire, que la nappe cellulaire épidermique des membres glisse apparemment de manière continue à la surface du derme de la région proximale vers la région distale. L'existence de cette migration longitudinale de la nappe épidermique implique que les cellules de la région proximale du membre sont plus jeunes que celles de la région distale. Il conviendra cependant d'apprécier cette différenciation cellulaire proximo-distale par la mesure des caractéristiques physiques et

chimiques des surfaces cellulaires épidermiques (étude quantitative des charges de surfaces par électrophorèse de cellules, détection des groupes portant les charges de surface à l'aide de marqueurs tels que les lectines et la ferritine cationisée).

Ce phénomène de migration cellulaire proximo-distal peut être rapproché de celui décrit chez les Hydres. En effet, chez ces Coelentérés, la région sous-hypostomale est le siège d'une activité mitotique qui permet le renouvellement progressif de toutes les cellules du corps, les cellules les plus âgées étant éliminées au niveau de la région distale (BRIEN, 1953 ; CORFF, 1973). La similitude de dynamique cellulaire existant entre celle constatée chez l'Hydre et celle observée chez le Pleurodèle se traduit sur le plan bioélectrique par une similitude des gradients de potentiel de surface tant du point de vue de leur amplitude que de leur polarité. En effet, les Hydres sont les seuls Invertébrés (voir revue dans LASSALLE, 1977 a) qui possèdent des potentiels de surface de valeur élevée et proche de celle des Amphibiens (MACKLIN, 1971), la région distale (base) étant positive (+ 17 ± 6 mV) par rapport à la région proximale (région orale). L'origine de cette polarisation électrique de l'Hydre n'est pas connue et à cet égard, il sera nécessaire d'étudier la perméabilité des jonctions septées le long du corps ; ces jonctions chez les Invertébrés jouent en effet le même rôle que les "tight-junctions" des Vertébrés (STAEHELIN, 1974 ; FILSHIE et FLOWER, 1977 ; WOOD, 1977).

2 - Signification des potentiels de surface du membre normal.

Les potentiels de surface, correspondent à la différence de perméabilité passive existant entre la région proximale et la région distale du membre, cette dernière étant la plus perméable. On peut envisager que cette différence de perméabilité traduit une adaptation du tégument au mode de vie de ces animaux. Les Tritons et les Grenouilles que nous avons utilisés sont tous des Batraciens amphibies vivant, la plupart du temps, dans des endroits humides ne redevenant entièrement aquatiques qu'à l'époque de la reproduction.

Pendant leur activité terrestres, ces animaux ont à faire face au problème de la déshydratation, leur tégument n'étant pas adapté à ce mode de vie. La déshydratation doit donc être compensée par une réabsorption hydrique. L'extrémité des membres en contact permanent avec le sol humide sur lequel ces animaux vivent habituellement sera alors un lieu privilégié de réhydratation en raison de sa perméabilité élevée. Une telle interprétation peut parfaitement s'intégrer dans le cadre de la théorie de "l'adaptation phylogénétique du tégument des Amphibiens à leur environnement", théorie développée par BENTLEY et coll. (1972, 1976). Ces auteurs ont en effet constaté qu'il existe des différences de perméabilité passive hydrique dorso-ventrale chez divers Amphibiens adaptés à des habitats semi-aquatiques ou terrestres (*Rana pipiens*, *Bufo marinus*, *Hyla morei*) : la région pelvienne est celle qui présente la perméabilité la plus élevée, les régions pectorales et dorsales étant beaucoup moins perméables. Cette perméabilité préférentielle de la région pelvienne favoriserait la réhydratation des animaux à la suite des contacts fréquents de cette zone avec les surfaces humides du sol ; en outre, la perméabilité plus faible de la région dorsale limiterait la déshydratation par évaporation. Par contre, lorsque les Amphibiens ont une vie entièrement aquatique (*Xenopus laevis*), leur tégument ne présente pas de différenciation régionale particulière.*

Dans ces conditions, on peut considérer que les potentiels de surface correspondraient à une adaptation du tégument des Amphibiens à leur environnement.

3 - Rôle des potentiels de surface dans la régénération du membre

Un certain nombre d'auteurs tels que BECKER (1961 a), BORGENS, VANABLE et NUCCITELLI (1977 b), JAFFE et NUCCITELLI (1977) ont proposé une théorie selon laquelle les potentiels de surface

* Nous avons d'ailleurs constaté que chez *Xenopus*, les membres antérieurs sont dépourvus de PS.

contrôleraient le développement et la régénération animales. Chez les Amphibiens en particulier, cette hypothèse repose sur l'observation des modifications des potentiels de surface au cours de la régénération et sur la possibilité de contrôler celle-ci par l'application de champs électriques. Si ces auteurs s'accordent pour admettre la nécessité de la présence d'une ddp, leurs interprétations divergent cependant quant à la polarité requise pour obtenir le déclenchement et le contrôle de la régénération. En effet, selon BECKER, la période essentielle est constituée par la phase négative qui survient six à dix jours après l'amputation puisque cette phase n'est observée que sur les membres de Tritons en régénération et jamais sur les membres amputés de Grenouille. L'absence de cette phase négative entraînerait l'absence de régénération. Par contre, BORGENS et coll. considèrent que la phase initiale positive est la seule indispensable à la régénération. Cette hypothèse repose sur l'interprétation de la stimulation des capacités régénératrices obtenues après application de champs électriques ; ceux-ci agiraient en mimant l'action des potentiels de surface qui apparaissent après l'amputation et au cours de la régénération des membres de Tritons (positifs pendant les dix à quinze premiers jours suivant l'amputation).

Certains des résultats que nous avons obtenus, nous conduisent à mettre en doute de telles interprétations. Ces résultats concernent d'une part, la similitude d'évolution des potentiels de surface au cours de la régénération et de la cicatrisation des membres de Pleurodèle et de Grenouille et d'autre part, l'absence de potentiels de surface chez les larves.

L'hypothèse de BECKER (phase négative indispensable) ne peut être retenue puisque nous avons montré que cette phase est aléatoire et que le déroulement de la régénération n'est absolument pas altéré (chez le Pleurodèle) lorsque cette phase n'existe pas. BORGENS et coll. (1977 b) chez *Triturus viridescens* ont d'ailleurs abouti aux mêmes conclusions. De plus, cette phase négative, quand elle existe, survient également au niveau de plaies ou de membres de Pleurodèle en cours de cicatrisation c'est-à-dire

indépendamment de tout processus morphogénétiques. Dans ces conditions, nous pouvons conclure que la présence d'une phase négative n'apparaît en aucune façon indispensable au déroulement de la régénération.

La seconde interprétation (BORGENS et coll.) ne peut être non plus retenue ; en effet, s'il est indéniable que les courants électriques comme d'ailleurs d'autres facteurs physiques ou chimiques (voir CARLSON, 1974 b) stimulent la régénération (voir LASSALLE, 1978) il n'est cependant pas possible d'utiliser ce résultat pour démontrer que les potentiels de surface sont nécessaires à la régénération comme le font BORGENS et coll. Ces auteurs estiment en effet que la régénération obtenue chez la Grenouille est due au fait que le champ électrique créé artificiellement au niveau du moignon, induit des courants identiques en amplitude et en polarité (+) à ceux mesurés pendant les premiers jours de régénération des membres de Tritons. Ces courants correspondent à la phase où les potentiels de surface du moignon de Pleurodèle sont positifs (Fig. 47). Or, nous avons montré que les Grenouilles présentent cette même phase positive après section du membre, l'amplitude étant même supérieure à celle observée chez le Pleurodèle. Dès lors, on comprend mal la nécessité de créer artificiellement chez la Grenouille, un courant qui existe déjà naturellement et qui devrait si les potentiels de surface jouaient le rôle que leur attribuent BORGENS et coll. provoquer la régénération du membre.

Notre argumentation se trouve en outre renforcée par le fait que l'absence de potentiels de surface chez l'*Axolotl* n'est en aucune manière préjudiciable à la mise en place des processus morphogénétiques conduisant à la régénération harmonieuse d'un membre. Cette ambiguïté qui avait déjà été relevée par FABER (1971) n'est pas un cas unique puisque les larves de Pleurodèles et les têtards de Grenouille qui sont dépourvus de gradient de potentiels de surface régénèrent également parfaitement. Cette observation suggère fortement que les potentiels de surface ne jouent pas de rôle dans la régénération des membres d'autant plus que l'apparition de ces potentiels au moment de la métamorphose est accompagnée chez les Anoures de la perte des capacités régénératrices et chez les Urodèles d'une diminution de la vitesse de régénération.

Les propriétés stimulatrices du courant électrique sur la régénération peuvent être interprétés indépendamment de la présence de potentiels de surface, en considérant la masse tissulaire soumise aux effets du champ électrique. Deux sites d'action possibles peuvent être envisagés, le milieu intercellulaire et les membranes cellulaires. Les liquides intercellulaires seront le siège, sous l'influence du courant électrique, d'une migration électrophorétique de leurs composés ionisés modifiant ainsi profondément l'environnement des cellules. Ces modifications du microenvironnement cellulaire peuvent alors engager les cellules dans une voie métabolique différente les conduisant à se multiplier activement. D'autre part, la membrane cellulaire que l'on sait être un relai important entre le milieu extérieur et le milieu intérieur peut également subir directement les effets du courant électrique vraisemblablement par la réorganisation spatiale des composés membranaires susceptibles de modifier la perméabilité cellulaire. Or, il a été montré que la valeur du potentiel transmembranaire qui reflète la perméabilité de la membrane contrôle l'activité mitotique (CONE, 1974).

L'étude des mécanismes qui déclenchent cette activité mitotique sous l'influence d'un champ électrique constitue un problème fondamental qu'il importera d'étudier puisqu'ils conditionnent l'édification du blastème, étape essentielle de la régénération du membre d'Amphibien.

BIBLIOGRAPHIE

B

- BECKER R.O., 1960 - The bioelectric field pattern in the Salamander and its simulation by an electric analog. I.R.E. Trans. med. electronics, ME-7, 202-207.
- BECKER R.O., 1961 a - The bioelectric factors in amphibian limb regeneration. J. Bone Joint Surg., 43 A, 643-656.
- BECKER R.O., 1961 b - Search for evidence of axial current flow in peripheral nerves of Salamander. Science, 134, 101-102.
- BECKER R.O., 1963 - The direct current field : a primitive control and communication system related to growth processes. Proc. XVIth Intl. Congress of Zool. Washington, 3, 179-184.
- BECKER R.O., 1972 a - Stimulation of partial limb regeneration in rats. Nature, 235, 109-111.
- BECKER R.O., 1972 b - Augmentation of regenerative healing in man. A possible alternative to prosthetic implantation. Clinical Orthop. Rel. Res., 83, 255-262.
- BECKER R.O., 1974 - The significance of bioelectric potentials. Bioelectrochem. Bioenerg., 1, 187-199.
- BECKER R.O., BACHMAN C.H., SLAUGHTER W., 1962 a - Longitudinal direct current gradients of spinal nerves. Nature, 196, 675-676.
- BECKER R.O., BACHMAN C.H., FRIEDMAN H., 1962 b - The direct current control system : a link between the environment and organism. N.Y. State J. Med., 62, 1169-1176.
- BECKER R.O., MURRAY D.G., 1967 - A method for producing cellular dedifferentiation by mean of very small electrical currents. N.Y. Acad. Sci., 29, 606-615.

- BECKER R.O., MURRAY D.G., 1970 - The electrical control system regulating fracture healing in Amphibians. *Clinical Orthopaedics*, 73, 169-198.
- BENTLEY P.J., 1975 - The electrical P.D. across the integument of some neotenus Urodèle Amphibians. *Comp. Biochem. Physiol.*, A, 50, 4 A, 639-644.
- BENTLEY P.J., HELLER H., 1964 - The action of neurohypophysial hormones on the water and sodium metabolism of Urodèle Amphibians. *J. Physiol.*, 171, 434-453.
- BENTLEY P.J., MAIN A.R., 1972 - Zonal differences in permeability of the skin of some anuran Amphibia. *Amer. J. Physiol.*, 223, 361-363.
- BENTLEY P.J., YORIO T., 1976 - The passive permeability of the skin of anuran Amphibia : a comparison of frogs (*Rana pipiens*) and toads (*Bufo marinus*). *J. Physiol.*, 261, 603-616.
- BODEMER C.W., 1964 - Evocation of regrowth phenomena in Anuran limbs by electrical stimulation of the nerve supply. *Anat. Rec.*, 148, 441-458.
- BORGENS R.B., VANABLE J.W. Jr., JAFFE L.F., 1977 a - Bioelectricity and regeneration. I. Initiation of frog limb regeneration by minute currents. *J. Exp. Zool.*, 200, 403-416.
- BORGENS R.B., VANABLE J.W. Jr., JAFFE L.F., 1977 b - Bioelectricity and regeneration. Large currents leave the stumps of regenerating newt limbs. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 4528-4532.
- BOULPAEP E.L., SEELY J.F., 1971 - Electrophysiology of proximal and distal tubules in the autoperfused dog kidney. *Amer. J. Physiol.*, 221, 1084-1086.

BRIEN P., 1953 - La perennité somatique. Biol. Rev. Cambridge, 28, 308-349.

BROWN A.C., 1962 - Current and potential of frog skin *in vivo* and *in vitro*. J. Cell Comp. Physiol., 60, 263-269.

BUDTZ P.E., LARSEN L.O., 1975 - Structure of the toad epidermis during the moulting cycle. II. Electron microscopic observations on *Bufo bufo* (L.). Cell Tissue Res., 159, 459-484.

C

CARLSON B.M., 1974 a - Morphogenetic interactions between rotated skin cuffs and underlying stump tissues in regenerating Axolotl forelimbs. Develop. Biol., 39, 263-285.

CARLSON B.M., 1974 b - Factors controlling the initiation and cessation of early events in the regenerative process. In Neoplasia and Cell Differentiation, Ed. Sherbet (London), 60-105.

CONE C.D. Jr., 1974 - The role of the surface electrical transmembrane potential in normal and malignant mitogenesis. Ann. N.Y. Acad. Sci., 238, 420-435.

CORFF S., 1973 - Organismal growth and the contribution of cell proliferation to net growth and maintenance of form, in Biology of Hydra, Acad. Press New York, Ed. A.L. Burnett, 346-388.

D

DROIN A., 1959 - Potentialités morphogènes dans la peau du Triton en régénération. Rev. Suisse Zool., 66, 641-709.

E

ERLIJ D., MARTINEZ-PALOMO A., 1972 - Opening of tight junctions in frog skin by hypertonic urea solutions. J. Mb. Biol., 9, 229-240.

F

FABER J., 1971 - Vertebrate limb ontogeny and limb regeneration : morphogenetic parallels. Adv. Morph., 9, 127-147.

- FARQUHAR M.G., PALADE G.E., 1964 - Functional organization of amphibian skin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 51, 569-577.
- FARQUHAR M.G., PALADE G.E., 1965 - Cell junctions in Amphibian skin. J. Cell Biol., 26, 263-291.
- FERREIRA K.G., FERREIRA H.G., LEW V.L., 1976 - On the amount of ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) ATPase available for transepithelial Na^+ transport in the Amphibian skin. Biochim. Biophys. Acta, 448, 185-188.
- FILSHIE B.K., FLOWER N.E., 1977 - Junctional structures in *Hydra*. J. Cell Science, 23, 151-172.
- FLICKINGER R.A., BLOUNT R.W., 1957 - The relation of natural and imposed electrical potentials and respiratory gradients to morphogenesis. J. Cell. Comp. Physiol., 50, 403-422.
- FONTAS B., MAMBRINI J., 1977 a - Existence de différences de potentiel superficielles chez *Rana esculenta*. Comptes Rendus Acad. Sci., 284, 2361-2364.
- FONTAS B., MAMBRINI J., 1977 b - Origine des différences de potentiel ciscutanées chez *Rana esculenta*. Comptes Rendus Acad. Sci., 285, 229-232.
- FRANCIS E.T.B., 1934 - The anatomy of the Salamander. London, Oxford Univ. Press.
- FRIEDENBERG Z.B., DYER R.H. Jr., BRIGHTON C.T., 1971 - Electro-osteograms of long bones of immature rabbits. J. Dent. Res., 50, 635-639.
- H
- HELMAN S.I., MILLER D.A., 1973 - Edge damage effect on electrical measurements of frog skin. Amer. J. Physiol., 225, 972-977.

HYMAN L.H., BELLAMY A.W., 1922 - Studies on the correlation between metabolic gradients, electrical gradients, and galvanotaxis. Biol. Bull., 43, 313-347.

J

JAFFE L.F., NUCCITELLI R., 1977 - Electrical controls of development. Ann. Rev. Biophys. Bioengin., 6, 445-476.

K

KAWADA J., TAYLOR R.E. Jr., BARKER S.B., 1969 - Measurement of Na-K-ATPase in the separated epidermis of *Rana catesbiana* frogs and tadpoles. Comp. Biochem. Physiol., 30, 965-975.

KOEFOED-JOHNSEN V., LEVI H., USSING H.H., 1952 - The mode of passage of chloride ions through the isolated frog skin. Acta Physiol. Scand., 25, 150-163.

KRISTENSEN P., 1972 - Chloride transport across isolated frog skin. Acta Physiol. Scand., 84, 338-346.

KURTZ I., SCHRANK A.R., 1955 - Bioelectrical properties of intact and regenerating earthworms, *Eisenia foetida*. Physiol. Zool., 28, 322-330.

L

LARSEN E., 1970 - Sodium transport and D.C. resistance in the isolated toad skin in relation to shedding of the stratum corneum. Acta Physiol. Scand., 79, 453-461.

LASSALLE B., 1974 - Origine épidermique des potentiels de surface du membre de Triton, *Pleurodeles waltlii* Michah. C. R. Acad. Sci., 278, 1055-1058.

- LASSALLE B., 1977 a - Les potentiels bioélectriques de surface dans la croissance et la régénération animales. Ann. Biol., 16, 343-370.
- LASSALLE B., 1977 b - Evaluation *in vitro* des potentiels de surface cutanés chez le Triton, *Pleurodeles waltlii* Michah. par la mesure des différences de potentiel transépithéliales. C. R. Acad. Sci., 285, 183-186.
- LASSALLE B., 1978 - Rôle des champs électriques sur la croissance et la régénération animales. Ann. Biol. (~~sous presse~~) 17, 147-168
- LASSALLE B. et BOILLY B., 1973 - Rôle du tube digestif dans la manifestation des potentiels de surface chez *Eisenia foetida* Sav. f. *typica* (Annélide Oligochète). C.R.Acad. Sci., 276, 3315-3318.
- LHEUREUX E., 1975 - Nouvelles données sur les rôles de la peau et des tissus internes dans la régénération du membre du Triton *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien Urodèle). Wilhelm Roux' Archiv., 176, 285-301.
- LOTE C.J., 1976 - Chloride transport in isolated frog (*Rana temporaria*) skin. Changes in short-circuit current, potential, resistance and chloride flux elicited by furosemide. Pflügers Archiv., 362, 181-184.
- LOWRY O.R., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., 1951 - Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.

M

- MACHEN T.E., ERLIJ D., WOODING F.B.P., 1972 - Permeable junctional complexes. The movement of lanthanum across rabbit gallbladder and intestine. J. Cell Biol., 54, 302-312.

- MACKLIN M., 1971 - The absence of electrically demonstrable polarizing factors in *Hydra*. J. Cell Physiol., 77, 83-92.
- MANDEL J.F., CURRAN P.F., 1972 a - Chloride flux via a shunt pathway in frog skin : apparent exchange diffusion. Biochim. Biophys. Acta, 282, 258-264.
- MANDEL L.J., CURRAN P.F., 1972 b - Response of the frog skin to steady-state voltage clamping. I. The shunt pathway. J. Gen. Physiol., 59, 503-518.
- MARTINEZ-PALOMO A., ERLIJ D., BRACHO H., 1971 - Localization of permeability barriers in the frog skin epithelium. J. Cell Biol., 50, 277-287.
- MARTINEZ-PALOMO A., ERLIJ D., 1973 - The distribution of lanthanum in tight-junctions of the kidney tubule. Pflüger Archiv., 343, 267-272.
- MILLS J.W., ERNST S.A., DiBONA D.R., 1977 a - Localization of Na⁺-pump sites in frog skin. J. Cell Biol., 73, 88-110.
- MILLS J.W., DiBONA D.R., 1977 b - On the distribution of Na⁺-pump sites in the frog skin. J. Cell Biol., 75, 968-976.
- MOMENT G.B., 1949 - On the relation between growth in length, the formation of new segments, and electric potential in an earthworm. J. Exp. Zool., 112, 1-12.
- MOMENT G.B., 1950 - On the electrical potentials of an earthworm, *Eisenia foetida*, considered in relation to growth. Proc. Amer. Phys. Soc., 94, 24-30.
- MONROY A., 1941 - Ricerche sulle correnti elettriche derivabili dalla superficie del corpo di Tritoni adulti normali e durante la rigenerazione degli arti e della coda. Publ. Stat. Zool. Napoli, 18, 265-281.

MOREL F., LEBLANC G., 1975 - Transient current changes and Na compartmentalization in the frog skin epithelium. Pflügers Archiv., 358, 135-157.

N

NAGEL W., 1976 - Intercellular junctions of frog skin epithelial cells. Nature, 264, 469-471.

NAGEL W., 1977 - The dependence of the electrical potentials across the membranes of the frog skin upon the concentration of sodium in the mucosal solution. J. Physiol., 269, 777-796.

NIELSEN R., 1969 - The effect of aldosterone *in vitro* on the active sodium transport and moulting of the frog skin. Acta Physiol. Scand., 77, 85-94.

R

RAWLINS F.A., GONZALEZ E., PEREZ-GONZALEZ M., WHITTEMBURY G., 1975 - Effect of transtubular osmotic gradients on the paracellular pathway in toad kidney proximal tubule. Electron microscopic observations. Pflügers Arch., 353, 287-302.

REVARDEL J.L., CHAPRON C., 1975 - Influence de la vascularisation sur la régénération de membres chez les larves d'Urodèles. Nouvelle interprétation du rôle du système nerveux. C.R.Acad. Sci., 280, 1409-1412.

REYNOLDS E.S., 1963 - The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17, 208-212.

ROSE S.M., ROSE F.C., 1974 - Electrical studies on normally regenerating, on X-rayed and on denervated limb stumps of *Triturus*. Growth, 38, 363-380.

S

- SCHULTZ S.G., FRIZZELL R.A., NELLANS H.N., 1977 - An equivalent electrical circuit model for "sodium-transporting" epithelia in the steady-state. *J. Theor. Biol.*, 65, 215-230.
- SHURALEFF résultats non publiés cités par THORNTON C.S., 1968 - Amphibian limb regeneration. *Adv. Morphog.*, 7, 205-249.
- SINGER M., 1954 - Induction of regeneration of the forelimb of post-metamorphic frog by augmentation of the nerve supply. *J. Exp. Zool.*, 126, 419-471.
- SINGER M., SALPETER M.M., 1961 - Regeneration in vertebrates : the role of the wound epithelium. In *Growth living Systems*, Ed. M.X. ZARROW et al., 277-311.
- SMITH S.D., 1967 - Induction of partial limb regeneration in *Rana pipiens* by galvanic stimulation. *Anat. Rec.*, 158, 89-98.
- SMITH S.D., 1974 - Effects of electrode placement on stimulation of adult frog limb regeneration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 238, 500-507.
- SMITH S.D., 1976 - The failure of static electrical charges to affect limb regeneration in adult *Notophthalmus viridescens*. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 3, 99-105.
- SMITH P.G., 1975 - Aldosterone-induced moulting in Amphibian skin and its effect on electrical capacitance. *J. Mb. Biol.*, 22, 165-182.
- STAEHELIN L.A., 1974 - Structure and function of intercellular junctions. *Int. Rev. Cytol.*, 39, 191-284.
- SVELTO M., PERRINI M.C.R., LIPPE C., 1975 - Permeability properties of frog skin at various degrees of edge damage. *Arch. int. Physiol. Bioch.*, 83, 837-844.

T

TASSAVA R.A., LOYD R.M., 1977 - Injury requirement for initiation of regeneration of newt limbs which have whole skin grafts. Nature, 268, 49-50.

TAYLOR R.E., BARKER S.B., 1965 - Transepidermal potential difference : development in anuran larvae. Science, 148, 1612-1613.

U

USSING H.H., 1965 - Relationship between osmotic reactions and active sodium transport in frog skin epithelium. Acta Physiol. Scand., 63, 141-155.

USSING H.H., ERLIJ D., LASSEN U., 1974 - Transport pathways in biological membranes. Ann. Rev. Physiol., 36, 17-49.

USSING H.H., WINDHAGER E.E., 1964 - Nature of shunt path and active sodium transport path through frog skin epithelium. Acta Physiol. Scand., 61, 484-504.

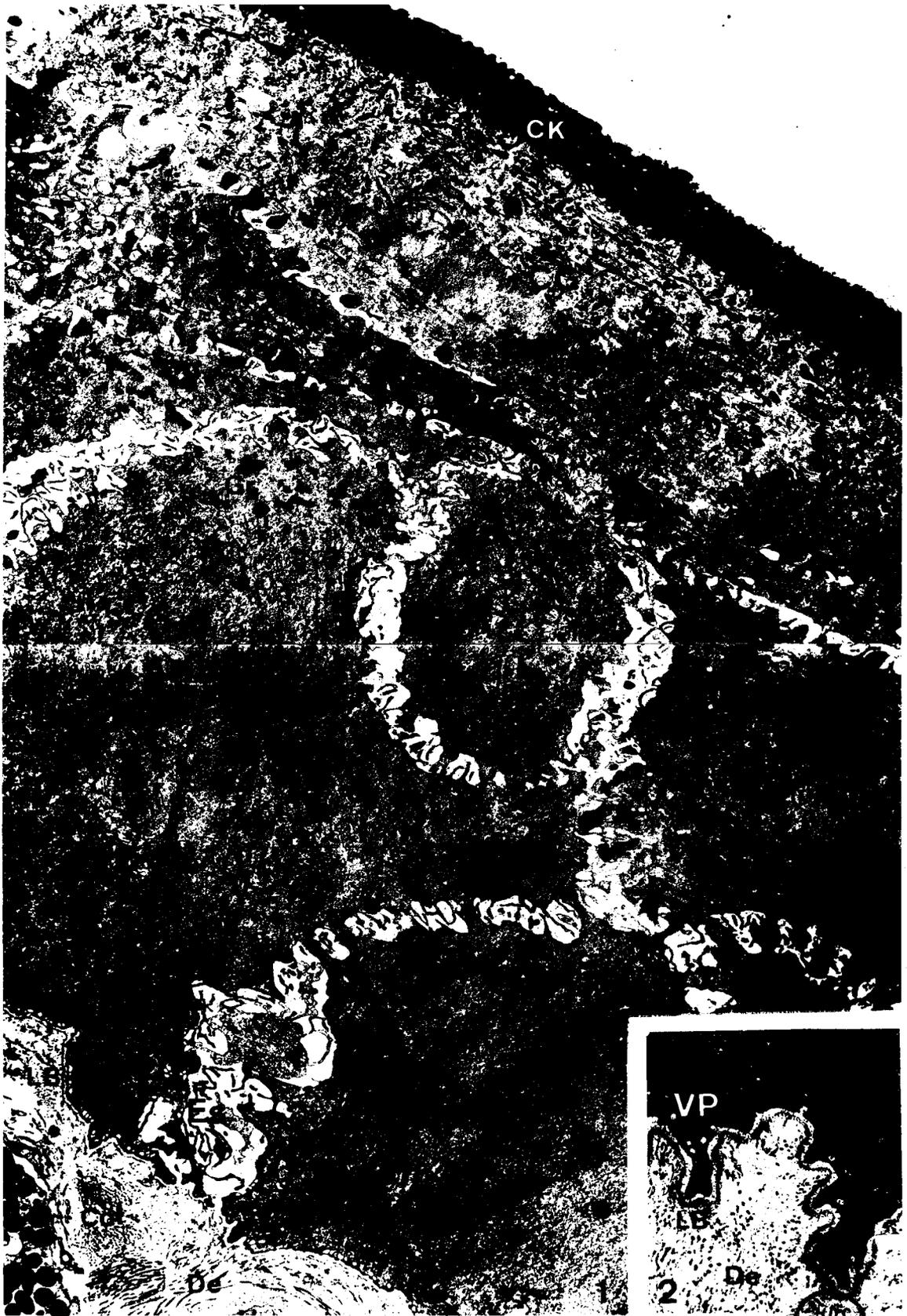
USSING H.H., ZERAHN K., 1951 - Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited, isolated frog skin. Acta Physiol. Scand., 23, 110-127.

V

VOUTE C.L., DIRIX R., NIELSEN R., USSING H.H., 1969 - The effect of aldosterone on the isolated frog skin epithelium (*R. temporaria*). Exptl. Cell Res., 57, 448-449.

W

WADE J.B., KARNOVSKY M.J., 1974 - Fracture faces of osmotically disrupted zonulae occludentes. J. Cell Biol., 62, 344-350.



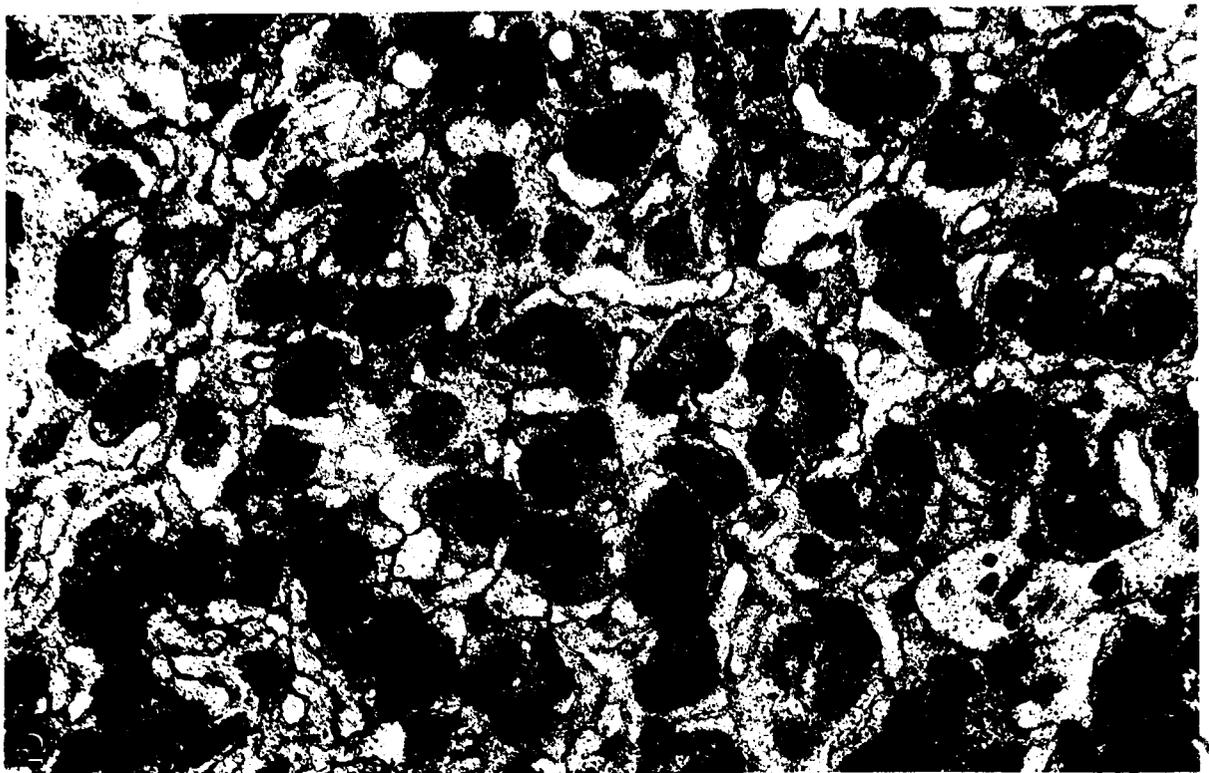
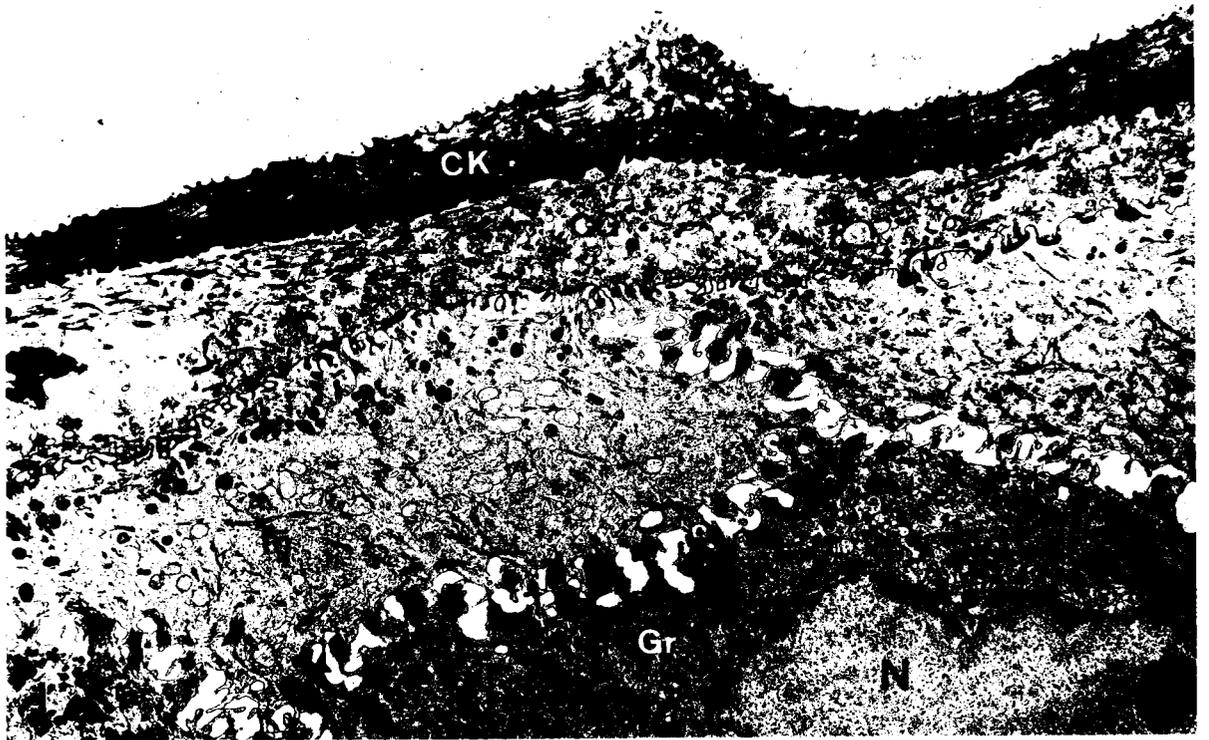
CK

VP

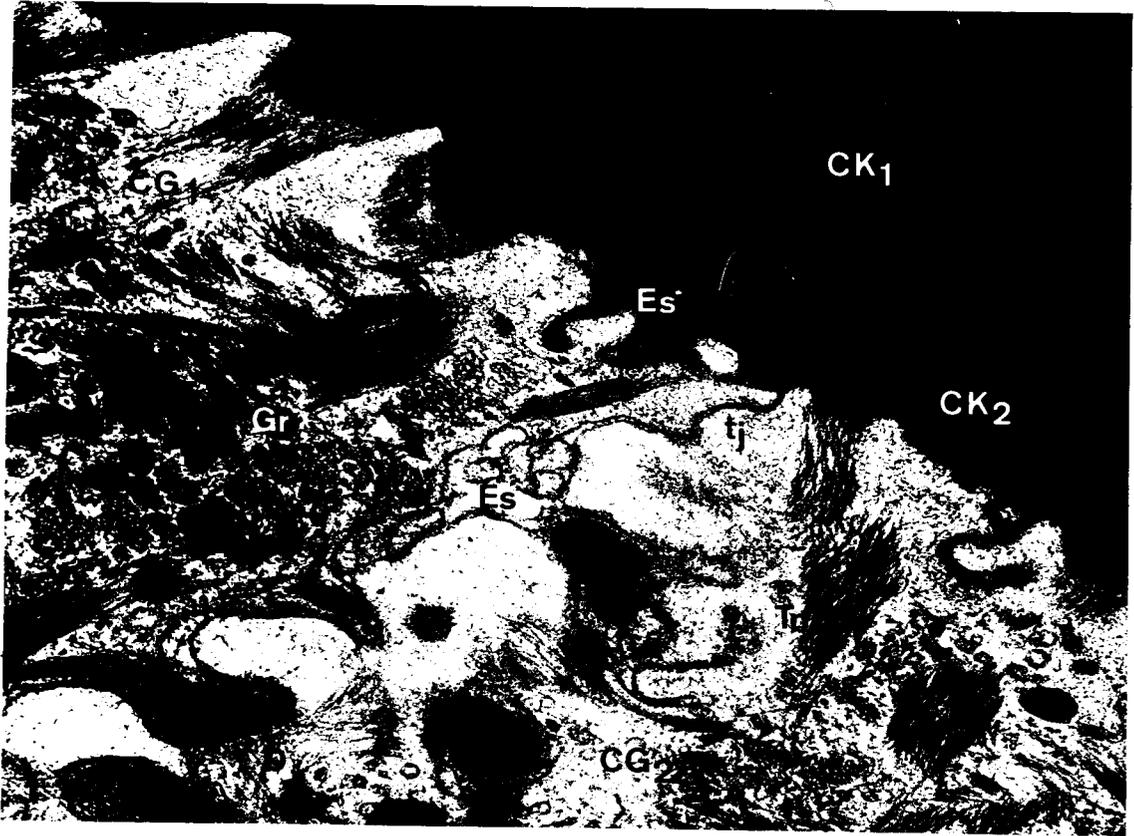
EB

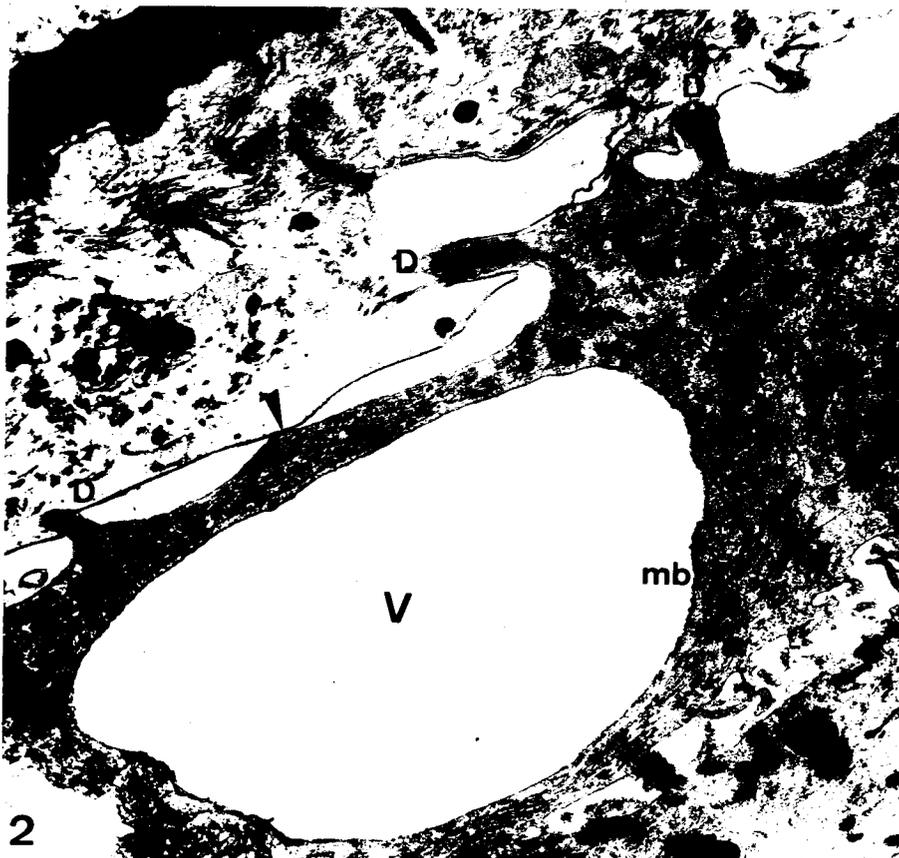
De





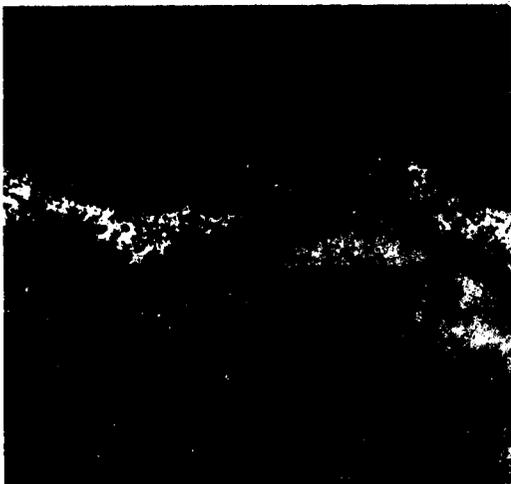
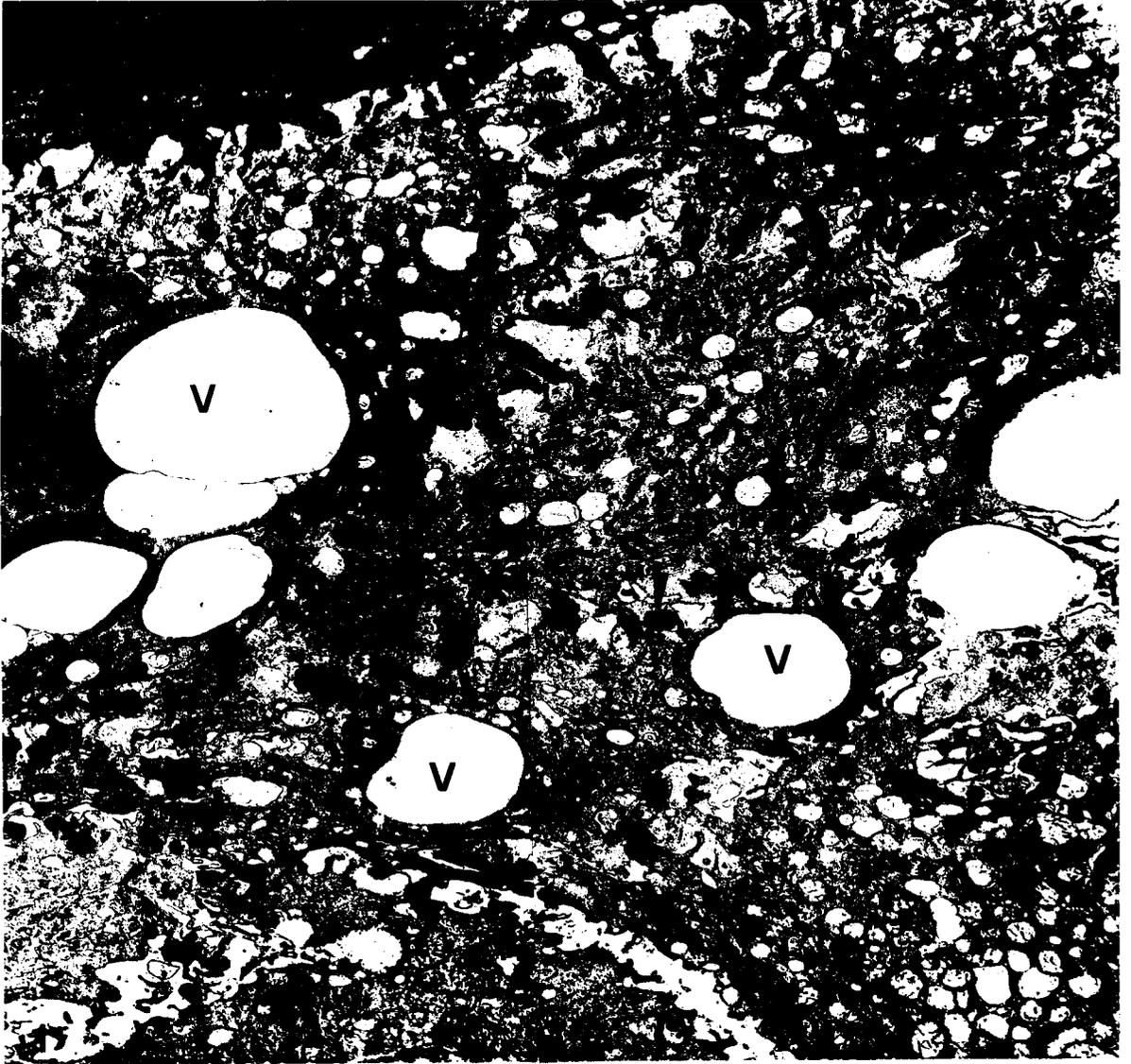
4111





2

3

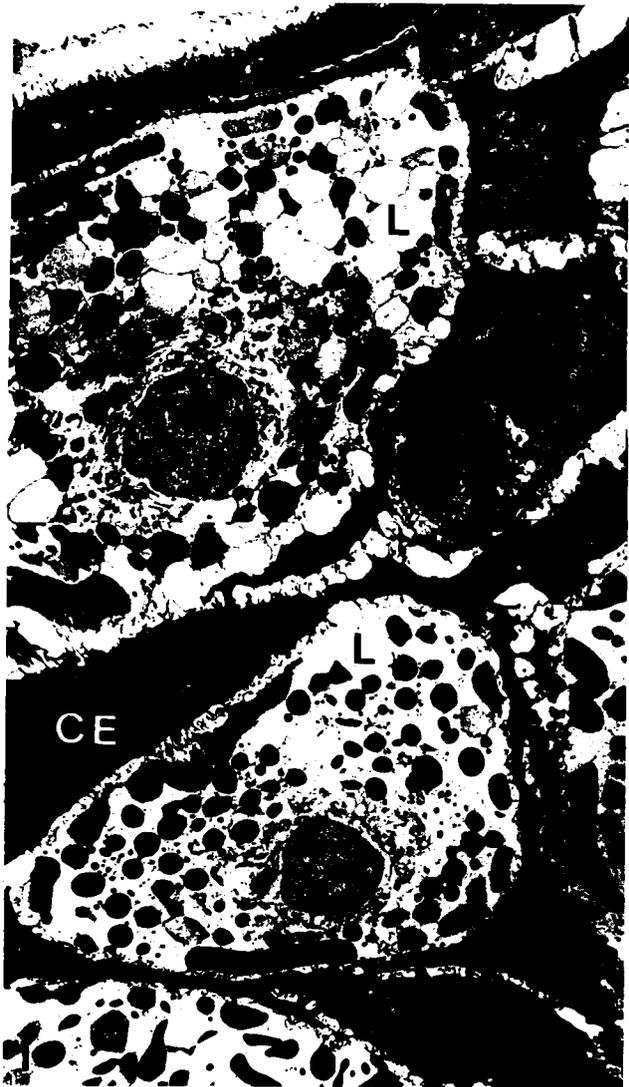


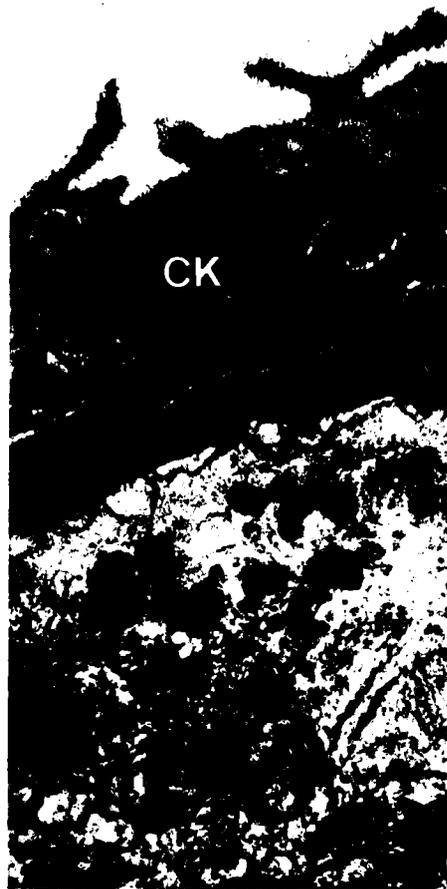
BUS
LILLE

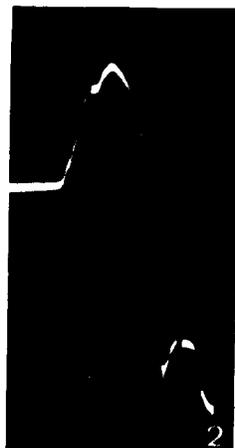


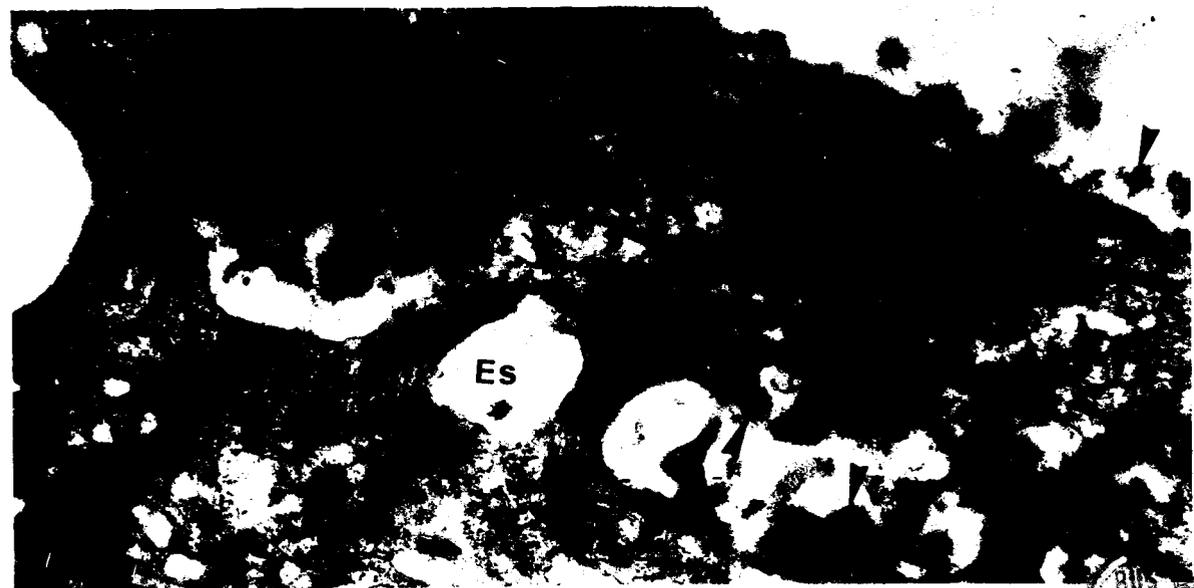
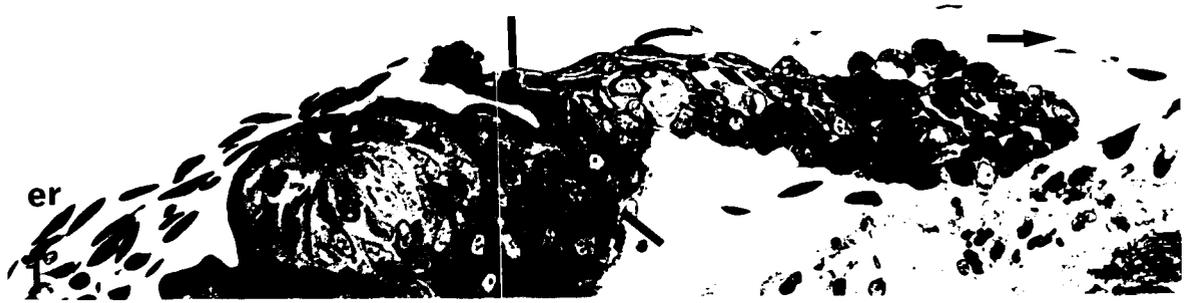
CK

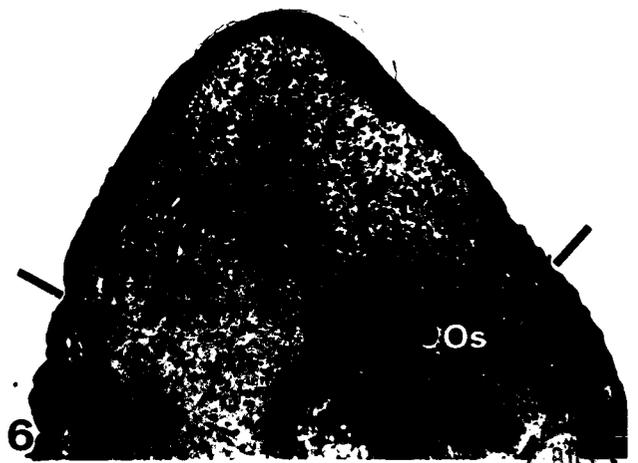
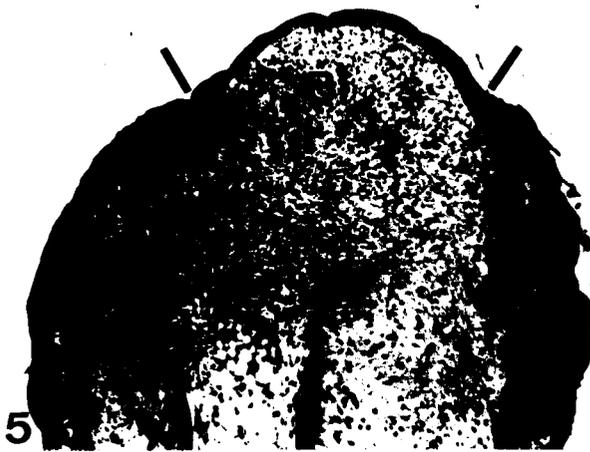
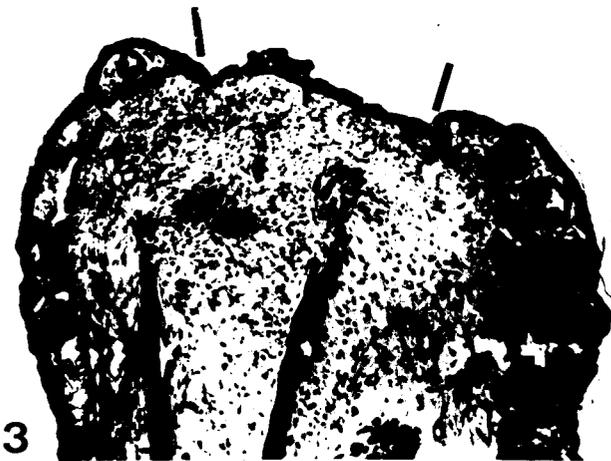
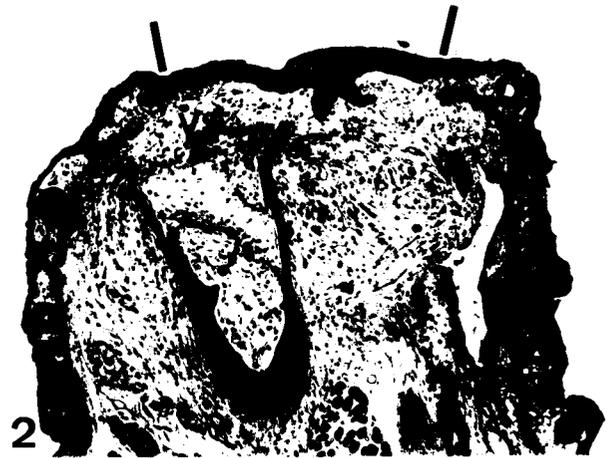
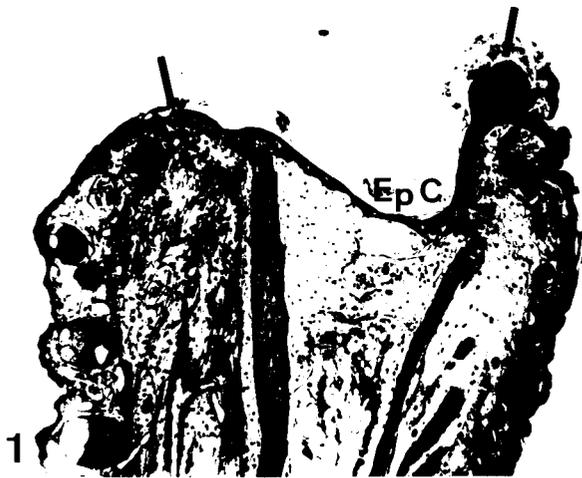
1960
LILLE











BU
LILLE