50376
1979
102

N° ~~874~~ 784

50376
1979
102

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DE LILLE

THESE DE 3E CYCLE

BIOLOGIE CELLULAIRE

Xavier DESBIENS

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

CONTRIBUTION A L'ETUDE EXPERIMENTALE DE LA MORPHOGENESE DU MEMBRE DE SOURIS RESULTATS DE CULTURES IN VITRO

Présentée en Octobre 1979 devant la Commission d'Examen

MM.	DURCHON M.	Président
	BART A.	Rapporteur
	CAPURON A.	Examinateur
Mme	SENGEL M.	Membre invité

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

N.I. : non identifiable

C : Ceinture

S : Stylopode

Z : Zeugopode

B : Basipode

M : Métapode

A : Acropode

fpp : foyer préaxial primaire

fm I : foyer marginal préaxial

fm V : foyer marginal postaxial

A.E.R. : crête apicale

Z.P.A. : zone d'activité polarisante

S O M M A I R E

INTRODUCTION..... p. 1

MATERIEL ET METHODES..... p. 4
I - TECHNIQUES D'ELEVAGE..... p. 4
II - TECHNIQUES OPERATOIRES..... p. 4
A - Prélèvement des cornes utérines..... p. 4
1) Prélèvement bilatéral avec sacrifice de la mère... p. 4
2) Prélèvement unilatéral sous anesthésie..... p. 4
B - Isolement des embryons..... p. 5
C - Dissection de bourgeons de membres et mise en culture..... p. 5
1) Bourgeons entiers..... p. 5
2) Fragments distaux..... p. 7
D - Conditions d'administration de la cytosine arabinoside p. 8
III - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES..... p. 8
IV - COLORATION DES SQUELETTES IN TOTO..... p. 9
A - Coloration des squelettes cartilagineux..... p. 9
B - Coloration des squelettes osseux..... p. 9
V - MICROSCOPIE A BALAYAGE..... p. 9

PREMIERE PARTIE
MORPHOGENESE NORMALE DU MEMBRE DE SOURIS

I - DEVELOPPEMENT IN UTERO..... p. 11
II - DEVELOPPEMENT IN VITRO..... p. 16
A - Conditions générales..... p. 16
1) Notion de croissance..... p. 16
2) Conditions expérimentales..... p. 16
3) Critères d'analyse..... p. 20
B - Résultats..... p. 20
C - Conclusion..... p. 30

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE LA MORPHOGENESE DE MEMBRES DE SOURIS TRAITES A LA CYTOSINE ARABINOSIDE

I - DEVELOPPEMENT IN UTERO..... p. 31

A - Introduction..... p. 31

B - Résultats..... p. 31

C - Conclusion..... p. 37

II - DEVELOPPEMENT IN VITRO..... p. 39

A - Introduction..... p. 39

B - Résultats des cultures en fonction du stade des bourgeons au moment des prélèvements..... p. 39

C - Résultats des cultures en fonction de l'origine des bourgeons..... p. 51

TROISIEME PARTIE

SYNTHESE DES RESULTATS RELATIFS AU DEVELOPPEMENT DE BOURGEONS ENTIERS IN VITRO

I - ETUDE DES SERIES COMPORTANT DES MEMBRES TRAITES A LA CYTOSINE ARABINOSIDE DEVELOPPES IN UTERO p. 65

A - Manipulation 1..... p. 65

B - Manipulation 2..... p. 65

C - Manipulation 3..... p. 65

D - Manipulation 4..... p. 66

E - Manipulation 5..... p. 66

F - Manipulation 6..... p. 66

G - Manipulation 7..... p. 66

H - Manipulation 8..... p. 67

II - ETUDE DES SERIES OU MANQUENT LES TEMOINS TRAITES DEVELOPPES IN UTERO..... p. 67

A - Manipulation 9..... p. 67

B - Manipulation 10..... p. 67

C - Manipulation 11..... p. 68

III - CONCLUSION..... p. 68

QUATRIEME PARTIE

CULTURE DE FRAGMENTS DISTAUX DE BOURGEONS DE MEMEBRES

I - INTRODUCTION..... p. 70

II - RESULTATS..... p. 70

A - Aspect général des cultures..... p. 70

B - Aspect des constituants..... p. 71

1) L'ectoderme et l'A.E.R..... p. 71

2) La lame basale..... p. 71

3) Le mésoderme..... p. 71

a) Densité..... p. 71

b) Phénomènes de dégénérescence..... p. 71

4) Le sinus marginal..... p. 71

C - Etude de la survie de la crête apicale..... p. 74

1) Fragments distaux de bourgeons de stade 16..... p. 74

2) Fragments distaux de bourgeons antérieurs de stade 17..... p. 74

3) Fragments distaux de bourgeons de stade 18..... p. 74

a) Bourgeons antérieurs..... p. 74

b) Bourgeons postérieurs..... p. 74

4) Fragments distaux de bourgeons de stade 19..... p. 74

a) Bourgeons antérieurs..... p. 74

b) Bourgeons postérieurs..... p. 74

5) Fragments distaux de bourgeons de stade 19 âgés..... p. 74

a) Bourgeons antérieurs..... p. 74

b) Bourgeons postérieurs..... p. 75

6) Fragments distaux de bourgeons de stade 20..... p. 75

a) Bourgeons antérieurs..... p. 75

b) Bourgeons postérieurs..... p. 75

III - CONCLUSION - DISCUSSION..... p. 75

A - Rôle biomécanique de la crête apicale..... p. 75

B - Interactions réciproques entre A.E.R. et mésoderme..... p. 79

1) Interactions ecto-mésodermiques et croissance proximo-distale..... p. 79
2) Interactions ecto-mésodermiques et acquisition de l'orientation antéro-postérieure..... p. 81
3) Comment situer notre travail par rapport à ces données..... p. 81

CONCLUSION GENERALE..... p. 85

INTRODUCTION

Chez les vertébrés tétrapodes, la morphogenèse des membres débute par la prolifération et l'accumulation de cellules somatopleurales sous l'ectoderme de sites prédéterminés. Les bourgeons ainsi formés ont donc deux composants fondamentaux : un noyau mésodermique et une enveloppe ectodermique. Dans la plupart des cas, cette dernière s'épaissit distalement, dans l'axe antéro-postérieur du bourgeon, formant une structure particulière : la crête apicale (Apical Ectodermal Ridge).

L'accès aux embryons d'amphibiens, de reptiles ou d'oiseaux ne posant pas de problème majeur,de nombreuses études expérimentales ont été réalisées et ont montré l'importance des interactions entre ces deux constituants dans la mise en place des membres de représentants de ces trois classes. Par contre, chez les Mammifères, le développement in utero rend les observations difficiles et surtout s'oppose à l'expérimentation micro-chirurgicale qui s'est montrée très féconde pour analyser les intéractions ecto-mésodermiques chez les autres vertébrés. Les recherches menées jusqu'ici (MILAIRE et MULNARD, 1968 ; DEUCHAR, 1976 ; AGNISH et KOCHHAR, 1977) n'ont pas encore permis d'apprécier les éventuelles particularités du développement des membres dans cette classe. Néanmoins, une technique récente (AYDELOTTE et KOCHHAR, 1972) modifiée par NEUBERT et RAUTENBERG en 1976 permet d'obtenir in vitro le développement des éléments squelettiques du membre de souris. Le nombre des pièces différenciées au niveau de chaque segment, leurs positions respectives et leurs proportions permettent de comparer aisément les squelettes obtenus aux membres normaux.

Notre propos est de rapporter ici les démarches effectuées pour s'assurer de la fiabilité de cette technique étant entendu que les perspectives expérimentales liées à une démonstration de la fidélité de ce développement in vitro sont nombreuses et attrayantes :

- S'assurer de la fiabilité d'une technique, c'est en cerner les limites, en connaître les inconvénients. Dans notre étude sur la morphogenèse du membre de souris, c'est étudier les capacités de développement d'ébauches d'âges différents dans un système de culture standardisé et apprécier la reproductivité des résultats obtenus.

- Démontrer la fidélité d'un tel développement, c'est prouver qu'une perturbation de la morphogenèse agit de façon similaire sur les membres, qu'ils soient élaborés in utero ou in vitro . Nous avons donc provoqué artificiellement des malformations au moyen d'un agent tératogène : la cytosine arabinoside (1-α-D arabinofuranosylcytosine). Ce produit, analogue de la cytidine, inhibe les ADN polymérases et bloque la replication de l'ADN. Il est donc particulièrement toxique pour les cellules en prolifération. Son action tératogène a été mise en évidence pour la première fois chez le rat et le poulet (KARNOFSKY et LACON, 1966 ; CHAUBE et MURPHY, 1965 ; CHAUBE et col., 1968). Administré au moment de l'organogenèse du membre chez la souris, il provoque des anomalies squelettiques importantes et reproductibles (KOCHHAR et col., 1978). Le développement in vitro des ébauches de membres d'embryons prélevés,

sous anesthésie, sur des femelles gestantes préalablement traitées a été étudié ainsi que celui des embryons de la même portée restés in utero. Une comparaison des prestations obtenues avec ou sans agent tératogène, in utero ou in vitro apporte des éléments de réponse au problème soulevé.

Par ailleurs, les nombreux travaux effectués chez les amphibiens, les reptiles et plus particulièrement les oiseaux, ont montré que la construction du membre est le fruit d'interactions locales multiples. Ainsi, les rapports entre la crête apicale et le mésoderme sous-jacent semblent diriger la différenciation proximo-distale du membre : l'excision de la cape apicale (SAUNDERS, 1948) arrête son développement, la greffe d'une A.E.R. supplémentaire entraîne sa duplication (ZWILLING, 1956 a ; GOETINCK, 1964 ; SAUNDERS et coll., 1976), et seul le mésoderme du bourgeon peut assurer le maintien de la crête (ZWILLING et HANSBOROUGH, 1956 ; ZWILLING, 1964). Une zone mésodermique localisée en position marginale postérieure (Zone of Polarizing Activity) dirigerait quant à elle la différenciation antéro-postérieure de l'ébauche. Dans le bourgeon alaire d'oiseau, la partie de la crête apicale située antérieurement, c'est-à-dire du côté préaxial est peu épaisse, alors que sa partie postaxiale coiffant la Z.P.A. est nettement épaissie. L'inversion de l'orientation antéro-postérieure de l'A.E.R. seule entraîne l'épaississement de la partie de la cape d'origine préaxiale, tandis que la partie postaxiale s'amincit (ZWILLING, 1956 b). Cette observation permet d'envisager l'existence d'un gradient morphogénétique dont le foyer se trouve dans le mésoderme marginal postaxial (SAUNDERS et GASSELING, 1968). En effet, greffée sous l'A.E.R. préaxiale, cette zone déclenche en premier lieu une restructuration de la cape qui s'épaissit, puis une morphogenèse surnuméraire d'éléments d'aile dont la partie postérieure se situe près du greffon et la partie antérieure en regard des segments préaxiaux normaux (BALCUNS et col., 1970 ; MAC CABE et col., 1973 ; TICKLE et col., 1975). L'implantation d'une zone de mésoderme postaxial de bourgeon de souris (TICKLE et col., 1976) ou de hamster (MAC CABE et PARKER, 1976) conduit aux mêmes duplications de l'aile de poulet, laissant envisager chez ces rongeurs l'existence de propriétés morphogènes très comparables à celles des oiseaux.

Pour le bourgeon d'aile d'oiseau, MAC CABE et PARKER en 1975 ont montré par culture de fragmentsecto-mésodermiques, que le mésoderme de la zone d'activité polarisante élaborait un facteur diffusible nécessaire au maintien de la crête apicale. Nous avons donc envisagé d'isoler certains fragments de bourgeon de membre de souris afin de préciser, d'après leur comportement in vitro, quelles interactions

président aux relations ecto-mésodermiques. Pour le choix des fragments nous nous sommes fondés sur les travaux de MILAIRE (1976) sur la rudimentation des rayons I et V de l'autopode de certains mammifères dont les rongeurs. Cet auteur relie ce processus de réduction à des vagues de dégénérescence affectant la crête apicale et le mésoderme périphérique sous-jacent dans les zones d'où émergent ces rayons. Or le premier doigt , le plus court, est issu d'une zone du bourgeon perturbée par deux foyers de nécrose successifs dont un très précoce. Le cinquième doigt qui dérive d'une zone affectée plus tardivement dans son évolution a une taille intermédiaire. La seule zone qui ne soit pas atteinte à un moment ou un autre par un foyer nécrotique se situe juste en arrière de l'axe proximo-distal du bourgeon et donne naissance aux doigts les plus développés. C'est donc à l'étude des deux zones distales du bourgeon qui ont les potentialités les plus différentes que nous nous sommes attachés.

MATERIEL ET METHODES

I - TECHNIQUES D'ELEVAGE

Toutes nos investigations ont été menées sur des souris de la souche SWISS. Les animaux sont élevés à environ 18 ° C, sous lumière artificielle de 8 heures à 20 heures. Ils disposent à volonté d'aliment composé complet et d'eau. Les accouplements sont réalisés en introduisant un mâle dans les cages où séjournent six femelles. Toutes les trois heures les femelles sont examinées. La découverte d'un bouchon vaginal, considéré comme indice d'accouplement, détermine le jour 0 du calendrier de gestation.

II - TECHNIQUES OPERATOIRES

Les femelles présumées gravides sont opérées au 10, 11ème ou 12ème jour. Les prélèvements de bourgeons de membres, leur mise en culture, s'effectuent dans une salle stérilisée aux rayons ultraviolets.

A - PRELEVEMENT DES CORNES UTERINES

Deux techniques ont été utilisées :

1) Prélèvement bilatéral avec sacrifice de la mère

Lorsque tous les embryons de la portée sont destinés à la mise en culture, la mère est tuée par dislocation cervicale, on pratique une incision circulaire sous la ceinture scapulaire de manière à retourner la peau comme un doigt de gant et la rabattre jusqu'au niveau de la ceinture pelvienne. La paroi musculaire abdominale est ainsi mise à nu en limitant au maximum les contacts avec le pelage de l'animal. On badigeonne cette paroi à l'éthanol 96° avant de l'ouvrir et de prélever les deux cornes utérines qui sont immergées immédiatement dans une solution saline isotonique stérile :

NaCl 8 g
KCl 4 g
$NaHCO_3$ 3,5 g
Glucose 10 g
Eau bidistillée 1 l
Rouge de Phénol 1,2 ml

2) Prélèvement unilatéral sous anesthésie

Quand, pour une portée donnée, le développement *in vitro* doit être rigoureusement comparé au développement *in utero* (c'est-à-dire à l'occasion de chacune

de nos expériences de tératogenèse), il faut prélever une partie des embryons tout en permettant aux autres individus de continuer à se développer normalement. La souris traitée subit une anesthésie au nembutal (pentobarbital sodique dilué dans une solution de NaCl à 9°/$_{oo}$, injecté par voie intrapéritonéale à raison de 80 mg/kg). La peau du ventre est rasée, soigneusement nettoyée à l'éthanol 96° avant d'être incisée sur une longueur d'environ 2 cm. Les bords de la plaie sont écartés et la cavité abdominale ouverte. Deux ligatures posées sur la corne utérine droite, l'une haute au niveau de l'oviducte, l'autre basse, après le dernier site de nidation, préviennent les hémorragies lors de la résection de la corne. Après immersion de l'organe prélevé, le plan musculaire abdominal puis la peau sont suturés avec du fil de nylon (les animaux opérés rongent les autres types de fil). L'animal est isolé dans un local bien chauffé jusqu'à son réveil.

B - ISOLEMENT DES EMBRYONS

Les cornes utérines sont nettoyées par agitation dans la solution saline où elles ont été immergées au moment du prélèvement. Chaque site de nidation est isolé et transféré dans un second bain de lavage où les foetus sont dégagés de leurs annexes. Ils sont transportés à la pipette dans une dernière coupelle de solution saline stérile où ils sont opérés.

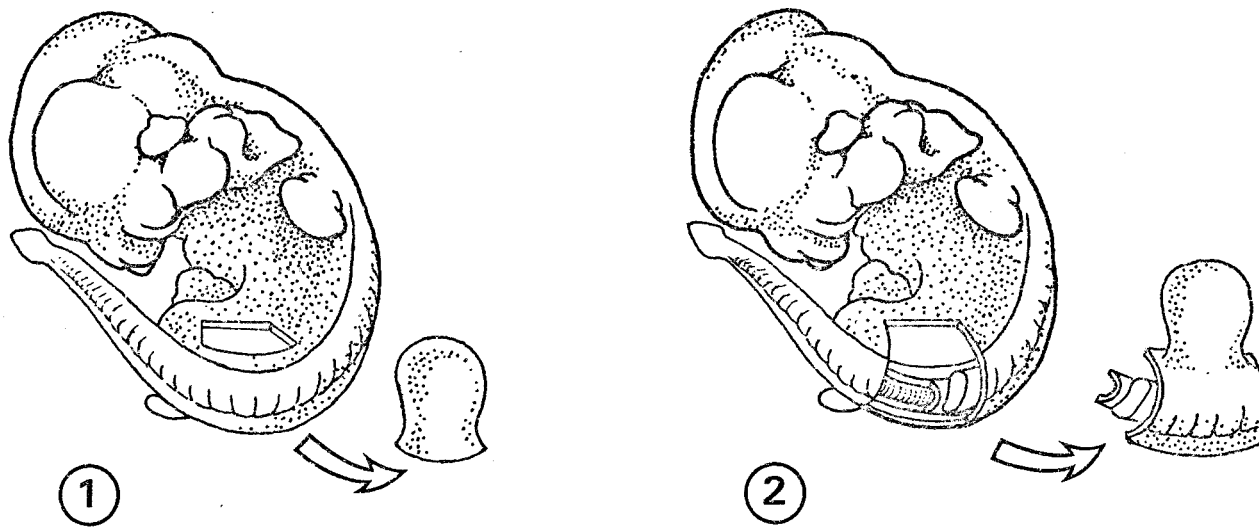
C - DISSECTION DES BOURGEONS DE MEMBRES ET MISE EN CULTURE

1) Bourgeons de membres entiers

Pour chaque embryon, les deux bourgeons de membres antérieurs ou postérieurs ont été prélevés, l'un complètement isolé des tissus environnants, l'autre associé aux somites et à une partie du tube neural adjacent selon le schéma numéro 1.

Les explants sont mis en culture selon le système de TROWELL (TROWELL, 1954) modifié par AYDELOTTE et KOCHHAR en 1972 et NEUBERT et col. en 1974. Quatre carrés de filtre Millipore (3 mm x 3 mm, épaisseur 200 μ, porosité : 8 μ) sont disposés à la surface d'une grille d'acier inoxydable. L'ensemble est placé dans une boîte de Pétri (3 cm de diamètre) qui reçoit le milieu. Le niveau du milieu doit être ajusté de manière à mouiller les filtres Millipore sans pour autant les immerger. Déposés au centre des filtres, les bourgeons se développent à l'interface gaz-liquide.

Le milieu se compose de 75 % de B.G.J. fabriqué au laboratoire (BIGGERS et col., 1961) enrichi en acide ascorbique (0,9 mM), en glutamine (1,3 mM), en antibiotiques (Pénicilline 50 UI/ml, Streptomycine 50 γ/ml) et de 25 % d'une solution saline



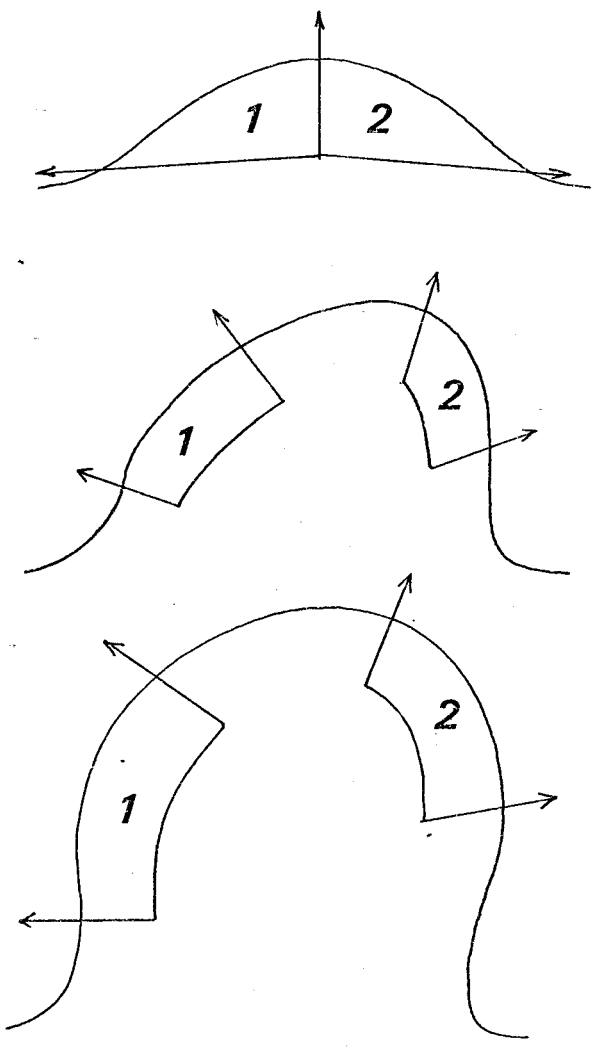
1 Dissection des bourgeons de membres

contenant 120 mM de NaCl, 5,6 mM de KCl et 6 mM de $CaCl_2$ (NEUBERT et RAUTENBERG, 1976).

La pression osmotique finale est voisine de 360 m. osmol. Un pH très basique (8,8) est mesuré au moment de la préparation du milieu. Les boîtes de culture sont incubées à 37° C dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau, enrichie en CO_2. Les conditions utilisées contribuent à ramener le pH à 8 en une douzaine d'heures. Des mesures récentes nous ont montré qu'une teneur en CO_2 ajustée avec précision à 5 % permet d'obtenir un pH voisin de 7,6. Le milieu est renouvelé tous les deux ou trois jours selon la taille des explants.

2) Fragments distaux de bourgeons

Deux régions distales comprenant l'A.E.R. et le mésoderme sous jacent ont été disséquées sur les bourgeons. La première, préaxiale se situe à la naissance du bourgeon ou de la palette autopodiale lorsqu'elle apparaît. La seconde postaxiale se situe juste à l'arrière de l'axe proximo-distal du jeune bourgeon, ou en face du futur espace interdigital III-IV et du futur rayon IV de la palette. Les très jeunes bourgeons sont simplement divisés en deux moitiés antérieure et postérieure.



Ces fragments sont mis en culture pendant 36 heures au fond des puits de plaques Microtest (Sterilin) contenant 0,1 ml d'un milieu composé de 75 % de TC 199 modifié et de 25 % de sérum foetal de veau.

BUC LILLE

La modification apportée à la formule originale du TC 199 a pour but d'augmenter sa pression osmotique et, dans un souci de standardisation de nos techniques, d'approcher le plus possible la composition du B.G.J. (dans les conditions indiquées plus haut, le B.G.J. entraîne la mort très rapide des explants distaux).

La formule utilisée est donc la suivante :

TC 199 (sels de Hank)(Eurobio).....	99 ml
NaCl.....	50 mg
Acide ascorbique.....	15 mg
Glucose.....	0,4 g
Solution concentrée des vitamines du B.G.J.....	1 ml
Antibiotiques : Pénicilline.....	50 UI/ml
: Streptomycine.....	50 γ/ml

La pression osmotique est de 350, tandis que le pH initial de 7,7 s'équilibre à 7,25 dans des conditions d'incubation identiques à celles utilisées pour la culture de bourgeons entiers.

D - CONDITIONS D'ADMINISTRATION DE LA CYTOSINE ARABINOSIDE

20 heures avant le prélèvement unilatéral des embryons, la femelle supposée gravide reçoit par injection intrapéritonéale 25 mg/kg de cytosine arabinoside. Ce produit est dissous dans une solution de NaCl à 9 °/$_{oo}$.

III - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

Qu'il s'agisse de bourgeons témoins, de membres témoins ou d'explants en fin de culture, tous les échantillons utilisés ont été fixés au Bouin Hollande avec acide acétique (un lavage dans une solution saline isotonique est nécessaire avant la fixation des fragments distaux cultivés en présence de sérum foetal de veau). Les durées de fixation varient en fonction de la taille des pièces.

Après lavage à l'eau, les pièces de dimensions importantes sont déshydratées dans des alcools de degré croissant. Lorsqu'il s'agit de petits fragments distaux, une préinclusion dans de la gélose à 1 % colorée à l'érythrosine (1 °/$_{oo}$) précède la déshydratation qui s'opère alors sur des bâtonnets de gélose contenant trois ou quatre pièces (ces dernières resteront colorées alors que la gélose deviendra opalescente au cours des étapes suivantes).

Deux bains d'alcool butylique préparent l'imprégnation par la paraffine. Les blocs d'inclusion sont débités en coupes de 6 μ d'épaisseur. Les lames sont colorées à l'hémalun-éosine.

IV - COLORATION DES SQUELETTES IN TOTO

Deux procédés ont été employés . Le premier permet de mettre en évidence le squelette cartilagineux. Le second qui révèle le squelette osseux a servi à l'occasion d'études de témoins âgés.

A - COLORATION DES SQUELETTES CARTILAGINEUX (Inspirée de RUGH, 1962)

Afin de permettre la réutilisation éventuelle des pièces concernées en histologie, on pratique une fixation au Bouin Hollande acétique (24 heures environ). Les membres sont ensuite lavés pendant plusieurs heures dans de l'éthanol 70° contenant 2 % de NH_4OH avant d'être colorés dans du bleu de Toluidine à 0,25 % dans l'éthanol 70°, additionné de 3 % d'HCl (quelques heures à plusieurs jours selon la taille des pièces). On décolore ensuite dans plusieurs bains d'éthanol 70°, puis on déshydrate au minimum quatre heures dans de l'éthanol 100°. Les pièces sont alors "éclaircies et conservées dans un mélange de salicylate de méthyle et de benzoate de benzyle dans les proportions 4/1.

B - COLORATION DES SQUELETTES OSSEUX

Les foetus sont immergés dans l'éthanol 70° pendant 8 jours puis éviscérés et déshydratés douze heures dans l'acétone pure. Ils sont ensuite immergés dans une solution comportant :

- 10 g de KOH
- 6 g d'Alizarine sulfonate de Soude

dans un litre d'eau distillée.

Les foetus macèrent dans ce mélange à l'abri de la lumière pendant sept jours, puis ils sont lavés pendant un minimum de quarante-huit heures dans chacun des bains suivants :

a) en volume Glycérine : 2
Ethanol 70° : 2
Alcool butylique : 1

b) en volume Glycérine : 1
Ethanol 70° : 1

La conservation se fait dans de la glycérine pure.

V - MICROSCOPIE A BALAYAGE

Cette technique nous a permis d'étudier la morphologie de quelques

bourgeons de membres témoins. Nous avons choisi le protocole décrit par TAMARIN et BOYDE en 1976.

Les embryons sont fixés dans deux bains de Glutaraldéhyde à 3 % dans un tampon cacodylate 0,2 M (24 heures à 4° C). Ils sont ensuite rincés plusieurs fois dans la solution tampon et postfixés vingt heures dans l'acide osmique à 3 % dans le tampon cacodylate 0,2 M. Un lavage à l'eau distillée précède une déshydratation jusqu'à l'éthanol absolu. Les foetus passent directement dans un appareil à point critique. Les échantillons, sont métallisés à l'or-palladium dans un évaporateur sous vide et observés au microscope Stéréoscan (Cambridge, Eil).

PREMIERE PARTIE

MORPHOGENESE NORMALE DU MEMBRE DE SOURIS

I - DEVELOPPEMENT IN UTERO

Dans ce chapitre, nous avons essayé de rassembler des informations d'origines différentes relatives à l'organogenèse du membre de souris en les insérant dans la table de développement proposée par THEILER en 1972 (Pl. I et II).

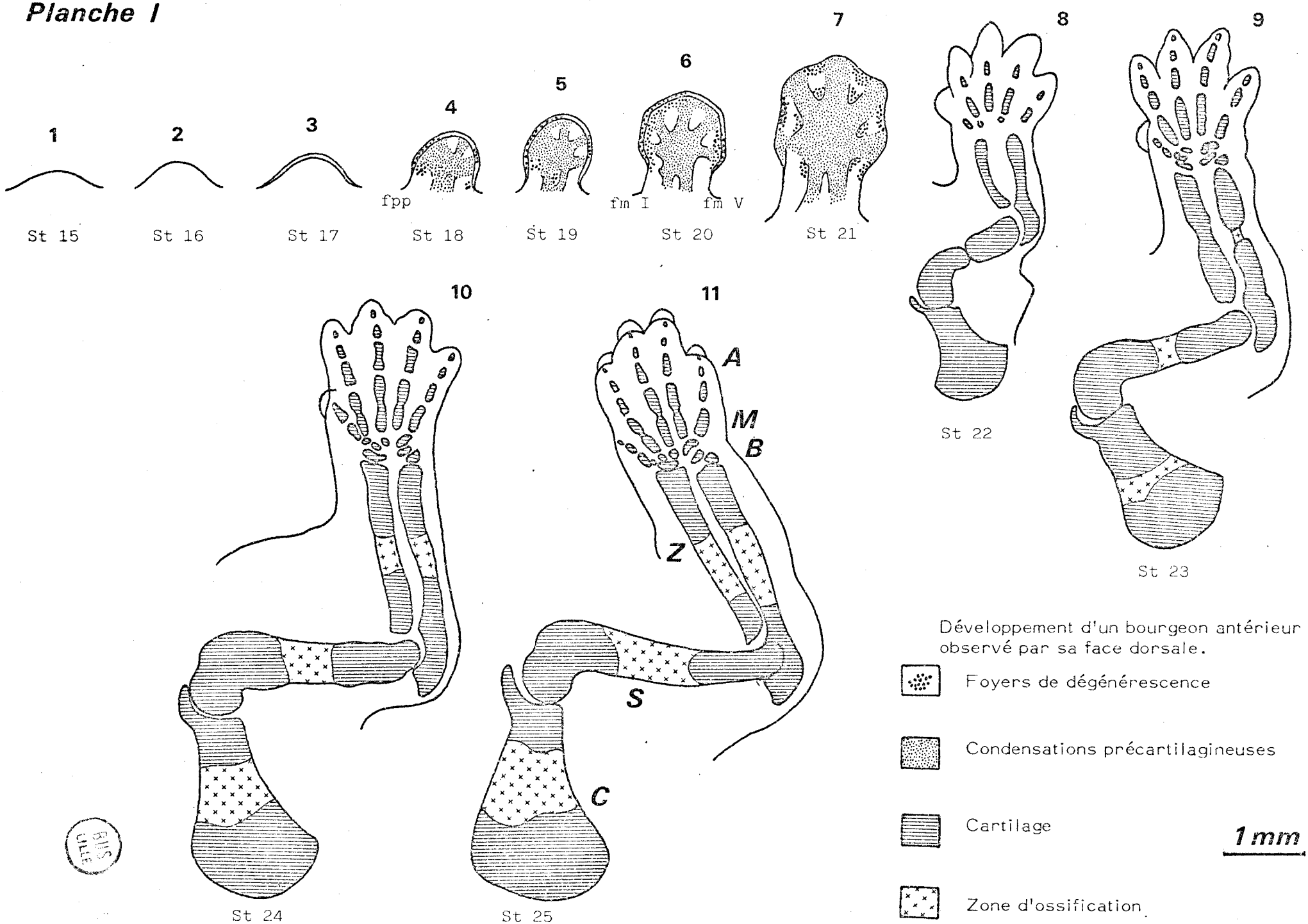
Stade 14 - Stade 15 : Le développement du membre antérieur de souris commence au cours du neuvième jour de gestation par l'apparition d'un épaississement allongé sur le flanc de l'embryon au niveau des somites 7 à 12. Ce jeune bourgeon est recouvert d'un épithélium unistratifié d'épaisseur uniforme (JURAND, 1965) (Pl.III, Fig. 1).

Stade 16 : Avec la prolifération du mésoblaste se modèle rapidement un bourgeon plus haut, bien individualisé. Au début du dixième jour l'embryon mesure approximativement 3,5 mm et on compte entre 30 et 36 paires de somites. Des modifications interviennent dans la structure de l'ébauche : un épaississement de l'épiblaste sur le côté ventral du bord libre du bourgeon annonce la formation de la crête apicale tandis que le reste de l'enveloppe ectodermique acquiert une couche de cellules péridermiques (JURAND, 1965) (Pl.III, Fig. 2). Le bourgeon de membre postérieur est à peine décelable.

Stade 17 : L'embryon de stade 17 (10,5 jours) présente 35 à 39 paires de somites et peut mesurer jusqu'à 4,9 mm. Le bourgeon de membre antérieur s'est aplati selon l'axe dorso-ventral. Il acquiert une légère dissymétrie antéro-postérieure. La crête apicale ectodermique s'individualise à l'apex du bourgeon. L'ébauche postérieure n'est encore qu'un mamelon.

Stade 18 : Au stade 18 (11 jours), la longueur de l'embryon est comprise entre 5 et 6 mm, on dénombre de 40 à 44 paires de somites. Le bourgeon antérieur, observé par sa face dorsale, montre une dissymétrie nette, il a la forme d'un cône dont la pointe est tournée vers la queue de l'embryon. Son bord postaxial est régulier alors que la base du futur autopode s'inscrit nettement sur son bord préaxial. Pour MILAIRE (1976) c'est à partir de ce stade que la crête apicale acquiert sa véritable configuration, elle a alors la forme d'une lentille saillante sur le bord libre du bourgeon (Pl.III, Fig. 3). Paradoxalement cet auteur note l'apparition de foyers nécrotiques importants tant au niveau de la cape apicale qu'au niveau du mésoderme préaxial de la jeune palette (foyer préaxial primaire). Deux foyers dégénératifs affectent la crête : le plus étendu se situe sur toute la partie préaxiale de cette structure et ne disparaitra que lors de la poussée des doigts , le second, très ponctuel, touchant l'extrémité postaxiale de la cape, disparaît rapidement.

Planche I



Développement d'un bourgeon antérieur droit observé par sa face dorsale.

Foyers de dégénérescence

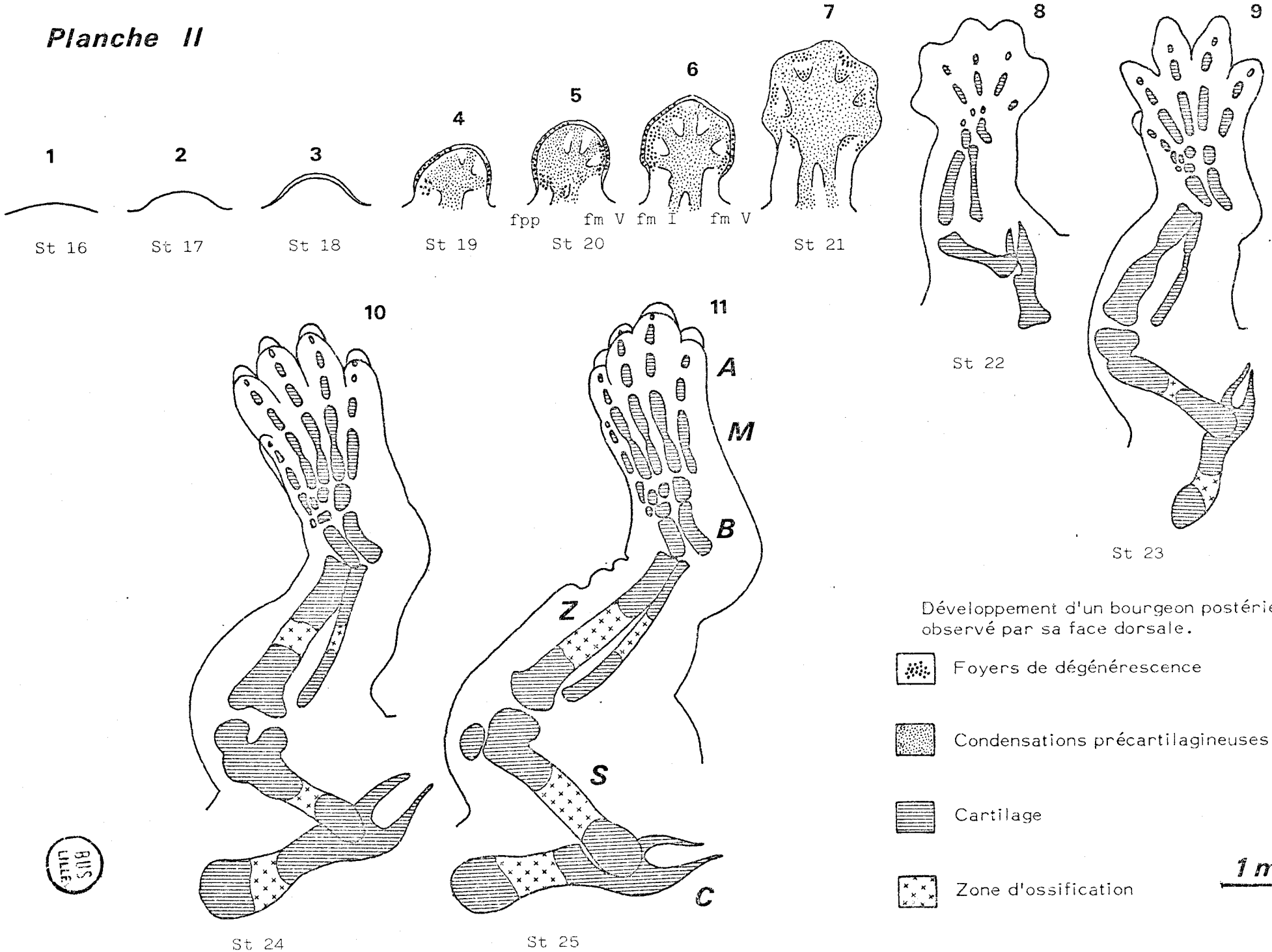
Condensations précartilagineuses

Cartilage

Zone d'ossification

BUS LILLE

Planche II



Développement d'un bourgeon postérieur droit observé par sa face dorsale.

Foyers de dégénérescence

Condensations précartilagineuses

Cartilage

Zone d'ossification

1 mm

BUS LILLE

Le bourgeon postérieur a l'aspect et les caractéristiques du bourgeon antérieur au stade précédent.

Stade 19 : L'embryon de stade 19 (11,5 jours) a plus de 45 paires de somites et mesure de 6 à 7 mm. L'ébauche de membre antérieur comprend une palette placée à l'extrémité d'un court pédoncule. Le bord préaxial de la palette apparaît légèrement affaissé (Pl. III, Fig. 4, 5, 6). Si le foyer préaxial primaire a pratiquement disparu du mésoderme, la cape apicale reste très atteinte par la nécrose : seule une petite zone située juste en arrière de l'axe proximo-distal du bourgeon reste saine. C'est en face de cette zone que le mésoblaste de la palette manifeste les premiers signes d'une organisation présquelettique radiée.

Le bourgeon postérieur (Pl. III, Fig. 7; Pl. IV, Fig. 1) a la morphologie du bourgeon antérieur de stade 18. Sa crête apicale subit également des phénomènes de dégénérescence étendus mais le foyer préaxial primaire qui apparaît tardivement, n'est pas encore vraiment installé.

Stade 20 : Au douzième jour du développement les embryons peuvent atteindre 9 mm. Les somites ne sont plus visibles dans la partie céphalique du tronc. C'est au cours de cette période de développement que vont se manifester les tout premiers signes d'élaboration des doigts au niveau de la palette antérieure. Cette structure, encore ronde chez les jeunes stades 20 (Pl. I, Fig. 6), acquiert rapidement une forme hexagonale. Le "pédoncule" sur lequel elle s'attache reste néanmoins court.

Avec le début de la poussée des bourgeons digitaux antérieurs, s'amorce une seconde vague de dégénérescence. Un foyer marginal préaxial s'attaque à une épaisse couche de mésoblaste périphérique depuis le premier bourgeon digital jusqu'au milieu du troisième. Un foyer marginal postaxial affecte le mésoblaste interdigital du quatrième espace et celui du blastème qui constituera le cinquième rayon. Corrélativement, on note l'amincissement général de la crête apicale annonçant sa régression imminente (Pl. IV, Fig. 2). La portion située en face des troisième espace interdigital et quatrième bourgeon digital est la seule à n'avoir subi aucun phénomène de dégénérescence au cours de l'existence de la cape apicale.

L'aspect des bourgeons postérieurs de stade 20 est comparable à celui des bourgeons antérieurs de stade 19. Les zones de nécrose couvrent l'essentiel de la crête apicale et on trouve encore le foyer préaxial primaire dans le mésoderme. On observe de plus, l'apparition précoce du foyer marginal postaxial à l'opposé de la palette.

A 12,5 jours, les bourgeons postérieurs ont une palette hexagonale affectée par les deux foyers nécrotiques de la deuxième vague de dégénérescence. Signalons cependant que le foyer marginal primaire n'atteint pas le troisième rayon digital et que le foyer marginal postaxial apparu précocement au stade précédent est encore très actif (Pl. II, Fig. 6).

Stade 21 : Au treizième jour de gestation, l'embryon mesure de 9 à 11 mm. Les ébauches de doigts commencent à émerger de la palette antérieure qui subit une rotation par rapport au plan de symétrie du corps : jusqu'alors parallèle au flanc de l'embryon son bord préaxial se rapproche du plan de symétrie tandis que son bord postaxial s'en éloigne.

La poussée des doigts est liée à une troisième vague de nécrose : dans le mésoderme de chaque espace interdigital apparaissent successivement deux foyers de dégénérescence. Le premier touche les cellules superficielles sous-épiblastiques, le second se situe plus profondément, au niveau des futures phalanges proximales. Une extension en profondeur de la zone superficielle entraîne la convergence des deux foyers et des inflexions épiblastiques assureront ultérieurement la séparation des doigts.

Des phénomènes identiques affectent avec un léger retard l'autopode postérieur.

Stade 22 : Au quatorzième jour du développement embryonnaire, les doigts sont individualisés au niveau de la palette antérieure, mais les orteils ne sont pas encore libres. A la fin de ce stade, le squelette cartilagineux est formé (Pl. IV, Fig. 3). Pour le membre antérieur, la ceinture, l'humérus, le radius, le cubitus, les métacarpiens et la première phalange des doigts II, III, IV et V sont identifiables (Pl. I , Fig. 8). Un premier point d'ossification est décelable au milieu de l'humérus. Le membre postérieur montre ceinture, fémur, tibia, péroné, plus les deux osselets principaux du basipode : calcaneum et astragale. Quatre métatarsiens sont présents dans les rayons II, III, IV, V. La première phalange des doigts II, III, IV apparaît (Pl. II, Fig. 8).

Stade 23 : Le quinzième jour de développement se caractérise par l'individualisation des orteils. La disposition radiée des doigts et des orteils persiste. Les segments squelettiques cartilagineux déjà en place s'allongent. L'autopode antérieur montre un basipode complet. Le squelette de l'acropode est complet dans les trois rayons médians (Pl. I , Fig. 9). Au niveau du membre postérieur se constitue le basipode définitif mais les orteils II, III, IV, V ne comptent que deux phalanges, l'orteil I une phalange (Pl. II , Fig. 9). Les zones d'ossification s'étendent, on les trouve au niveau des ceintures, des stylopodes et du zeugopode antérieur.

Stade 24 : Le foetus de 16 jours a un autopode où les doigts II, III, IV, V sont parallèles et commencent à fusionner (MACONNACHIE, 1979) au niveau de leur partie proximale. Les orteils restent isolés à ce stade.

Les squelettes sont complets tant au niveau du basipode que de l'acropode (Pl. I et Pl. II, Fig. 10). Les zones d'ossification restent cantonnées au niveau de la ceinture, du stylopode et du zeugopode mais elles s'étendent vers les extrémités de ces segments.

Stade 25 : Au 17e jour, les orteils fusionnent à leur tour mais il n'y a plus de changement notoire dans la constitution du squelette. La suite de l'évolution se résume au remplacement du cartilage par de l'os et à la croissance du membre (Pl. I et Pl. II, Fig. 11).

II - DEVELOPPEMENT IN VITRO

A - CONSIDERATIONS GENERALES

Avant d'exposer le détail des résultats obtenus, il nous apparaît important de fixer d'emblée les limites de la technique utilisée.

1) Notion de croissance

Si la méthode de culture en interface permet une appréciation convenable de la mise en place proximo-distale et antéro-postérieure du "squelette" d'un membre, nous n'avons pas cherché à évaluer la croissance réelle des bourgeons que nous ne pouvons pas apprécier morphologiquement en raison de leur étalement sur le support. L'aspect morphologique de fin de culture doit donc être pris en considération avec prudence.

2) Conditions expérimentales

La différenciation cartilagineuse dans un bourgeon ne s'opère que dans des conditions expérimentales très strictes. L'une des séries exploitées en fournit un exemple remarquable (Tableau I). Lors de cette mise en culture, les sept embryons prélevés au stade 18 ont permis de constituer sept boîtes renfermant chacune les quatre bourgeons d'un même donneur. Après six jours de culture, dans deux boîtes, tous les bourgeons ont développé un squelette harmonieux, tandis que dans les cinq autres, aucun bourgeon n'a élaboré le moindre nodule cartilagineux.

De façon générale nous avons constaté que les bourgeons placés dans une même boîte se développent de manière similaire. Comment expliquer ce comportement singulier ? Le mélange B.G.J.-solution saline est fabriqué avant sa répartition

TABLEAU I : RESULTATS D'UNE CULTURE DE BOURGEONS DE MEMBRES D'EMBRYONS DE STADE 18 AGES. CHAQUE BOITE (A à G) CONTIENT LES QUATRE BOURGEONS D'UN MEME DONNEUR.

Numéro de l'explant	Nature et nombre des éléments cartilagineux différenciés						
	Non identifié	Eléments axiaux	Ceinture	Stylopode	Zeugopode	Basipode	Métapode
Bourgeons 45 A 1	–	–	–	–	–	–	–
antérieurs 45 B 1	–	–	–	–	–	–	–
+ somites 45 C 1	–	–	–	–	–	–	–
+ système 45 D 1	–	–	–	–	–	–	–
nerveux *45 E 1	–	+	+	+	++	+	
45 F 1	–	–	–	–	–	–	–
*45 G 1	–	+	+	+	++	+++	+++
Bourgeons 45 A 3	–	–	–	–	–	–	–
antérieurs 45 B 3	–	–	–	–	–	–	–
45 C 3	–	–	–	–	–	–	–
45 D 3	–	–	–	–	–	–	–
*45 E 3	–	–	+	+	++	–	–
45 F 3	–	–	–	–	–	–	–
*45 G 3	–	+	+	+	++	+++	+++
Bourgeons 45 A 2	–	–	–	–	–	–	–
postérieurs 45 B 2	–	–	–	–	–	–	–
+ somites 45 C 2	–	–	–	–	–	–	–
+ système 45 D 2	–	–	–	–	–	–	–
nerveux *45 E 2	–	+	+	+	++	–	–
45 F 2	–	–	–	–	–	–	–
*45 G 2	–	+	+	+	++	+	+
Bourgeons 45 A 4	–	–	–	–	–	–	–
postérieurs 45 B 4	–	–	–	–	–	–	–
45 C 4	–	–	–	–	–	–	–
45 D 4	–	–	–	–	–	–	–
*45 E 4	–	+	+	+	++	–	–
45 F 4	–	–	–	–	–	–	–
*45 G 4	+	–	+	+	+	–	–

BUS LILLE

dans les boîtes, les conditions d'incubation sont les mêmes. Les paramètres de culture paraissent essentiellement différer par la quantité de milieu utilisée pour mouiller la grille et les filtres supports.

L'excès de B.G.J. entraîne la formation d'un ménisque liquide au-dessus des explants. Nous avons donc voulu savoir si cette immersion involontaire était préjudiciable. Douze embryons de stade 20 âgés ont été utilisés à cette fin. Les ébauches de membres de six d'entre eux ont été cultivées selon la technique de TROWELL tandis que celles des six autres étaient délibérément immergées dans le milieu. Chaque jour, une fixation opérée sur quatre explants provenant d'un même embryon a permis de suivre l'évolution des bourgeons dans chacun des deux systèmes, soit en coloration au bleu de toluidine (Tableau II), soit en coupe histologique. Qu'il s'agisse d'un membre antérieur ou d'un membre postérieur, l'immersion ne permet d'obtenir que les éléments cartilagineux proximaux représentant des ceintures souvent atrophiées quelle que soit la durée de culture (Pl.IV, Fig. 4). Les tests histologiques montrent que seul l'ectoderme semble pouvoir évoluer en subissant une kératinisation importante. Sous cet ectoderme se creuse rapidement une vaste cavité dont l'essentiel est occupé par des cellules à noyaux très petits et très colorés (Pl. IV, Fig. 5). A l'opposé de ces résultats, lorsqu'un bourgeon antérieur est placé en interface, la différenciation cartilagineuse s'opère progressivement depuis les éléments proximaux (ceinture dès le premier jour) jusqu'aux éléments les plus distaux (phalanges au 4ème jour). Les membres obtenus sont harmonieux (Pl. IV, Fig. 6). Bien que le bourgeon postérieur soit tout aussi capable de "fabriquer" son squelette, in vitro, il faut constater que sa réalisation est moins poussée, notamment au niveau des segments intermédiaires (stylopode atrophié et zeugopode absent). Les coupes histologiques montrent que l'ectoderme se kératinise également mais que le bourgeon acquiert à partir de condensations mésodermiques, des pièces squelettiques où les chondrocytes sont noyés dans une substance fondamentale abondante (Pl. IV, Fig. 7). Autour de ces axes ne se différencie ni structure musculaire, ni structure nerveuse ; mais nous retrouvons des zones de cellules à petits noyaux décrites antérieurement , localisées préférentiellement au niveau des stylopodes et zeugopodes, entre la ou les pièces cartilagineuses et l'épiderme collé au filtre support. Ce type cellulaire, d'autant plus abondant que le séjour in vitro est long, pourrait représenter une population de cellules s'engageant vers la dégénérescence.

Le tableau II nous apprend de plus que même lorsque le niveau de milieu semble correct, il peut se produire une immersion accidentelle qui inhibe complètement le développement des bourgeons concernés. C'est le cas de la boîte d'explants fixés après trois jours de culture. La prestation réalisée par ces membres est très en dessous de ce que l'on pouvait en espérer au vu de l'évolution des autres ébauches de la série. D'autre part, leur aspect histologique rappelle tout à fait celui des bourgeons cultivés en immersion

TABLEAU II : COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS APRES CULTURE EN INTERFACE OU EN IMMERSION DE BOURGEONS DE MEMBRES D'EMBRYONS DE STADE 20.

Nature des explants	Durée de culture (jours)	Nombre d'explants	Nature et Nombre des éléments cartilagineux différenciés						
			N.I.	C	S	Z	B	M	A
Bourgeons antérieurs en interface	1	1		+					
	2	1		+	+	+			
	3	1		+					
	4	1		+	+	++	++	+++++	+++
	5	1		+	+	++		+++++	++++
	6	1		+	+	++	++	+++++	+++++
Bourgeons postérieurs en interface	1	1	+						
	2	1		+	+				
	3	1		+					
	4	1		+	+				
	5	1		+	+			+++	
	6	1		+	+			+++++	
Bourgeons antérieurs immergés	1	1		+					
	2	1		+					
	3	1		+					
	4	1		+					
	5	1		+					
	6	1		+					
Bourgeons postérieurs immergés	1	1	+						
	2	1	+						
	3	1	+						
	4	1		+					
	5	1		+					
	6	1		+					

BUS LILLE

A la lumière de ces résultats, il nous est apparu préférable de ne pas tenir compte des boîtes où ne survenait aucune différenciation cartilagineuse quand, dans la même série, et pour des stades équivalents, certains bourgeons parvenaient à se développer.

3) Critères d'analyse

Il paraît enfin souhaitable de préciser que le choix des critères qui sanctionnent la qualité de nos résultats n'est pas simple et que nous avons arbitrairement limité notre analyse à deux paramètres :

a - L'identification du segment squelettique le plus distal différencié par un bourgeon mis en culture à un stade donné ;

b - L'intégrité des structures proximales par rapport à ce niveau.

Ainsi un membre sera dit harmonieux si aucune discontinuité n'apparaît entre les niveaux extrêmes observés.

B - RESULTATS

Stade 16 : A ce stade, le bourgeon de membre antérieur est bien individualisé alors que celui du membre postérieur se soulève à peine. Après sept jours de culture (Tableau III) les membres antérieurs se sont bien développés, on note un allongement général de ces bourgeons mais surtout une différenciation étonnante des cartilages qui constituent l'essentiel de l'explant. Les éléments du squelette sont reconnaissables bien que soudés les uns aux autres. L'angle formé par le coude est très marqué mais le développement s'arrête au zeugopode. Quand l'explant comporte initialement, outre le bourgeon de membre, du matériel somitique et nerveux, la différenciation fait apparaître des vertèbres ou des côtes et aussi des éléments de membre distaux constituant un autopode rudimentiare (Pl. V , Fig. 1). Quel que soit le niveau atteint, les squelettes sont harmonieux et deux jours de culture supplémentaires n'améliorent pas ces résultats. En ce qui concerne les bourgeons de pattes postérieurs, seul un explant a formé un nodule allongé correspondant au stylopode et dans ce cas on notera que cet explant comportait le bourgeon, les somites adjacents et du système nerveux(Pl. V, Fig. 9 De même les nodules non identifiés apparaissent plus fréquemment en présence de matériel axial, mais n'occupent pas de place précise dans les explants.

Stade 17 : Les résultats obtenus après sept et neuf jours de culture confirment (Tableau IV) en partie les observations faites sur des stades 16 : il y a allongement des ébauches et différenciation de cartilage. Le bourgeon antérieur de stade 17 peut donner un membre où ceinture, stylopode et zeugopode sont soudés. Le basipode et le métapode sont présents, isolés et mieux représentés qu'au stade précédent : deux explants montrent trois métacarpiens allongés et parallèles (Pl. V , Fig. 2). Le matériel axial, dans cette série, ne semble avoir d'influence que sur la différenciation de côtes et de vertèbres. Le bourgeon postérieur de stade 17 apparaît plus

TABLEAU III : DEVELOPPEMENT IN VITRO DE BOURGEONS DE STADE 16.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	4	7		1			2	1				
	2	9		2								
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	4	7		1					3			3
	2	9				1			1			2
Bourgeon postérieur	4	7	3	1								
	2	9	2									
Bourgeon postérieur +somites+S.nerveux	4	7	1	2		1						1
	2	9	2									

BUS LILLE

TABLEAU IV : DEVELOPPEMENT IN VITRO DE BOURGEONS DE STADE 17.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	1	7		1								
	5	9		4					1			
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	1	7					1					1
	5	9		4					1		1	1
Bourgeon postérieur	1	7	1									
	5	9	4	1								
Bourgeon postérieur +somites+S.nerveux	1	7		1								
	5	9	2	3								

BUS LILLE

sensible à la présence des somites et du système nerveux. Bien que son développement soit très limité, on constate que du cartilage apparaît préférentiellement dans les explants restés en contact avec du mésoderme somitique et du tube neural (Pl. V, Fig. 10)

Stade 18 : Sept jours de culture permettent d'obtenir des membres antérieurs harmonieux dont la différenciation atteint le niveau autopode (Tableau V). Si la manipulation est effectuée sur de jeunes bourgeons de stade 18 le développement reste essentiellement cantonné au basipode ; les explants où une ébauche de métapode est visible sont peu nombreux. Avec des bourgeons de stade 18 âgés (Tableau V*), apparaît un autopode mieux organisé (Pl. V, fig. 3).

L'influence du matériel axial ne peut être mise en évidence à ce stade.

Le développement des bourgeons postérieurs de jeunes stades 18 est toujours extrêmement limité. Les quelques nodules cartilagineux différenciés ne sont pas identifiables. Lorsque les bourgeons sont plus âgés apparaît enfin une organisation nette où figurent les différents composants du squelette jusqu'au niveau métapode (Pl. V , Fig. 11). Il semble, bien que l'échantillonnage soit limité pour les bourgeons âgés que le mésoderme somitique et le neuroderme aient une influence positive dans l'élaboration du cartilage.

Enfin on remarque un changement dans l'aspect général des explants. Aux stades antérieurs l'enveloppe du membre en apparence trop étroite , semblait comprimer les divers cartilages des squelettes organisés, les soudures observées entre éléments proximaux accentuaient cette impression. Avec un bourgeon de stade 18, on obtient in vitro un membre plus délié où les soudures proximales sont moins importantes, où il subsiste du mésenchyme entre les cartilages et l'épiderme.

Stade 19 : Le niveau distal atteint par les bourgeons antérieurs a encore progressé (Tableau VI). La plupart des explants possède au moins une phalange, le basipode et le métapode sont très bien représentés (Pl. V , Fig. 4). On note cependant que les segments intermédiaires et notamment le zeugopode se différencient plus difficilement ; dans un cas il n'existe aucune structure entre les vertèbres et l'autopode.

Les bourgeons de membres postérieurs élaborent un squelette où l'on reconnaît les éléments successifs jusqu'au métapode. Très souvent les fusions y sont importantes : ceinture, fémur et tibia sont soudés, seul le péroné s'individualise. Le basipode n'est pas toujours net, sans doute ses deux principaux éléments (calcaneum et astragale) sont-ils intégrés au zeugopode (Pl. V , Fig. 12).

A ce stade, aucune influence du matériel axial n'est décelable. Il semble même que la différenciation du cartilage soit plus importante dans les bourgeons isolés.

TABLEAU V : DEVELOPPEMENT IN VITRO DE BOURGEONS DE STADE 18 ET DE BOURGEONS DE STADE 18 AGES*

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	20	7	2	8			2	5	2	1		
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	4	7	1			1		1	1			1
Bourgeon postérieur	18	7	12	6								
Bourgeon postérieur +somites+S.nerveux	4	7	1	3								
*Bourgeon antérieur	2	6					1		1			1
*Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	2	6						1	1			2
*Bourgeon postérieur	2	6					2					1
*Bourgeon postérieur +somites+S.nerveux	2	6					1		1			2

BIUS LILLE

TABLEAU VI : DEVELOPPEMENT IN VITRO DE BOURGEONS DE STADE 19.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	11	6	2	1					1	7		3
	4	9	1	2						1		
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	3	6	1	2								
	4	9	2	1						1		1
Bourgeon postérieur	11	6	2	1		1	1		6			
	5	9	2	3								
Bourgeon postérieur +somites+S.nerveux	3	6	2	1								
	5	9	3		1				1			1

Stade 20 : Le développement in vitro des bourgeons antérieurs de jeunes stades 20 conduit à des membres dont l'extrémité distale est bien organisée (Tableau VII) Si le basipode reste incomplet dans tous les cas, on note que le métapode comporte jusqu'à cinq éléments. On trouve alors en face des trois métacarpiens axiaux, trois phalanges représentant la partie basale d'un acropode à trois doigts (Pl.V,Fig. 6). Dans ces explants il faut déplorer la mauvaise différenciation intermédiaire : stylopode et zeugopode sont réduits à l'état de nodules quand ils existent. On constate parallèlement l'existence de nombreux éléments cartilagineux de grosse taille non identifiables localisés préférentiellement du côté proximal (Pl. V , Fig. 6).

Les bourgeons de membres postérieurs évoluent de façon comparable : développement distal poussé (jusqu'à cinq métatarsiens et ébauche de deux et trois doigts), déficience très importante dans les segments intermédiaires, prolifération d'éléments non identifiés proximaux souvent très volumineux (Pl. V , Fig. 14).

L'allongement de la durée de culture n'améliore pas les résultats et la présence de matériel somitique et nerveux se manifeste simplement par l'élaboration de côtes et de vertèbres.

Des stades 20 âgés ont été utilisés afin de préciser la vitesse d'élaboration des cartilages et éventuellement l'ordre d'apparition des divers éléments du squelette (Tableau VIII). Les résultats globaux quant à la qualité de la prestation réalisée ne diffèrent guère de ceux obtenus avec les bourgeons plus jeunes : l'autopode de membre antérieur montre un métacarpe le plus souvent complet et la première phalange d'au moins trois doigts. Exeptionnellement, nous avons observé trois doigts composés de deux phalanges (Pl.V,Fig.7). Le bourgeon postérieur donne des résultats inférieurs, dans la mesure où le métatarse ne comporte que rarement les cinq éléments constitutifs. De même le nombre total de phalanges est plus réduit. Le développement intermédiaire reste limité et on constate des fusions importantes au niveau des membres postérieurs. Si dans le cas du bourgeon antérieur, la durée de culture ne semble pas influencer le nombre d'éléments distaux différenciés, le nombre de métatarsiens et de phalanges observé au niveau de l'autopode postérieur paraît lié au temps passé in vitro. Il faut un minimum de deux jours pour obtenir la différenciation des premiers et un minimum de quatre jours pour obtenir la différenciation des secondes. Le basipode est très inégalement développé (Pl. V, Fig. 15).

Stade 21 : Avec les ébauches de stade 21, apparaît le développement optimal de l'autopode. Si, après huit jours de culture (Tableau IX) le basipode est rudimentaire, le métapode est complet et l'acropode se compose de cinq doigts. Les trois médians ont chacun trois phalanges, le doigt externe deux, tandis que le doigt interne

TABLEAU VII : DEVELOPPEMENT IN VITRO DE BOURGEONS DE STADE 20.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	3	6		1						3		1
	3	9		3	1					2		
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	3	6		2		1				2		3
	3	9		3	1					2		2
Bourgeon postérieur	4	6		4					1	2		
	2	9		2						2		
Bourgeon postérieur +somites+S.nerveux	4	6		4						2	2	2
	2	9		2					1	1		2

BUS LILLE

TABLEAU VIII : DEVELOPPEMENT IN VITRO DE BOURGEONS DE STADE 20 AGES.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	1	1			1							
	5	2							2	3		
	1	3			1							
	5	4							1	4		1
	1	5								1		
	3	6		1						2		
	2	7				1				1		1
	2	8					1			1		1
	4	9							1	3		1
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	4	2							2	2		4
	4	4								4		4
	2	6							1		1	1
	2	7							1	1		2
	2	8								1	1	1
	4	9								4		3
Bourgeon postérieur	1	1		1								
	5	2				2		1	2			
	1	3			1							
	4	4				1				3		1
	1	5							1			
	3	6			1				1	1		
	2	7								2		
	2	8			1							
	4	9								4		1
Bourgeon postérieur +somites+S.nerveux	4	2							3		1	3
	4	4							1	3		4
	2	6		1	1							1
	2	7								2		2
	2	8		2							2	
	4	9		1						3	1	3

BUS LILLE

TABLEAU IX : DEVELOPPEMENT IN VITRO DE BOURGEONS DE STADE 21.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	12	8		1	4		1			6		4
Bourgeon postérieur	12	8		1	1				1	8	1	

n'en contient qu'une (Pl. V , Fig. 8). L'autopode postérieur montre en général quatre doigts dotés de deux phalanges, le cinquième n'en comportant qu'une, se situe du côté interne (Pl. V , Fig. 16). Les éléments cartilagineux des segments intermédiaires sont très peu développés. La ceinture paraît énorme et on trouve à côté d'elle bon nombre de nodules non identifiables.

C - CONCLUSION

Dans les bourgeons de membres où aucune différenciation n'est visible, on constate après quelques jours de culture, l'apparition de tissu cartilagineux constituant des pièces squelettiques. Dans les meilleurs cas, l'organisation, la morphologie et les proportions de ces pièces sont très proches de celles des éléments du squelette normal : nous assistons à une véritable morphogenèse squelettique in vitro.

Comme dans l'ébauche de membre in utero, la différenciation cartilagineuse s'effectue dans le sens proximo-distal (Tableau II). Plus le bourgeon mis en culture est âgé, meilleure est sa morphogenèse distale, tant d'un point de vue quantitatif (nombre de phalanges) que d'un point de vue qualitatif (morphologie des osselets de l'autopode). Ce résultat ressort également des travaux de KOCHHAR et AYDELOTTE en 1974 et de AGNISH et KOCHHAR en 1977. Si l'autopode atteint un degré d'élaboration très élevé avec des bourgeons âgés, il en va tout autrement pour les segments intermédiaires. Dès le stade 20, se manifeste l'incapacité pour les ébauches de différencier les éléments du stylopode et du zeugopode. Cette observation n'apparaît pas dans le travail de KOCHHA et AYDELOTTE (1974) où les bourgeons de contrôle les plus âgés ont quarante-huit paires de somites (stade 19 âgé) mais AGNISH et KOCHHAR (1977) montrent une image de bourgeon mis en culture au douzième jour de gestation, où radius et cubitus sont mal différenciés. La technique utilisée ne permet donc pas aux bourgeons les plus âgés d'élaborer un squelette harmonieux. Pour les stades plus jeunes, la fréquence d'apparition de squelettes organisés est assez constante et se situe aux environs de 50 % des cas dans l'ébauche antérieure (seuls les stades 17 s'écartent de ce chiffre). Un séjour de six ou sept jours in vitro suffit pour obtenir une bonne organisation comme l'ont aussi observé AYDELOTTE et KOCHHAR (1972) , KOCHHAR et AYDELOTTE (1974), NEUBERT et coll. (1974), NEUBERT et RAUTENBERG (1976), AGNISH et KOCHHAR (1977) ; une durée de culture plus longue (neuf jours) n'améliore pas sensiblement la qualité de la prestation.

Enfin le développement de très jeunes bourgeons peut être considérablement amélioré par l'adjonction de matériel axial adjacent (Tableau III) comme l'ont également montré AGNISH et KOCHHAR en 1977 par culture de bourgeons associés à huit ou dix somites.

Dans ce travail, les auteurs montrent la participation effective des cellules somitiques à l'élaboration du stylopode. Chez la souris, l'intervention des somites in situ a été montrée par MILAIRE (1976) et HOUBEN (1976) au niveau du membre postérieur où des coulées cellulaires prennent part à la genèse des jeunes bourgeons. Le rôle du mésoderme somitique dans la morphogenèse du membre a, par ailleurs, été mis en évidence chez d'autres vertébrés.

Chez les batraciens, AMANO (1960), FINNEGAN (1963), BOURGEOIS et HOUBEN (1975) ont montré que des cellules somitiques participent à l'édification du membre d'urodèles tels que l'axolotl et le pleurodèle.

Chez les reptiles, l'ensemble des travaux effectués par RAYNAUD et ses collaborateurs (RAYNAUD, 1976) démontre l'importance des somites, il existe en effet une corrélation entre le nombre de prolongements somitiques colonisateurs du bourgeon et l'intégrité du membre final, une altération de la "fonction somitique" entraînant la rudimentation des ébauches de pattes. Chez les oiseaux, outre le rôle inducteur précoce des somites (KIENY, 1969, 1970, 1971) des études récentes ont prouvé que les cellules somitiques sont à l'origine de la scapula (CHEVALLIER, 1977) et de la musculature de l'aile (CHEVALLIER et col., 1977, 1978 ; CHRIST et coll., 1977). Le rôle des somites dans la morphogenèse des membres de vertébrés est donc indéniable mais il demeure difficile d'envisager un mode d'action commun : rôle inducteur, "fonction somitique", participation à l'élaboration de la musculature, participation à l'élaboration du squelette seront la base probable de nombreux travaux ultérieurs.

Il convient enfin de signaler l'effet bénéfique de la moitié ventrale du tube neural sur la chondrogenèse du mésoderme de jeunes bourgeons de pattes postérieures chez la souris (MILAIRE et MULNARD, 1968). Cette action peut s'être manifestée également dans nos cultures de bourgeons associés à du matériel axial.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE LA MORPHOGENESE DE MEMBRES DE SOURIS TRAITES A LA CYTOSINE ARABINOSIDE

Rappelons, avant d'exposer le détail des résultats, que chaque souris gravide reçoit l'agent tératogène vingt heures avant d'être opérée : une corne utérine est prélevée, les membres des embryons qu'elle contient sont mis en culture tandis que les autres embryons évoluent in situ jusqu'au quinzième jour de gestation (Tableau X).

I - DEVELOPPEMENT IN UTERO

A - INTRODUCTION

La cytosine arabinoside administrée à des femelles gravides pendant la phase critique du développement des membres conduit à des anomalies très diverses. Outre un cas de fissure palatine (Pl. VI , Fig. 1), l'examen de l'aspect externe des embryons soumis à l'action de cet agent tératogène nous conduit à recenser des malformations "fondamentales" telles la micromélie (membre court), l'ectrodactylie (nombre de doigts incomplet), l'adactylie (absence de doigts), la polydactylie (doigts surnuméraires), la syndactylie (doigts fusionnés), mais aussi diverses combinaisons de ces anomalies (Pl. VI , Fig. 2 à 6). Certains membres ont une morphologie normale tandis que d'autres, plus rares, ne sont atteints que de malformations très discrètes. Du tableau XI, il ressort que le membre antérieur est préférentiellement touché par des phénomènes de fusion (syndactylie),de réduction soit de longueur totale (micromélie) soit du nombre de ses doigts (adactylie, ectrodactylie). La réponse des membres postérieurs est beaucoup plus complexe, car, outre les régressions déjà observées, on trouve, au niveau du pied plusieurs cas de polydactylie, d'hypertrophie du doigt II (Pl. VI , Fig. 7) et de vésiculisation postaxiale (Pl. VI , Fig. 8) qui s'opposent à la notion de rudimentation évoquée plus haut. Ajoutons que ces phénomènes sont tous apparus à l'extrémité de membres micromèles.

Loin de simplifier l'identification et le classement de ces malformations, l'examen du squelette cartilagineux des foetus sacrifiés au quinzième jour nous apprend que l'action de la cytosine arabinoside se traduit soit par une modification de la forme, de la longueur,du nombre des éléments squelettiques, soit par une altération de leur différenciation. Dans ce cas le bleu de toluidine se fixe mal, les contours des pièces affectées ne sont pas nets.

B - RESULTATS

Le tableau XII rassemble les résultats obtenus en fonction des cinq paramètres qui nous ont paru les plus significatifs : l'aspect externe des membres, la qualité de différenciation cartilagineuse, la longueur des segments proximaux, le

TABLEAU X : TABLEAU RECAPITULATIF DES OPERATIONS EFFECTUEES SUR DES SOURIS TRAITEES A LA CYTOSINE ARABINOSIDE (25 mg/kg par injection intra-péritonéale 20 heures avant l'opération).

N° de manipulation	Nombre de témoins trouvés *in utero* au 15e jour de développement	Nombre de foetus prélevés pour la mise en culture de bourgeons de membre	Nombre et stade de développement des foetus prélevés
1	3	7	2 St. 15 5 St. 16
2	4	3	1 St. 17 1 St. 17 âgé 1 St. 18
3	5	7	3 St. 17 âgés 4 St. 18
4	7	3	3 St. 18
5	7	4	4 St. 19
6	4	3	3 St. 19
7	5	5	5 St. 19 âgés
8	6	6	6 St. 20
9	0 (Mort de la mère)	5	5 St. 17
10	0 (Mort de la mère)	12	11 St. 18 1 St. 19
11	0 (Mort de la mère)	4	4 St. 19

SUS

TABLEAU XI : ANOMALIES EXTERNES TOUCHANT LES MEMBRES DES EMBRYONS TRAITES A LA CYTOSINE ARABINOSIDE AYANT EVOLUE IN UTERO.

Type de membre	Normal	Micromélie	Adactylie	Ectrodactylie	Polydactylie	Syndactylie	Ectrodactylie + syndactylie	Polydactylie + syndactylie	Micromélie + anomalies distales	Hypertrophie préaxiale	Vésiculisation postaxiale
Membre antérieur	28	11	12	21	0	10	0	1	15	0	0
Membre postérieur	20	12	1	18	6	12	5	6	30	10	5

BUS CLUE

nombre des osselets du basipode et le nombre des rayons de l'autopode. Le Tableau XIII permet de comparer les effets de la cytosine arabinoside injectée à divers stades de la mise en place des bourgeons.

1) Lorsque l'injection se fait au cours du neuvième jour de gestation, (manipulation 1) c'est-à-dire pendant la mise en place du bourgeon antérieur (St. 13 à 14), on décèle des anomalies squelettiques mineures qui n'ont aucune répercussion sur l'aspect externe des membres antérieurs (Pl.VII, Fig. 2) ou postérieurs (Pl.VIII, Fig. 2). Le cartilage paraît normalement différencié. La taille de tous les segments est légèrement réduite mais leurs proportions ne semblent pas affectées. Il n'y a pas de soudure au niveau desarticulationsmais le radius (4 cas sur 6) et le tibia (2 cas sur 6) subissent une torsion discrète vers l'intérieur. Les éléments de l'autopode sont parfaitement différenciés même lorsque le rayon n° 1 manque (au niveau de deux membres postérieurs).

2) Si l'injection est pratiquée au moment où le bourgeon antérieur commence à croître et où le bourgeon postérieur se met en place (St. 15 et 16) les membres obtenus in utero lors d'une première expérience (manipulation 2) sont tous de petite taille, l'autopode antérieur a un aspect normal mais deux ou trois rayons distaux manquent à l'autopode postérieur. La différenciation squelettique cartilagineuse est normale au niveau du membre antérieur (Pl. VII, Fig. 3), mais limitée dans les membres postérieurs Pl. VIII,Fig.3). Cette micromélie est due à un raccourcissement très marqué des segments proximaux (stylopode et zeugopode). Enfin, il existe des fusions au niveau du coude (2 cas sur 8). En outre, l'autopode antérieur en apparence complet, montre un squelette où le basipode est réduit et où le rayon I est absent dans trois cas sur huit.

Le membre postérieur ne contient aucun squelette organisé, chaque segment y est représenté par un nodule mal différencié.

Une seconde expérience (manipulation 3) donne des résultats peu comparables : l'aspect externe des membres antérieurs paraît normal, les membres postérieurs sont plus courts que chez les témoins de quinze jours. Les autopodes antérieurs et postérieurs paraissent complets. Or l'examen de détail des squelettes,lorsque leurs éléments sont apparents,révèle une très mauvaise différenciation cartilagineuse (Pl. VII, Fig. 4 et Pl. VIII,Fig. 4). De plus, au niveau du membre antérieur, on observe une réduction de la longueur du zeugopode, une absence totale de basipode, une réduction du nombre des rayons distaux. Le squelette du membre postérieur est plus affecté : stylopode et zeugopode sont courts lorsqu'ils existent, les éléments les plus distaux de l'autopode toujours absents.

TABLEAU XII

Numéro de la manipulation	Stade à l'opération des foetus prélevés	Stade approximatif à l'injection	Nombre de foetus restés in utero dans chaque manipulation	Membres ant. ou post.	Aspect externe des membres						Différenciation cartilagineuse du squelette															Longueur des éléments cartilag.proxim.				Nombre d'éléments		Nombre de rayons distaux		
					Micromélie	Syndactylie	Ectrodactylie	Adactylie	Polydactylie	Normal	Stylopode			Zeugopode			Basipode			Métapode			Acropode			Stylopode		Zeugopode		Basipode		Métapode+Acropode		
											N	M	n	N	M	n	N	M	n	N	M	n	N	M	n	N	R	N	R	N	R	N	R	>N
M n° 1	15-16	13-14	3	A						6	6			6			6			6			6				6		6	6		6		
				P						6	6			6			5		1	6			6				6		6	6		4	2	
M n° 2	17,17-18,18	15-16	4	A	8						8			8			6		2	8			8				8		8	2	6	5	3	
				P	8		7	2				8			8			7	1		7	1		4	4		8		8		7		7	
M n° 3			5	A						10		10			10				10		8	2		7	3	10			10		10		8	
	"	"		P	10							8	2		7	3		5	5		2	8			10		8		7		5		2	
M n° 4	18	16	7	A	14	9	3		1		14			14			2		12	14			14			12	2		14		2	5	9	1*
				P	14	2	11		1			5	9		11	3		6	8		14			14			5		11		6		14	
M n° 5	19	17	7	A		3	1			10	14				14				14		10	4		8	6	14			14			6	4	
				P	14	3			9		13		1		11	3		6	8		6	8		2	12	2	11		11		6	3	3	
M n° 6			4	A						8	8			8			8			8			8			8		8		8		8		
	"	"		P						8	8			8			8			8			8			8		8		8		8		
M n° 7	19-20	17 âgé	5	A		1	10				10			10			10			10			10			10		10			10	1**	9	
				P		2	7			1	10				10			10			10			10		10		8	2	6	4	2	8	
M n° 8	20	18	6	A				12			12			12					12			12			12	12			12					
				P	12	9	7				12				12			10	2			12			12	12			12		12			

LEGENDE : N : Normal
M : Médiocre
n : nulle
R : Réduit

* Le nombre de métacarpiens est correct bien que ce membre présente un doigt supplémentaire contenant une phalange.

** Ce membre présente 5 métacarpiens pour 4 doigts.

TABLEAU XIII

Cartilage bien différencié

Cartilage mal différencié

Témoins 15 jours	Stade des embryons à l'injection					
	13 - 14	15 - 16	16	17	17 âgé	18
antérieur						
postérieur						

LILLE

3) Si les embryons subissent le traitement lorsque le bourgeon postérieur est bien visible (St. 16), les membres au 15e jour (manipulation 4), tous micromèles, montrent également des anomalies distales : syndactylie pour les membres antérieurs (9 cas sur 14) et ectrodactylie pour les membres postérieurs (11 cas sur 14) sont les plus fréquentes. Dans les deux types de membres on trouve aussi un exemple de polydactylie, mais les pattes postérieures sont les seules à présenter une hypertrophie du doigt II (7 cas), ainsi qu'une vésiculisation postaxiale (5 cas). La différenciation cartilagineuse est normale au sein des membres antérieurs . Le raccourcissement observé est dû à une réduction importante de la taille du zeugopode,par ailleurs toujours soudé au stylopode,ainsi qu'à une réduction discrète de ce dernier segment (Pl.VII, Fig. 5). Le basipode est toujours incomplet et les autopodes où il manque des rayons distaux sont les plus nombreux.

C'est dans la partie distale des pattes postérieures que s'est élaboré le "cartilage le plus colorable". Bien que médiocre, la différenciation du squelette (Pl.VIII, Fig. 5) permet d'expliquer la micromélie par le raccourcissement du stylopode et du zeugopode, et de confirmer la tendance à l'ectrodactylie par la perte générale du rayon I associée à celle du rayon V quand se manifeste le phénomène de vésiculisation postaxiale. Le squelette du doigt II hypertrophié paraît normal.

4) Quand la cytosine arabinoside agit sur des bourgeons de foetus parvenus au stade 17, (Manipulation 5) l'aspect externe des membres antérieurs au quinzième jour de gestation apparaît normal dans la majorité des cas, les quelques anomalies distales observées traduisent une tendance à la réduction du nombre de doigts (Pl.VII, Fig. 6). La différenciation squelettique cartilagineuse ne s'est pas opérée normalement dans l'autopode ; le basipode notamment est toujours absent. A l'examen de détail on remarque que le zeugopode est plus court que chez les témoins : la zone d'ossification trouvée normalement au milieu de ce segment est décallée vers son extrémité distale. Proximalement à cette zone d'ossification la patte est normale : on ne note aucune altération de l'articulation entre le stylopode et le zeugopode. Le nombre des rayons distaux lorsqu'ils existent, est souvent réduit.

Les membres postérieurs sont tous micromèles, ils possèdent des autopodes atteints de polydactylie (9 cas sur 14) dont trois avec syndactylie. Ils ne contiennent pas de cartilage normal en dehors du stylopode. La micromélie qui les affecte est due à une réduction de la longueur du stylopode et du zeugopode. Le tibia, dans certains cas, subit une torsion vers l'intérieur. L'examen de l'autopode ne révèle jamais la présence de rayons squelettiques surnuméraires. Au contraire, ceux qui sont observables sont mal différenciés et en nombre réduit (Pl.VIII, Fig. 6).

La manipulation 6 effectuée sur des embryons de stade équivalent conduit à des membres parfaitement normaux tant du point de vue de la morphologie, que du point de vue de la constitution squelettique (Pl.VII, Fig. 7 et Pl.VIII, Fig. 7). Tout se passe comme si la souris n'avait pas reçu l'agent tératogène.

5) Si les foetus sont un peu plus âgés au moment de l'injection (St. 17 âgé) (Manipulation 7) on voit que les malformations produites sont confinées au niveau de l'autopode sous forme d'ectrodactylie. Les membres antérieurs (Pl. VII, Fig. 8) contiennent du cartilage bien élaboré. La longueur des différents segments est correcte mais le nombre des éléments du basipode est toujours réduit : les osselets proximaux sont présents, mais ceux de la rangée distale disparaissent. Les rayons distaux sont en nombre restreint et la longueur des métacarpiens est inférieure à celle des témoins. Au niveau des membres postérieurs (Pl.VIII,Fig. 8), la différenciation du cartilage apparaît moins poussée à partir de l'extrémité distale du zeugopode : deux membres sur les dix étudiés montrent par ailleurs une réduction de la taille de ce segment. Le basipode, comporte un nombre d'éléments complet, mais le rayon distal I fait défaut dans la plupart des cas.

6) Lorsque les bourgeons sont traités au stade 18, (Manipulation 8), les membres antérieurs obtenus apparaissent tous dépourvus de doigts (Pl.VII, Fig. 9). Leurs cartilages, quand ils existent sont bien différenciés, le stylopode est normal mais le zeugopode est légèrement raccourci. L'étude du squelette révèle de plus que l'ensemble de l'autopode, et non seulement l'acropode, disparaît (huit pattes possèdent quelques nodules cartilagineux distaux, mais il est impossible de les identifier). Les membres postérieurs sont courts, il ne leur reste qu'un nombre incomplet de doigts souvent fusionnés (Pl.VIII,Fig.9). Le cartilage n'est bien différencié qu'au niveau du stylopode qui apparaît de longueur correcte. Le zeugopode est court, le nombre des osselets du basipode est réduit et il n'existe pas de cartilage dans le métapode et l'acropode.

C) CONCLUSION

De ces résultats, il ressort que pour des traitements supposés équivalents à des stades identiques, nous n'avons pas obtenu toujours les mêmes réponses. Certains foetus ont des membres morphologiquement normaux pourvus d'un squelette peu ou pas altéré, alors que dans une autre série, comparable quant aux conditions expérimentales, les malformations sont très importantes (Manipulations 2 et 3, Manipulations 5 et 6).

Injectée avant la phase de croissance du bourgeon, la cytosine arabinoside a des effets bénins, les membres touchés sont en quelque sorte "miniaturisés", mais injecté alors que le bourgeon émerge du flanc du foetus, ce produit devient hautement tératogène. Si le bourgeon est encore jeune quand il subit le traitement, tous les éléments

du squelette élaboré seront réduits et déformés. Avec le vieillissement du bourgeon, on observe la distalisation des anomalies, le stylopode d'abord, le stylopode et le zeugopode ensuite,seront préservés au détriment de l'autopode qui est le dernier à être atteint (Tableau XIII). Nous remarquons cependant que les membres touchés dans leurs segments intermédiaires peuvent élaborer des autopodes normaux. Tout se passe comme si l'agent tératogène agissait sur les cellules au début de leur différenciation pendant leur phase de multiplication, les cellules non déterminées, à l'origine des structures distales, restant saines ou se montrant aptes à compenser les effets de la cytosine arabinoside.

Cette hypothèse a été formulée dans les travaux de KOCHHAR (1978) où l'on retrouve les mêmes descriptions de malformations consécutives à l'injection de l'agent tératogène. Selon cet auteur, le niveau atteint dépend de l'âge de l'embryon lors du traitement, la fréquence d'apparition des anomalies est fonction de la dose administrée. Mais il ne signale pas l'existence éventuelle d'une intensification des malformations d'un niveau donné liée aux paramètres d'injection. Nos observations montrent pourtant clairement une phase qui pourrait être intermédiaire dans une échelle d'intensité de l'action tératogène : de nombreux membres contiennent un cartilage mal différencié au niveau des segments touchés. Cette mauvaise différenciation ressemble étonnamment à celle obtenue par MERKER et coll. (1978) après culture de bourgeons de membres de souris en présence de 4-Methylum-belliferyl-β-D-xylopyranoside et une étude détaillée de la chondrogenèse en présence de cytosine arabinoside apporterait sans doute des informations intéressantes.

On remarquera enfin que pour des degrés de développement équivalents au moment de l'injection, le bourgeon de membre postérieur paraît beaucoup plus sensible : la différenciation cartilagineuse y est plus fréquemment anormale, les malformations distales plus complexes , telles ces vésicules que MANSON et col. (1977) ont également observées in utero et in vitro après administration de 40 mg/kg de cytosine arabinoside.

II - DEVELOPPEMENT IN VITRO

A - INTRODUCTION

Avant d'exposer le détail de ces résultats, il convient d'apporter quelques précisions à propos des circonstances expérimentales. L'une des onze souris traitées n'a pas supporté l'anesthésie et deux autres sont mortes au cours des heures qui ont suivi l'intervention. Dans le premier cas (Manipulation 10), tous les foetus ont été récupérés et leurs bourgeons de membres mis en culture. Dans le second cas (Manipulations 9-11) les embryons contenus dans la corne utérine prélevée ont été exploités. Mais dans ces trois séries, les témoins in utero manquent.

Dans plusieurs de nos manipulations, les stades de développement atteints par les foetus provenant d'une même souris ne sont pas identiques (Tableau X) (La cytosine arabinoside n'est peut être pas étrangère à ce "déphasage"). Ces différences n'ont pu être perçues au niveau des individus de la portée laissés in utero mais il faut souligner que le degré de développement des embryons en fin d'expérience est très homogène. Il nous a donc paru intéressant d'étudier les résultats des cultures in vitro en fonction du stade des bourgeons au moment de leur prélèvement, c'est-à-dire en regroupant des échantillons d'origines différentes, avant de les examiner en fonction de leur appartenance à l'une ou l'autre des séries.

Signalons enfin que vingt échantillons cultivés ont été détruits par contamination et huit perdus parce qu'ils se sont décollés du support.

B - RESULTATS DES CULTURES EN FONCTION DU STADE DES BOURGEONS AU MOMENT DES PRELEVEMENTS

1) Stade 15 et Stade 16

Compte tenu des résultats obtenus en culture de très jeunes bourgeons non traités, pour les membres antérieurs, nous avons utilisé des explants comportant du matériel somitique et nerveux. Pour les membres postérieurs, nous avons mis en culture toute la partie postérieure du corps, sans séparer les deux ébauches, en éliminant simplement la queue.

- Stade 15

Après dix jours de culture (Tableau XIV), aucune des ébauches de membre antérieur n'a différencié de cartilage mais la zone postérieure exploitée contient cinq nodules non identifiés.

TABLEAU XIV : DEVELOPPEMENT IN VITRO DE BOURGEONS DE STADE 15 PREALABLEMENT TRAITES A LA CYTOSINE ARABINOSIDE.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	2	10	2									
Zone postérieure	1	10		1								

TABLEAU XV : DEVELOPPEMENT IN VITRO DE BOURGEONS DE STADE 16 PREALABLEMENT TRAITES A LA CYTOSINE ARABINOSIDE.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	4	10		4								
Zone postérieure	2	10		2								

- Stade 16

Le développement de ces bourgeons (Tableau XV) se limite à l'élaboration de quelques nodules non identifiés : un à trois pour les membres antérieurs (Pl. IX, Fig. 1), six et sept pour les zones postérieures (Pl. IX , Fig. 2).

2) Stade 17

- Jeunes stades 17

Les bourgeons ne différencient de cartilage que s'ils sont accompagnés de matériel axial (Tableau XVI). Dans ces cas favorables, on trouve des nodules non identifiables ainsi que des rudiments de vertèbres mais la fréquence avec laquelle se différencient ces éléments est très faible : deux sur huit pour les ébauches antérieures (Pl. IX , Fig. 3), un sur dix pour les ébauches postérieures (Pl. IX , Fig. 4).

- Stades 17 âgés

L'évolution de ces bourgeons in vitro peut conduire à des explants qui contiennent du cartilage bien différencié, parfois même organisé (Tableau XVII).

- Les bourgeons antérieurs, après six jours de culture, contiennent toujours du cartilage même s'il ne s'agit que de nodules non identifiables. L'explant, laissé sept jours, montre une ébauche de squelette proximal où l'on reconnaît ceinture et stylopode. L'adjonction de matériel somitique et nerveux permet un développement équivalent (Pl. IX, Fig. 5). Un membre montre cependant une ceinture, un stylopode prolongés par un zeugopode rudimentaire et trois nodules distaux mal différenciés (par conséquent non identifiables) (Pl. IX , Fig. 6).

- Les bourgeons postérieurs isolés, mis en culture, n'élaborent que des nodules non identifiables. Associé à du matériel axial on trouve en plus quelques vertèbres (Pl. IX , Fig. 7), un explant atteint le niveau autopode avec un zeugopode réduit (Pl. IX, Fig. 8).

L'élaboration d'un squelette organisé reste plus rare au sein des bourgeons postérieurs (un cas sur huit) qu'au sein des bourgeons antérieurs (trois cas sur huit) et semble conditionnée par la présence de mésoderme somitique et de système nerveux.

3) Stade 18

Les bourgeons antérieurs isolés, élaborent un squelette organisé dans la plupart des cas (Tableau XVIII). On y reconnaît facilement la scapula sur laquelle se soude un humérus ayant parfois subit une torsion importante vers l'extérieur. Le zeugopode, vestigial, est soudé au stylopode, conférant à cette partie du squelette une forme de Y . L'extrémité du membre est allongée et comporte une palette distale dont le contour ne montre aucune indentation pouvant révéler l'apparition imminente de doigts. Elle contient dans trois cas sur dix-sept des nodules mal différenciés (Pl. IX , Fig. 9). Dans un seul cas, des éléments figurant deux rayons digitaux prolongent un zeugopode

TABLEAU XVI : DEVELOPPEMENT *IN VITRO* DE BOURGEONS DE STADE 17 PREALABLEMENT TRAITES A LA CYTOSINE ARABINOSIDE.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	3	6	3									
Bourgeon antérieur	4	6	3	1							1	
+ somites+S.nerveux	1	7		1							1	
Bourgeon postérieur	4	6	5									
Bourgeon postérieur	5	6	5									
+ somites+S.nerveux	1	7		1							1	

BIBLIOTHÈQUE

TABLEAU XVII : DEVELOPPEMENT IN VITRO DE BOURGEONS DE STADE 17 AGE, PREALABLEMENT TRAITES A LA CYTOSINE ARABINOSIDE.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	3	6		3								
	1	7				1						
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	3	6		1				1			1	1
	1	7				1						1
Bourgeon postérieur	3	6	2	1								
	1	7		1								
Bourgeon postérieur +somites +S.nerveux	3	6	2					1				1
	1	7		1							1	

TABLEAU XVIII : DEVELOPPEMENT IN VITRO DE BOURGEONS DE STADE 18, PREALABLEMENT TRAITES A LA CYTOSINE ARABINOSIDE.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	16	6		3	1	1	8	3	1			6
	1	7		1								
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	18	6		1		3	5	7	1	1		16
	1	7									1	
Bourgeon postérieur	18	6	3	8		4	3					1
	1	7		1								
Bourgeon postérieur +somites +S.nerveux	18	6	1	7	1	4	4			1	4	10
	1	7		1							1	

plus développé (Pl. IX , Fig. 10).

La description des bourgeons antérieurs de stade 18 cultivés en présence de matériel axial correspondrait en tous points à celle qui vient d'être formulée dans le paragraphe précédent (Pl. IX , Fig. 11). Il faut cependant signaler que deux explants présentent une différenciation du zeugopode plus importante, de même qu'une ébauche de squelette élaboré au niveau de l'autopode (Tableau XVIII) (Pl. IX , Fig. 12).

Les bourgeons postérieurs de stade 18 ont un développement plus modeste (Tableau XVIII) : la plupart (neuf sur dix-neuf) ne différencient que de gros nodules cartilagineux dont la forme ne permet pas l'identification (Pl. IX, Fig. 13). Lorsque l'organisation du squelette apparaît, seule la ceinture et le stylopode sont présents, le zeugopode n'existe dans trois cas que sous forme de petits nodules. Comme pour le bourgeon antérieur, l'ébauche postérieure montre une palette distale arrondie ne contenant pas de cartilage (sauf dans le cas évoqué plus haut). Signalons enfin que deux explants possèdent une cavité creusée à l'intérieur de l'autopode, juste sous l'épiderme et décallée par rapport à l'axe proximo-distal (Pl. IX , Fig. 14). Il est impossible de préciser si ce "vide" se situe en position préaxiale ou postaxiale.

Lorsque les bourgeons postérieurs sont associés aux somites adjacents et à du tube neural (Tableau XVIII) le cartilage élaboré est abondant même si l'identification est parfois impossible (huit cas sur dix-neuf). Quand un squelette se forme, on constate qu'il est composé de vertèbres, d'une ceinture souvent rudimentaire, d'un stylopode court et massif et plus rarement d'un zeugopode réduit, intégré au stylopode (Pl. IX , Fig. 15). La palette distale est présente mais dépourvue de cartilage sauf dans un cas où l'on distingue, en vue externe, l'amorce d'une digitation et la présence d'un métatarsien sur lequel s'articulent deux phalanges (Pl. IX , Fig. 16).

De nouveau, nous pouvons constater que le bourgeon antérieur fournit une meilleure prestation que le bourgeon postérieur, mais aussi, que l'adjonction de matériel axial aux explants, a deux conséquences : les développements nuls ou limités à des nodules non identifiés diminuent,le squelette est mieux élaboré et davantage d'explants atteignent les niveaux les plus distaux.

4) Stade 19

- Jeunes stades 19 (Tableau XIX)

Les éléments cartilagineux différenciés par les bourgeons antérieurs isolés sont bien individualisés dans la plupart des cas. Ils constituent un squelette où ceinture, stylopode et zeugopode sont présents (huit cas sur douze). Ce dernier segment paraît normal dans quatre explants (Pl. IX , Fig.17) alors qu'il est réduit dans les autres (Pl. IX , Fig. 18). Des nodules de petite taille occupent la palette distale de six membres, mais parmi eux, un seul ressemble vraiment à un métacarpien (Pl. IX , Fig. 19).

TABLEAU XIX : DEVELOPPEMENT IN VITRO DE BOURGEONS DE STADE 19, PREALABLEMENT TRAITES A LA CYTOSINE ARABINOSIDE.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	9	6		2			1	6				
	1	7							1			1
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	9	6			1	2	1	5				6
	1	7							1			1
Bourgeon postérieur	9	6	5	3				1				
	1	7						1				
Bourgeon postérieur +somites +S.nerveux	9	6	3	4				1			2	1
	1	7							1			1

Le développement squelettique des bourgeons antérieurs associés aux somites adjacents et à du système nerveux est assez semblable : ceintures et stylopodes paraissent mieux élaborés que le zeugopode toujours rudimentaire sauf dans un cas où il est d'ailleurs prolongé par un métacarpien bien reconnaissable (Pl.IX , Fig.20). Des nodules distaux non identifiables complètent cinq de ces squelettes.

Les bourgeons postérieurs qui ont différencié du cartilage sont peu nombreux (cinq sur dix) (Pl.IX , Fig. 21). Les squelettes organisés sont rares (deux cas sur les cinq) mais harmonieux : le niveau autopode est atteint dans les deux membres et les segments proximaux sont normaux. L'un de ces deux échantillons possède une vésicule à l'extrémité de sa palette distale.

Les bourgeons postérieurs cultivés en présence de matériel axial ont donné du cartilage dans sept cas sur douze, sur les sept explants quatre ne contiennent que des nodules non identifiés. Les trois dernières prestations comportent un développement strictement limité aux vertèbres et deux squelettes harmonieux montrent une ébauche d'autopode (Pl.IX , Fig. 22).

Les bourgeons antérieurs de stade 19 préalablement traités à la cytosine arabinoside, ont un développement <u>in vitro</u> qui, incontestablement, reste très supérieur à celui des bourgeons postérieurs. Il semble qu'ils se "libèrent" de l'influence des tissus axiaux, les prestations réalisées en présence ou en absence de mésoderme somitique et de tissu nerveux étant sensiblement les mêmes (excepté au niveau de l'élaboration des vertèbres ou des côtes).

- <u>Stades 19 âgés</u> (Tableau XX)

Les résultats obtenus avec les bourgeons antérieurs isolés sont très homogènes : les cinq explants montrent un squelette harmonieux où ceinture, stylopode et zeugopode sont tout à fait normaux. L'autopode est formé d'une palette contenant de deux à six nodules non identifiables de petite taille.

Associés à du matériel axial, les bourgeons antérieurs ont un développement similaire (sauf dans un cas où la palette distale reste vide) (Pl. IX , Fig. 23).

Les bourgeons postérieurs mis en culture ont tous élaboré du cartilage, mais un seul des éléments observés ressemble à une pièce squelettique appartenant au bassin.

Les résultats obtenus avec les bourgeons postérieurs cultivés en présence de matériel axial ne sont guère meilleurs : les explants contiennent toujours des éléments cartilagineux non identifiables d'après leur forme, excepté dans deux cas où, parmi eux, des vertèbres sont reconnaissables (Pl.IX , Fig.24).

La lecture du tableau XX met de nouveau en évidence, la médiocrité du développement des membres postérieurs. Les autopodes antérieurs semblent incapables

TABLEAU XX : DEVELOPPEMENT IN VITRO DE BOURGEONS DE STADE 19 AGE, PREALABLEMENT TRAITES A LA CYTOSINE ARABINOSIDE.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	5	6						5				
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	5	6				1		4				4
Bourgeon postérieur	5	6		4	1							
Bourgeon postérieur +somites +S.nerveux	5	6		5							2	

d'élaborer un squelette organisé. En outre, les somites et le système nerveux adjacents aux bourgeons n'influencent pas le développement du membre.

5) Stade 20 (Tableau XXI)

Les bourgeons antérieurs isolés ont un développement harmonieux, les différents segments squelettiques sont représentés avec des proportions normales. Au niveau de l'autopode, on trouve un maximum de trois métacarpiens allongés (quatre cas sur six) et une phalange distale en position médiane (cinq cas sur six). Le basipode est mal individualisé.

La partie proximale des membres antérieurs obtenus par culture de bourgeons associés au matériel axial se compose d'une ceinture, d'un stylopode et d'un zeugopode bien différenciés, aux proportions harmonieuses. Le basipode, lorsqu'il apparaît (trois cas sur six) n'est formé que d'un ou deux nodules. Le métapode montre au plus trois axes cartilagineux distincts (Pl. IX , Fig. 25). De l'acropode, il ne subsiste qu'une phalange médiane dans trois des quatre explants ayant atteint ce niveau, alors que le dernier en possède deux articulés sur un métacarpien large (probablement issu d'une fusion) (Pl. IX, Fig. 26).

Parmi les six bourgeons postérieurs exploités, nous n'avons trouvé qu'un seul explant où le cartilage ne soit pas identifiable. Deux autres membres contiennent des éléments proximaux normaux et un zeugopode réduit ; l'autopode manque.

BUS LILLE

Le squelette des trois derniers membres est harmonieux, les différents segments sont représentés, même au niveau de l'autopode, où l'on note cependant une réduction du nombre des rayons distaux (deux métatarsiens et une phalange dans les deux meilleurs cas) (Pl. IX , Fig. 27).

Les bourgeons postérieurs associés au matériel axial ont un développement analogue à celui des bourgeons isolés (Pl. IX , Fig. 28). Sur les six explants obtenus, quatre ont élaboré un squelette harmonieux avec des osselets appartenant à l'autopode. Si le basipode n'est pas toujours individualisé, on trouve, en revanche, deux ou trois métatarsiens et une phalange terminale.

A l'examen des résultats de cette série expérimentale, on est avant tout frappé par l'étonnante homogénéité des prestations, qu'il s'agisse de membres antérieurs ou postérieurs : seul l'autopode est incomplet , son squelette montrant invariablement une réduction du nombre des rayons distaux et une réduction du nombre des éléments de l'acropode.

6) Conclusion

Les deux points qui nous paraissent les plus intéressants à l'examen de ces résultats sont : a) l'étude des prestations "moyennes" obtenus à partir des différents stades c'est-à-dire le niveau distal atteint le plus fréquemment (ou, à défaut les éléments

TABLEAU XXI : DEVELOPPEMENT IN VITRO DE BOURGEONS DE STADE 20, PREALABLEMENT TRAITES A LA CYTOSINE ARABINOSIDE.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	6	7							1	5		
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	6	7							2	4		6
Bourgeon postérieur	6	7		1			2	1		2		
Bourgeon postérieur +somites +S.nerveux	6	7		1		1			1	3	1	5

cartilagineux non identifiés) ;

b) l'étude des cas où le développement est nettement supérieur à la moyenne. .

a) Un tableau récapitulatif (n° XXII) nous permettra de mieux aborder le premier point.

Pour les bourgeons antérieurs, le développement atteint un niveau d'autant plus distal que le stade de prélèvement est âgé . Mais l'adjonction de matériel axial aux explants permet d'obtenir de meilleures prestations pour les stades équivalents pourvu qu'ils soient antérieurs au stade 19.

Pour les bourgeons postérieurs il faut attendre le stade 20 pour obtenir brusquement des squelettes organisés. La présence de somites et de système nerveux n'améliore pas sensiblement la qualité des résultats.

b) Le premier exemple du manque d'homogénéité dans les résultats se situe dans l'étude des prestations obtenues à partir de bourgeons de stade 17 âgés. Dans ce groupe, deux explants, l'un antérieur, l'autre postérieur ont atteint le niveau autopode. Parmi les stades 18 la prestation de trois bourgeons antérieurs et deux postérieurs dépasse la moyenne. Enfin, on trouve deux membres antérieurs et quatre postérieurs "trop bien" organisés parmi les stades 19.

Le Tableau XXIII récapitule ces observations en indiquant le numéro de l'échantillon ainsi que sa provenance.

Deux commentaires s'imposent : a) ces développements particulièrement intéressants ne sont pas dus au hasard et sont à rapprocher des résultats semblables récapitulés dans le tableau XII ;

b) ces observations mettent en relief l'intérêt d'une analyse complémentaire des prestations obtenues en fonction de l'origine des bourgeons.

C - RESULTATS DES CULTURES EN FONCTION DE L'ORIGINE DES BOURGEONS

1) Manipulation 1

Cette première série regroupe des bourgeons de stades 15 et 16. Si le stade le plus âgé élabore le nombre de nodules le plus important, il faut noter qu'il n'existe aucune organisation squelettique issue de l'ensemble des cultures de jeunes bourgeons traités (Tableau XXIV) (Pl. IX , Fig.1 et 2). L'étude histologique des bourgeons antérieurs témoins de cette série montre une crête apicale large et épaisse sur un mésoderme diffus où la pycnose est faible (Pl. X , Fig. 1). Les bourgeons postérieurs n'ont pas encore d'A.E.R., le mésoderme apparaît sain.

2) Manipulation 2

Les ébauches de membres des trois embryons de cette série ont eu un comportement plus complexe : les bourgeons antérieurs ont donné des prestations différentes les unes des autres (Pl. IX , Fig. 3 et 5), alors que les bourgeons postérieurs (Pl.IX , Fig. 4 et 7) ont tous élaboré des nodules non identifiables (Tableau XXV). On constate cependant que l'association des bourgeons avec du matériel axial a toujours conduit à la mise en place de vertèbres.

TABLEAU XXII : NIVEAU DE DEVELOPPEMENT LE PLUS FREQUEMMENT ATTEINT EN FONCTION DU STADE ET DE LA NATURE DES EXPLANTS.

	Stade 15	Stade 16	Stade 17	Stade 17âgé	Stade 18	Stade 19	Stade 19âgé	Stade 20
Bourgeon antérieur			0	NI : 3/4	Z : 8/17	A : 7/12	A : 5/5	A : 6/6
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	0	NI : 4/10	NI : 2/6	S 1/4	A : 9/19	A : 6/12	A : 4/5	A : 6/6
Bourgeon postérieur			0	NI : 2/4	NI : 9/19	NI : 3/12	NI : 4/5	A : 3/6
Bourgeon postérieur +somites +S.nerveux	NI : 1/2	NI : 2/5	NI : 1/6	NI : 1/4	NI : 8/19	NI : 4/12	NI : 5/5	A : 4/6

Légende
NI : non identifié
S : stylopode
Z : zeugopode
A : autopode

TABLEAU XXIII

St. 17 âgé	B.antérieur	64-13b	Manipulation 3	Embryon n° 13
	B.postérieur	64-16d	Manipulation 3	Embryon n° 16
St. 18	B.antérieur	64-14a	Manipulation 3	Embryon n° 14
		64-14b	Manipulation 3	Embryon n° 14
		64-11b	Manipulation 3	Embryon n° 11
	B.postérieur	65-7c	Manipulation 10	Embryon n° 7
		65-7d	Manipulation 10	Embryon n° 7
St. 19	B.antérieur	67-4a	Manipulation 6	Embryon n° 4
		67-4b	Manipulation 6	Embryon n° 4
	B.postérieur	67-4c	Manipulation 6	Embryon n° 4
		67-4d	Manipulation 6	Embryon n° 4
		65-2c	Manipulation 10	Embryon n° 2
		65-2d	Manipulation 10	Embryon n° 2

TABLEAU XXIV : DEVELOPPEMENT IN VITRO DES BOURGEONS DE MEMBRES ISSUS DE LA SOURIS n° 1.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	6	10	2	4								
Zone postérieure	3	10		3								

TABLEAU XXV : DEVELOPPEMENT IN VITRO DES BOURGEONS DE MEMBRES ISSUS DE LA SOURIS n° 2.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	3	7	1	1		1						
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	3	7		1		1					2	1
ourgeon postérieur	3	7	1	2								
ourgeon postérieur somites +S.nerveux	3	7		3							3	

Le développement in vitro des bourgeons de cette série est donc extrêmement réduit. Le témoin traité en histologie montre des bourgeons antérieurs dont l'A.E.R. hypertrophiée mais non saillante à l'extérieur, est décalléee sur la face ventrale de l'ébauche. Le mésoderme distal est pycnotique (Pl. X , Fig. 2). Les bourgeons postérieurs de cette série n'ont pu être exploités.

3) Manipulation 3 (Tableau XXVI)

Les bourgeons de membre antérieur isolés n'élaborent que des nodules non identifiés dont le seul point commun est d'être de grosse taille (cinq cas sur six). Un des explants présente une organisation squelettique atteignant l'autopode, mais les segmen proximaux sont larges et fortement soudés les uns aux autres.

Outre la formation de vertèbres, les bourgeons antérieurs associés à du matériel axial peuvent donner des membres au squelette organisé qui comporte des éléments d'autopode (trois cas sur sept) ce dernier reste cependant très rudimentaire et contraste avec les pièces cartilagineuses massives des autres segments(Pl.IX,Fig.6et12)

Le développement des bourgeons postérieurs isolés est nul dans cinq cas sur sept. Les nodules formés dans les deux derniers explants ne sont pas identifiables (Pl.IX , Fig. 13).

Un seul des bourgeons postérieurs associés à du matériel axial a fourni une prestation intéressante où l'on observe en plus des vertèbres, une ceinture, un axe stylopode-zeugopode massif et une ébauche d'autopode (Pl. IX, Fig. 8). Les autres bourgeons ne se sont pas développés correctement. Les bourgeons de cette série semblent donc avoir réagi selon une loi du tout ou rien : cinq d'entre eux présentent un squelette massif, presque complet alors que les vingt-deux autres sont restés à l'état indifférencié. L'A.E.R. des bourgeons témoins est normale, on ne décèle qu'une pycnose très discrète dans le mésoderme (Pl. X, Fig. 3).

4) Manipulation 4 (Tableau XXVII)

Les membres antérieurs formés à partir de bourgeons isolés ont une ceinture et un humérus normaux, mais le zeugopode est extrêmement réduit. La palette distale ne montre pas d'organisation squelettique nette. Dans un des deux explants, elle contient un nodule mal différencié.

Associés à du matériel axial, les bourgeons antérieurs évoluent en membres qui présentent les mêmes caractéristiques : le développement normal s'arrête au stylopode. Les pièces plus distales sont courtes, leur cartilage est mal différencié (Pl.IX , Fig. 11).

Les bourgeons postérieurs isolés ont un développement très limité : on y trouve dans deux cas plusieurs nodules de taille moyenne et dans un cas une ceinture prolongée d'une ébauche de fémur. Ce dernier explant présente une vésicule distale.

TABLEAU XXVI : DEVELOPPEMENT IN VITRO DES BOURGEONS DE MEMBRES ISSUS DE LA SOURIS n° 3.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	6	6		5				1				
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	7	6		2			1	2		1	1	4
Bourgeon postérieur	7	6	5	2								
Bourgeon postérieur +somites +S.nerveux	7	6	3	3				1			1	1

TABLEAU XVII : DEVELOPPEMENT IN VITRO DES BOURGEONS DE MEMBRES ISSUS DE LA SOURIS n° 4.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	2	6					1	1				
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	3	6				1	1	1				2
Bourgeon postérieur	3	6		2		1						
Bourgeon postérieur +somites +S.nerveux	3	6		1		2					1	2

Les bourgeons postérieurs de cette série qui ont été prélevés avec les somites et le système nerveux adjacents, ont tous donné des vertèbres. On trouve dans deux explants, une ébauche de squelette proximal dont la ceinture est très atrophiée. Le dernier membre obtenu contient de gros nodules cartilagineux malheureusement non identifiables.

Le développement squelettique des membres antérieurs de cette série paraît donc très réduit au-delà du stylopode. Quant aux membres postérieurs, l'aspect rudimentaire de leur squelette proximal rend compte de perturbations importantes au cours de leur évolution in vitro.

L'A.E.R. des bourgeons antérieurs présente un aspect particulier : elle est hypertrophiée, et montre de plus une base irrégulière d'aspect glandulaire (Pl. X , Fig. 4). Tout le mésoderme marginal et distal est pycnotique. La partie préaxiale de l'A.E.R. des deux bourgeons postérieurs offre les mêmes particularités mais le mésoderme post-axial de l'une des deux ébauches est atteint d'une pycnose telle qu'elle le détruit presque complètement et que l'A.E.R. disparaît en face de cette zone (Pl. X, Fig. 5).

5) Manipulation 5 (Tableau XXVIII)

Les bourgeons antérieurs isolés ont développé, dans trois cas sur quatre, un squelette élaboré : on y distingue la ceinture, le stylopode, un zeugopode court et massif. Deux explants possèdent également trois nodules distaux de petite taille (Pl. IX , Fig. 18).

Les squelettes élaborés par les bourgeons antérieurs associés à du matériel axial possèdent les mêmes caractéristiques sauf dans un explant où le zeugopode manque.

Le développement des bourgeons postérieurs se limite à l'élaboration de nodules non identifiés (Pl. IX , Fig. 21). Associés à du mésoderme somitique et du tube neural, ces mêmes bourgeons donnent au mieux quelques vertèbres.

Les bourgeons postérieurs montrent donc, dans cette série leur incapacité à se développer normalement, alors que les bourgeons antérieurs élaborent des structures proximales. L'A.E.R. des témoins antérieurs est épaisse et ventrale. Sa base est irrégulière. Le mésoderme est lâche, la pycnose touche la partie distale des bourgeons (Pl. X, Fig. 6). L'A.E.R. des ébauches postérieures est hypertrophiée, ventrale et non saillante. Une pycnose diffuse affecte tout le mésoderme sauf sous la crête apicale où son intensité augmente.

6) Manipulation 6 (Tableau XXIX)

Les bourgeons antérieurs isolés ou associés à du matériel axial donnent de bonnes prestations : toute la partie proximale du squelette est harmonieuse. Seul l'autopode présente un nombre d'éléments réduit, mais les métacarpiens obtenus (bien que larges à leur base) sont parfaitement reconnaissables (Pl. IX , Fig. 19 et 20).

TABLEAU XXVIII : DEVELOPPEMENT IN VITRO DE BOURGEONS DE MEMBRES ISSUS DE LA SOURIS n° 5.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	4	6		1			1	2				
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	4	6				1	1	2				2
Bourgeon postérieur	4	6	2	2								
Bourgeon postérieur +somites +S.nerveux	4	6		3							1	

TABLEAU XXIX : DEVELOPPEMENT IN VITRO DE BOURGEONS DE MEMBRES ISSUS DE LA SOURIS n° 6.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	1	7							1			1
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	1	7							1			1
Bourgeon postérieur	1	7						1				
Bourgeon postérieur +somites +S.nerveux	1	7							1			1

Le bourgeon postérieur isolé s'est développé de façon correcte jusqu'au niveau du basipode, sa palette autopodiale ne contient aucun nodule.

Le bourgeon postérieur associé aux somites et au système nerveux adjacents a donné un membre pourvu d'un métatarsien de petite taille à l'extrémité d'un squelette bien organisé (Pl. IX , Fig. 22).

Les bourgeons de cette série ont donc fourni de bonnes prestations. L'aspect histologique des bourgeons à la mise en culture est tout à fait normal.

7) Manipulation 7 (Tableau XXX)

L'examen du développement des bourgeons antérieurs de cette série, qu'ils soient isolés ou associés à du matériel axial, conduit aux mêmes observations : toute la partie proximale du membre jusqu'au zeugopode est normale mais la palette autopodiale ne contient qu'un nombre variable de petits nodules non identifiables (Pl. IX , Fig. 23). On ne peut guère qualifier de membres les explants postérieurs exploités : ils ne montrent que des nodules cartilagineux non identifiables, parfois quelques vertèbres (Pl. IX , Fig. 24), et exceptionnellement une pièce ressemblant à une ceinture.

Ces résultats contrastent donc avec ceux de la manipulation précédente dans la mesure où l'autopode antérieur et le membre postérieur dans son ensemble n'ont pas élaboré de squelette organisé.

Les bourgeons antérieurs témoins ont une A.E.R. épaisse qui reste légèrement saillante. Dans le mésoderme on peut distinguer deux zones : la première proximale semble intacte. On y trouve une précondensation cartilagineuse, la seconde située au niveau de la future palette autopodiale contient un mésoderme lâche très pycnotique en périphérie (Pl. X , Fig. 7). L'A.E.R. des ébauches postérieures est large, aplatie et non saillante, sa position est très ventrale à l'extrémité post-axiale des bourgeons. Une pycnose abondante est disséminée dans le mésoderme distal (Pl. X , Fig. 8).

8) Manipulation 8 (Tableau XXXI)

Il n'est pas nécessaire de dissocier les résultats de cette série en fonction de la nature des bourgeons mis en culture : qu'ils soient antérieursou postérieurs, isolés ou associés à du matériel axial, ces explants ont élaboré un squelette harmonieux où seul l'autopode présente des anomalies. Les éléments qui le composent sont parfaitement identifiables mais en nombre réduit (Pl. IX , Fig. 25 à 28).

L'A.E.R. antérieure a une forme de lentille, mais elle fait saillie à l'intérieur de l'explant. Le mésoderme distal est pycnotique. Les bourgeons postérieurs ont une A.E.R. épaisse et un mésoderme distal très abimé.

9) Manipulation 9 (Tableau XXXII)

Un seul explant de cette série a élaboré des pièces squelettiques,en l'occurrence des vertèbres.

TABLEAU XXX : DEVELOPPEMENT IN VITRO DES BOURGEONS DE MEMBRES ISSUS DE LA SOURIS n° 7.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	5	6						5				
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	5	6				1		4				4
Bourgeon postérieur	5	6		4	1							
Bourgeon postérieur +somites +S.nerveux	5	6		5							2	

TABLEAU XXXI : DEVELOPPEMENT IN VITRO DES BOURGEONS DE MEMBRES ISSUS DE LA SOURIS n° 8.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	6	7						1	1	4		
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	6	7						2	2	2		6
Bourgeon postérieur	6	7		1			2	2		1		
Bourgeon postérieur +somites +S.nerveux	6	7		1		1		4			1	5

BIBS LILLE

C'est une absence presque totale de la chondrogenèse que nous constatons car aucun nodule cartilagineux n'est visible dans dix-neuf des vingt "membres" obtenus.

L'A.E.R. des bourgeons antérieurs témoins est large, non saillante. Elle se trouve en position ventrale et sa base est irrégulière. La pycnose abonde dans le mésoderme situé juste sous la crête. Les bourgeons postérieurs ont une A.E.R. large et épaisse. La moitié distale de leur mésoderme est pycnotique.

10) Manipulation 10 (Tableau XXXIII)

Les bourgeons antérieurs isolés, donnent un squelette élaboré où le niveau zeugopode est atteint. Mais ce segment est tronqué et on ne trouve que rarement des éléments plus distaux. Il s'agit alors de nodules non identifiables (Pl.IX , Fig. 9).

La fréquence d'apparition de ces mêmes nodules au niveau de l'autopode croît si les bourgeons sont cultivés en présence de matériel axial, mais les deux composants du zeugopode restent grêles et peu développés.

Le bourgeon postérieur donne beaucoup plus rarement une bonne prestation. Le zeugopode, quand il est individualisé, est suivi d'un nodule distal non identifiable (deux cas). Sinon il est à peine différencié (deux cas).

Le niveau zeugopode est plus fréquemment atteint par les bourgeons postérieurs associés à du matériel axial . Ses composants restent cependant rudimentaires et soudés au stylopode (Pl. IX , Fig. 15). Un seul explant présente une ébauche d'organisation distale où l'on distingue un métatarsien et deux phalanges au sein d'une palette indentée (Pl. IX , Fig. 16).

Dans cette série, les segments les plus distaux des membres obtenus sont donc les plus mal représentés. Le témoin histologique n'a pu être exploité.

11) Manipulation 11 (Tableau XXXIV)

Les résultats obtenus à partir de bourgeons antérieurs isolés ou associés à du matériel axial, montrent que dans la plupart des cas, le membre n'a pu différencier qu'une ceinture et un stylopode normaux, les zeugopodes observés sont des plus rudimentaires sauf dans deux explants où plusieurs nodules non identifiables situés dans la palette autopodiale les accompagnent (Pl.XXII ,Fig.4b).

Le développement des bourgeons postérieurs est quasiment nul, aucun élément squelettique élaboré autre que des vertèbres n'a été découvert dans les explants de cette série (Pl.XXII ,Fig.4d).

Il convient de signaler enfin que les deux explants postérieurs contenant des cartilages proviennent de l'embryon dont les deux bourgeons antérieurs ont élaboré un squelette harmonieux avec ébauche d'autopode.

Le témoin réservé à l'histologie montre des bourgeons antérieurs dont l'A.E.R. est épaisse et dont le mésoderme marginal distal est atteint par de la pycnose.

TABLEAU XXXII : DEVELOPPEMENT IN VITRO DES BOURGEONS DE MEMBRES ISSUS DE LA SOURIS n° 9.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	5	6	5									
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	5	6	4	1							1	
Bourgeon postérieur	5	6	5									
Bourgeon postérieur +somites +S.nerveux	5	6	5									

TABLEAU XXXIII : DEVELOPPEMENT IN VITRO DES BOURGEONS DE MEMBRES ISSUS DE LA SOURIS n°10.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	12	6		1	1	1	7	2				6
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	12	6			1	2	3	6				12
Bourgeon postérieur	12	6		5		3	2	2				1
Bourgeon postérieur +somites +S.nerveux	12	6		3	1	2	4	1		1	2	8

BUS LILLE

TABLEAU XXXIV : DEVELOPPEMENT IN VITRO DES BOURGEONS DE MEMBRES ISSUS DE LA SOURIS n° 11.

Nature des explants	Nombre d'explants mis en culture	Durée de culture en jours	Développement nul	Nodules non identifiés	Niveau distal atteint						Elements axiaux	
					C	S	Z	B	M	A	isolés ou associés à des nodules N.I.	associés à des pièces squelettiques
Bourgeon antérieur	4	6		1			2	1				
Bourgeon antérieur +somites+S.nerveux	4	6				2	1	1				3
Bourgeon postérieur	4	6	3	1								
Bourgeon postérieur +somites +S.nerveux	4	6	3	1							1	

Les ébauches postérieures ont des A.E.R. épaisses également, mais la pycnose s'étend à tout le bourgeon.

12) Conclusion

L'intérêt essentiel des résultats regroupés en fonction de l'origine des bourgeons réside dans leur grande homogénéité. Des bourgeons de stades voisins au prélèvement ne montrent pas de différences fondamentales après leur évolution in vitro. Dans ce sens, il existe un parallélisme étroit avec ce qui se passe in utero, puisque les sujets d'une même portée présentent également les mêmes caractéristiques.

L'étude histologique nous permet de montrer les corrélations étroites qui existent entre l'aspect des composants du bourgeon et son devenir. Les séries où A.E.R. et mésoderme paraissent normaux ont conduit à des prestations de bonne qualité. Par contre lorsque la cytosine arabinoside a provoqué des dégénérescences marquées dans l'ébauche, la prestation des bourgeons a toujours été déficiente.

Des observations similaires ont été faites par KOCHHAR et col. en 1978. Ces chercheurs estiment que l'intensité de la dégénérescence qui touche uniquement le mésoderme est fonction de la dose administrée et que le bourgeon commence à "récupérer" 12 à 24 heures après l'injection. L'aspect histologique anormal de certaines A.E.R. caractériserait une phase de reconstruction du bourgeon.

Il nous reste à étudier dans une dernière partie jusqu'à quel point le développement in vitro est "fidèle".

En d'autres termes, il reste à faire la part entre les perturbations dues à la technique de culture et celles induites expérimentalement par injection de cytosine arabinoside.

TROISIEME PARTIE

SYNTHESE DES RESULTATS RELATIFS AU DEVELOPPEMENT DE BOURGEONS ENTIERS *IN VITRO*

I - ETUDE DES SERIES COMPORTANT DES MEMBRES TRAITES A LA CYTOSINE ARABINOSIDE DEVELOPPES IN UTERO (Manipulations 1 à 8)

Dans ce chapitre, pour un stade de prélèvement défini, nous comparerons les membres obtenus in vitro à partir d'un bourgeon après traitement à la cytosine arabinoside à un membre obtenu in vitro sans traitement. D'autre part, les membres issus des bourgeons traités seront comparés aux membres développés in utero chez les embryons jumeaux après injection de l'agent tératogène.

A - La manipulation n° 1, concerne de très jeunes bourgeons (Tableau X). Nous n'avons tenu compte que des ébauches de stade 16, ne disposant pas de témoin in vitro non traité de stade 15.

L'examen de la planche XI montre des membres issus de bourgeons traités puis mis en culture n'ayant élaboré aucun élément squelettique identifiable. Pourtant, qu'il s'agisse de membres antérieurs ou de membres postérieurs, les témoins in utero, se sont bien développés, et les témoins in vitro de stade équivalent ont un squelette rudimentaire mais organisé. Dans ces conditions, il est difficile d'évaluer le rôle exact de l'agent tératogène dans l'échec des cultures exploitées.

B - Dans la manipulation n° 2, trois stades de développement différents étaient présents au moment de la mise en culture : 17, 17 âgé, et 18 (Tableau X).

Les planches XII, XIII, XIV, mettent particulièrement en relief les effets de la cytosine arabinoside. Les prestations réalisées in vitro après traitement sont très inférieures à celles des témoins non traités. D'autre part, tous les éléments squelettiques des témoins in utero sont réduits et déformés, particulièrement au niveau des membres postérieurs. Or seul le membre antérieur de stade 17 âgé présente après développement in vitro une organisation proximale rudimentaire, les autres ébauches ne montrent que des nodules non identifiables et des vertèbres.

C - La cytosine arabinoside injectée au cours de la manipulation n° 3 effectuée sur des embryons de stades 17 âgés et 18 (Tableau X) a, in utero, un effet modéré sur les membres antérieurs. Mais son action est, plus accentuée sur les membres postérieurs.

Les planches XV, XVI montrent que les prestations obtenues in vitro après traitement, comportent les anomalies observées in utero : aux stades concernés le

développement des bourgeons antérieurs traités est légèrement inférieur à celui des bourgeons non traités tandis que le "développement" des bourgeons postérieurs traités est loin de ressembler à celui des témoins non traités.

D - Les investigations menées sur les embryons de la manipulation n° 4 (Tableau X) conduisent aux mêmes conclusions. In utero (Pl.XVII), la cytosine arabinoside perturbe l'élaboration du zeugopode et de l'autopode antérieurs. In vitro, la ceinture et le stylopode sont présents mais le zeugopode est très réduit. Quant à l'autopode il n'existe pas. Les bourgeons non traités de ce stade sont pourtant capables de produire ces deux segments distaux. Le membre postérieur (Pl.XVII) est beaucoup plus sensible à l'action de l'agent tératogène. Les déficiences observées après développement in utero existent dans les membres obtenus in vitro : l'autopode notamment n'élabore aucun élément squelettique.

E - A l'issue de la manipulation n° 5 (Tableau X), les membres antérieurs obtenus in vitro ou in utero présentent des anomalies distales. Mais ces dernières apparaissent plus accusées dans les explants cultivés in vitro. Le zeugopode (Pl.XVIII) et l'autopode y sont très réduits alors que même déformés ils existent dans les membres qui se sont développés in utero ou dans les témoins in vitro non traités. Dans les membres postérieurs, élaborés in utero, la différenciation des éléments squelettiques est mauvaise et l'autopode est anormal. Corrélativement on n'observe aucun squelette organisé dans les explants obtenus in vitro (Pl. XVIII).

A ce stade de développement, le bourgeon postérieur non traité peut cependant élaborer un squelette harmonieux in vitro.

F - La manipulation n° 6 a conduit in utero à des développements de membres tout à fait normaux aussi n'est-il pas étonnant de trouver dans les cultures de bourgeons traités des squelettes tout à fait comparables à ceux des membres issus de bourgeons non traités (Pl. XIX).

G - Les membres élaborés in utero à partir des embryons de la manipulation 7 montrent des anomalies de l'autopode antérieur assez importantes (Pl.XX). In vitro, les explants traités correspondants ont une palette autopodiale ne contenant que des nodules non identifiables. Or, les témoins non traités peuvent différencier un squelette élaboré à ce niveau. Il semble donc qu'un parallélisme étroit existe entre les squelettes élaborés in vitro et in utero.

Le cas des membres postérieurs traités est particulier : la différenciation cartilagineuse in utero n'y semble normale qu'au niveau du stylopode. Pourtant, les pièces plus distales ont une forme et des proportions peu altérées ; seul l'autopode a un nombre de rayons réduit (Pl.XX). In vitro, la différenciation des explants traités (de même origine) est très réduite, bien inférieure à celle des explants non traités.

H - A l'examen de la planche XXI ,on est immédiatement frappé par la qualité des prestations obtenues avec des bourgeons antérieurs traités puis mis en culture. Alors que les membres des embryons laissés in utero ont un autopode déficient, le squelette élaboré par les bourgeons traités contiennent un autopode proportionnellement mieux représenté dont les éléments sont cependant moins nombreux que ceux des témoins non traités.

La différenciation proximale et intermédiaire est meilleure que dans les témoins non traités et concorde avec les résultats obtenus in utero.

Les résultats obtenus avec les bourgeons postérieurs traités (Pl.XXI) sont également d'excellente qualité. Ils sont d'autant plus surprenants que les membres traités mais développés in utero n'ont que des pièces squelettiques intermédiaires de différenciation médiocre.

II - ETUDE DES SERIES OU MANQUENT LES TEMOINS TRAITES DEVELOPPES IN UTERO (Manipulations 9, 10, 11)

Il reste, en dernier lieu, à examiner les développements in vitro des bourgeons de membres provenant des manipulations où les témoins in utero n'ont pu être exploités (Tableau X). Nous les avons comparés au développement de bourgeons de même stade non traités en nous reportant toutefois aux prestations réalisées in utero par des ébauches de stade équivalent mais appartenant à des séries expérimentales différentes.

A - La figure 1 de la planche XXII (Manipulation 9) met en évidence la mauvaise différenciation des bourgeons traités qu'ils soient antérieurs ou postérieurs. Néanmoins les prestations obtenues sont en tous points comparables à celles des bourgeons de stade équivalent issus de la manipulation n° 2 (Pl.XII).

B - La figure 2 de la planche XXII permet d'observer des squelettes obtenus à partir de bourgeons de stade 18 traités (Manipulation 10) et non traités. Dans les explants soumis à la cytosine arabinoside, on trouve une différenciation proximale normale, mais on note aussi la rudimentation du zeugopode et l'absence d'autopode, résultats

comparables, pour les membres antérieurs à ceux des stades équivalents des manipulations 3 et 4 (Pl.XVI, XVII). Mais de tels squelettes élaborés au niveau des ébauches postérieures dépassent de loin le degré de développement atteint par les bourgeons postérieurs des mêmes manipulations 3 et 4.

Le seul embryon de stade 19 de la manipulation 10 a développé in vitro des membres antérieurs dont le zeugopode paraît presque normal mais dont l'autopode fait défaut (Pl.XXII, Fig. 3). La différenciation intermédiaire des membres postérieurs est moins poussée mais l'autopode contient un nodule non identifiable. On peut comparer le développement de ces explants au développement des bourgeons de stade 18 de la même série, la prestation réalisée par le bourgeon postérieur se situant également en marge des résultats obtenus avec des bourgeons de même stade traités et mis en culture (Pl.XVI et XVII , Tableau XXII).

C - Les bourgeons antérieurs de la manipulation n° 11 traités et mis en culture présentent des anomalies distales : l'autopode se réduit à quelques nodules non identifiables (Pl.XXI, Fig. 4). Ce développement inférieur à celui de bourgeons non traités évoque celui des ébauches de la série n° 7 (Pl.XX). De même, les prestations très réduites des bourgeons postérieurs peuvent être comparées à celles des membres postérieurs de cette même série.

III - CONCLUSION

Dans la majorité des cas, il existe un parallélisme étroit entre les anomalies du squelette observées après développement in utero ou in vitro. La fidélité de cette technique paraît donc démontrée en ce qui concerne la différenciation des éléments cartilagineux; il faut retenir que, excepté pour la manipulation 8, les éléments mal colorés in utero, n'apparaissent jamais in vitro. Enfin il faut regretter que les anomalies de la morphologie des autopodes n'apparaissent pas in vitro, nous pensons particulièrement aux membres atteints de polydactylie pour lesquels une étude de détail serait très intéressante.

Trois manipulations présentent néanmoins des résultats qui mettent l'observateur dans l'embarras :

- la manipulation 1 où les cultures de bourgeons traités de stades 15 et 16 n'ont pas donné de squelette mais pour laquelle des facteurs comme le jeune âge des explants et leur nombre réduit peuvent constituer in vitro des obstacles plus sérieux que l'administration de cytosine arabinoside.

- la manipulation 8 où les prestations réalisées in vitro par les bourgeons traités de stade 20 sont supérieures à celles des témoins in utero, résultats que nous ne pouvons expliquer.

- la manipulation 10 où des bourgeons postérieurs traités de stades 18 et 19 élaborent des squelettes "trop bien" organisés dont l'aspect rappelle, toutes proportions gardées, le développement in utero des ébauches postérieures de la manipulation 7 (Stade 19 âgé à l'opération) (Pl.XX). L'hypothèse d'une parenté entre séries 10 et 7 devient plausible si l'on considère les développements assez semblables des membres antérieurs mais la différence d'âge entre les embryons provenant de ces deux manipulations limite considérablement la comparaison.

QUATRIEME PARTIE

CULTURE DE FRAGMENTS DISTAUX DE BOURGEONS DE MEMBRES

I - INTRODUCTION

Les travaux de MAC CABE et PARKER (1975) ont inspiré cette partie de notre travail. In vitro, un facteur diffusible produit par la Z.P.A. permet le maintien de la crête apicale : conformément aux observations de TICKLE et col. (1976) et MAC CABE et PARKER (1976) nous avons admis l'existence d'une zone d'activité polarisante dans la partie postaxiale du bourgeon de membre de souris sans, toutefois, en connaître les limites exactes. Deux zones distales du bourgeon ont donc été choisies. La première, en position préaxiale, très éloignée de l'hypothétique Z.P.A. est affectée précocement par des phénomènes de dégénérescence. La seconde située à l'apex du bourgeon, voisine de la Z.P.A. présumée, reste saine au cours du développement du membre. Toutes deux comportent initialement la crête apicale associée à une quantité plus ou moins importante de mésoderme. En effet, l'épaisseur théorique des fragments (p. 7) n'a pu être obtenue régulièrement à chaque dissection. Nous n'avons cependant pas écarté les fragments non conformes au standard fixé : toutes les pièces ont été mises en culture et classées en trois groupes de faible, "bonne" ou forte épaisseur lors de l'exploitation des résultats. Ces derniers font état de l'existence de la crête apicale, et de sa morphologie après 36 heures de culture : l'A.E.R. peut avoir gardé son aspect caractéristique de lentille, ou s'être aplatie et ne plus constituer qu'un simple épaississement ectodermique.

II - RESULTATS

A - ASPECT GENERAL DES CULTURES

L'examen histologique des explants, quelles que soient leur origine et leurs dimensions initiales permet d'observer deux comportements distincts en culture. Certaines pièces adhèrent fortement au substrat par toute la surface du mésoderme que la dissection a dénudé (Pl. XXIII, Fig. 1), elles ont la forme d'un dôme dont la paroi est constituée d'ectoderme et le centre de mésoderme. L'A.E.R., lorsqu'elle a subsisté, se trouve en général à l'apex de ce dôme. Les autres pièces forment des vésicules où, l'ectoderme enveloppe les cellules mésodermiques (Pl. XXIII, Fig. 2). Seules quelques zones où la cicatrisation est imparfaite semblent assurer la fixation au substrat. Dans ces cas, la crête apicale n'occupe pas une position précise et il est parfois difficile de distinguer une A.E.R. affaissée d'une zone de cicatrisation ectodermique.

B - ASPECT DES CONSTITUANTS

1) L'ectoderme et l'A.E.R.

L'ectoderme ne subit aucune modification notoire : il reste composé d'une assise basale et d'une couche péridermique de cellules aplaties (Pl. XXIII, Fig. 3). On n'y distingue pas de pycnose mais on y trouve fréquemment des cellules en mitose (Pl. XXIII, Fig. 2). Au niveau de la crête apicale existe une pycnose très discrète que cotoient très souvent des cellules en division (Pl. XXIII, Fig. 3). On n'observe pas d'accentuation de la dégénérescence lorsque l'A.E.R. s'amincit.

2) La lame basale

Cette structure n'offre pas de caractère particulier après 36 heures de culture. Elle reste nette, longeant la face interne de l'ectoderme.

3) Le mésoderme

Les aspects que présentent ce feuillet sont multiples de par la densité des cellules et de par leur état.

a) A l'intérieur d'un explant donné voisinent des zones de cellules très serrées dont on ne distingue que les noyaux, et des zones où le cytoplasme émet de longs filopodes dans de vastes espaces intercellulaires.

b) Le phénomène de pycnose touche particulièrement les cellules mésodermiques. Les explantsparfaitement sains sont rares, la plupart montre une dégénérescence parfois très avancée. Les débris cellulaires peuvent être disséminés parmi les cellules saines (Pl. XXIII, Fig. 7) ou regroupés soit au niveau du sinus marginal (Pl. XXIII, Fig. 1 et 4) soit dans de grandes cavités ménagées au hasard à l'intérieur des explants (Pl. XXIII, Fig. 5, 6, 7). Exceptionnellement, on observe à ce niveau des cellules de taille importante qui semblent contenir des produits de dégénérescence (Pl. XXIII, Fig. 8). Lorsqu'il y a fixation au substrat, la pycnose la plus intense s'observe à la base des explants, contre le support. La présence de populations cellulaires mésodermiques très abimées n'empêche ni la survie de l'A.E.R., ni la prolifération parfois intense d'autres cellules mésodermiques.

4) Le sinus marginal

On ne le trouve jamais dans les cultures de fragments de stades 16 et 17. A partir du stade 18, lorsqu'il subsiste, il est en général logé assez profondément dans le mésoderme (Pl. XXIII, Fig. 1, 4). En plus des erythroblastes, il contient souvent de nombreux débris cellulaires. On note que les explants dont le mésoderme est en très mauvais état, n'ont plus de sinus marginal mais une grande cavité où voisinent des groupes de cellules sanguines altérées et de nombreux débris cellulaires.

TABLEAU XXXV : CULTURE DE FRAGMENTS DISTAUX DE BOURGEONS DE STADE 16 (36 heures)

Nature des explants	Nombres de cultures	A.E.R.		
		Absente	Mince	Normale
Bourgeon Antérieur 1/2 préaxiale	20	19	0	1
Bourgeon Antérieur 1/2 postaxiale	20	6	5	9

TABLEAU XXXVI : CULTURE DE FRAGMENTS DISTAUX DE BOURGEONS DE STADE 17 (36 heures)

Nature des explants	Epaisseur	Nombre de cultures	A.E.R.		
			Absente	Mince	Normale
Bourgeon Antérieur	Faible	1	1	0	0
	Moyenne	2	2	0	0
Zone 1	Forte	3	1	2	0
Bourgeon Antérieur	Faible	1	1	0	0
	Moyenne	4	2	0	2
Zone 2	Forte	1	0	1	0

BUS LILLE

TABLEAU XXXVII : CULTURE DE FRAGMENTS DISTAUX DE BOURGEONS DE STADE 18 (36 heures)

Nature des explants	Epaisseur	Nombre de cultures	A.E.R.		
			Absente	Mince	Normale
Bourgeon Antérieur Zone 1	Faible	3	3	0	0
	Moyenne	8	7	0	1
	Forte	1	0	1	0
Bourgeon Antérieur Zone 2	Faible	3	2	0	1
	Moyenne	7	3	3	1
	Forte	2	0	1	1
Bourgeon Postérieur Zone 1	Faible	3	3	0	0
	Moyenne	4	3	1	0
	Forte	5	4	0	1
Bourgeon Postérieur Zone 2	Faible	1	1	0	0
	Moyenne	10	7	1	2
	Forte	1	1	0	0

C - ETUDE DE LA SURVIE DE LA CRETE APICALE

1) Fragments distaux de bourgeons de stade 16

A ce stade, ce sont les moitiés préaxiale ou postaxiale de bourgeons antérieurs que nous avons mises en culture. D'après le tableau XXXV, on voit que le maintien de l'épaississement épiblastique n'est assuré fréquemment que dans les explants postaxiaux : près de la moitié d'entre eux possède une A.E.R. d'épaisseur normale à l'issue de la culture.

2) Fragments distaux de bourgeons antérieurs de stade 17

Bien que le nombre des explants de ce stade soit peu élevé, le tableau XXXVI permet de constater une meilleure survie de l'A.E.R. de la zone 2. Deux des trois A.E.R. observées ont un aspect normal, alors que les deux "crêtes" trouvées au niveau des explants préaxiaux sont minces.

3) Fragments distaux de bourgeons de stade 18

a) Bourgeons antérieurs (Tableau XXXVII)

Ici encore, la zone 2 assure une meilleure conservation de la crête apicale. Globalement, quelle que soit l'épaisseur initiale de l'explant on retrouve une trace de l'A.E.R. dans sept cas sur douze. La zone 1 ne permet une telle observation que dans deux cas sur douze.

b) Bourgeons postérieurs (Tableau XXXVII)

A ce stade, il ne semble pas y avoir de différence entre les zones 1 et 2 du bourgeon postérieur, la fréquence de survie de l'A.E.R. est faible dans les deux types de fragments.

4) Fragments distaux de bourgeons de stade 19

a) Bourgeons antérieurs (Tableau XXXVIII)

Si l'on note une meilleure prestation des explants postaxiaux par rapport aux explants préaxiaux, il faut constater que le nombre total de crêtes apicales d'origine postaxiale découvertes après 36 heures de culture représente le tiers du nombre des explants prélevés. Or, au stade 18, plus de la moitié des zones 2 mises en cultures contenaient encore des traces d'A.E.R. à l'issue de l'expérience.

b) Bourgeons postérieurs (Tableau XXXVIII)

L'homogénéité des résultats obtenus avec les bourgeons postérieurs de stade 18 a disparu : la zone postaxiale permet la survie de l'A.E.R. dans trente et un cas sur trente-sept alors que la zone préaxiale ne l'assure que dans dix cas sur trente-sept.

5) Fragments distaux de bourgeons de stade 15 âgés

a) Bourgeons antérieurs (Tableau XXXIX)

L'examen des résultats conduit à des conclusions déjà tirées dans

le paragraphe précédent : meilleure survie des A.E.R. postaxiales par rapport aux A.E.R. préaxiales de même stade mais prestations des zones 2 de stade 19 âgé inférieures à celles des mêmes zones postaxiales de stade 18.

b) Bourgeons postérieurs (Tableau XXXIX)

Très peu de crêtes apicales d'origine préaxiale ont subsisté. Les A.E.R. d'origine postaxiale sont retrouvées plus facilement mais il semble que la fréquence de leur survie soit un peu moins élevée qu'au stade 19.

6) Fragments distaux de bourgeons de stade 20

a) Bourgeons antérieurs (Tableau XXXX)

Encore une fois, les survies d'A.E.R. les plus nombreuses sont obtenues avec les cultures de zones postaxiales. Mais, un nouvel élément apparaît dans cette série : nous remarquons en effet la rareté des crêtes encore normales, observation qui est en accord avec la description de processus involutifs touchant à ce stade l'A.E.R. *in utero*.

b) Bourgeons postérieurs (Tableau XXXX)

La survie des A.E.R. de zones postaxiales est mieux assurée que celle des A.E.R. de zones préaxiales. Néanmoins la fréquence globale de maintien obtenue pour les zones 2 de bourgeons postérieurs de stade 20 est inférieure à celle obtenue au stade précédent pour des fragments identiques.

III - CONCLUSION - DISCUSSION

La culture de fragments distaux de bourgeons de membres est un outil précieux dans l'étude des intéractions ecto-mésodermiques au cours du développement embryonnaire. Mais afin de discuter le détail des résultats, il nous paraît souhaitable de faire état des données relatives aux rapports entre la crête apicale et le mésoderme sous-jacent. Deux grandes théories tentent d'expliquer la morphogenèse du membre de vertébré : la première assigne à la crête apicale un rôle essentiellement biomécanique d'enveloppe du mésoderme qui serait à lui seul responsable de la différenciation proximo-distale. La seconde fait intervenir un jeu d'intéractions réciproques complexes entre l'A.E.R et le mésoblaste. Nous essaierons donc, dans ce chapitre, de situer notre travail par rapport à ces courants de pensée que nous aurons au préalable exposés.

A - ROLE BIOMECANIQUE DE LA CRETE APICALE

Selon AMPRINO et CAMOSSO (1958), AMPRINO et AMBROSI (1973), la prolifération dans les deux nappes épidermiques respectivement dorsale et ventrale

TABLEAU XXXVIII : CULTURE DE FRAGMENTS DISTAUX DE BOURGEONS DE STADE 19 (36 heures).

Nature des explants	Epaisseur	Nombre de cultures	A.E.R.		
			Absente	Mince	Normale
Bourgeon Antérieur	Faible	1	1	0	0
	Moyenne	28	23	3	2
Zone 1	Forte	8	7	0	1
Bourgeon Antérieur	Faible	0	0	0	0
	Moyenne	28	19	5	4
Zone 2	Forte	9	6	2	1
Bourgeon Postérieur	Faible	1	0	1	0
	Moyenne	26	19	4	3
Zone 1	Forte	10	8	1	1
Bourgeon Postérieur	Faible	5	1	3	1
	Moyenne	22	4	7	11
Zone 2	Forte	10	1	5	4

BUS LILLE

TABLEAU XXXIX : CULTURE DE FRAGMENTS DISTAUX DE BOURGEONS DE STADE 19 AGES (36 heures)

Nature des explants	Epaisseur	Nombre de cultures	A.E.R.		
			Absente	Mince	Normale
Bourgeon Antérieur	Faible	2	0	1	1
	Moyenne	20	19	0	1
Zone 1	Forte	0			
Bourgeon Antérieur	Faible	1	1	0	0
	Moyenne	11	6	3	2
Zone 2	Forte	10	7	2	1
Bourgeon Postérieur	Faible	3	1	1	1
	Moyenne	13	11	2	0
Zone 1	Forte	6	5	0	1
Bourgeon Postérieur	Faible	2	0	0	2
	Moyenne	13	4	4	5
Zone 2	Forte	6	1	2	3

TABLEAU XXXX : CULTURE DE FRAGMENTS DISTAUX DE BOURGEONS DE STADE 20 (36 heures)

Nature des explants	Epaisseur	Nombre de cultures	A.E.R.		
			Absente	Mince	Normale
Bourgeon Antérieur	Faible	3	1	2	0
	Moyenne	10	7	3	0
Zone 1	Forte	5	4	0	1
Bourgeon Antérieur	Faible	5	3	2	0
	Moyenne	7	5	2	0
Zone 2	Forte	6	1	4	1
Bourgeon Postérieur	Faible	7	4	3	0
	Moyenne	4	4	0	0
Zone 1	Forte	6	4	2	0
Bourgeon Postérieur	Faible	6	2	2	2
	Moyenne	6	4	0	2
Zone 2	Forte	6	0	2	4

qui recouvrent le membre serait accompagnée d'un glissement des cellules vers l'apex du bourgeon. Dans la zone où ces nappes se rencontrent, les cellules s'accumuleraient et constitueraient la crête apicale.

L'accroissement du "revêtement épithélial dans son ensemble offre au mésenchyme proliférant un compartiment qui s'accroît et s'allonge progressivement". KIENY et PAUTOU (1976) ont montré également qu'il existe "un glissement de l'ectoderme en direction distale, ce qui indique que la majorité des cellules ectodermiques et en particulier celles de la crête apicale ectodermique sont engendrées proximalement et transportées en position distale par un mouvement propre de l'ectoderme par rapport au mésoderme".

Chez les mammifères, MILAIRE (1973) observe, associée à des divisions cellulaires au sein de la crête, une importante migration des cellules péridermiques vers l'extrémité distale du bourgeon. Dans les expériences de culture in vitro, qu'elles aient été menées chez le poulet, ou chez la souris, on constate que l'ectoderme prolifère activement et qu'il peut s'étendre préférentiellement vers les bords libres de l'explant. Ceci devrait diminuer les migrations en direction distale responsables in situ de la formation de la crête apicale. Or, loin de s'amenuiser, l'A.E.R. persiste in vitro et ceci dans des conditions bien précises (MAC CABE et PARKER, 1975). Signalons en outre que d'autres faits semblent minimiser l'aspect biomécanique des intéractions ecto-mésodermiques : l'apparition d'une crête apicale surnuméraire en position dorsale chez le mutant Eudiplopodia (FRASER et ABBOTT, 1971 a, b), la réorganisation de cette crête à l'occasion de perturbations expérimentales (SEARLS et ZWILLING, 1964 ; ERRICK et SAUNDERS, 1974, 1976).

B - INTERACTIONS RECIPROQUES ENTRE A.E.R. ET MESODERME

L'existence de rapports étroits entre crête apicale et mésoderme paraît mieux expliquer le développement du membre. Encore faut-il préciser la nature des intéractions ecto-mésodermiques dans la croissance proximo-distale du bourgeon, et la nature de ces intéractions dans l'établissement de l'orientation antéro-postérieure de ce bourgeon.

1) Intéractions ecto-mésodermiques et croissance proximo-distale

ZWILLING et HANSBOROUGH (1956) ont supposé l'existence d'une substance élaborée par le mésoderme, responsable du maintien de la crête apicale (Les travaux ultérieurs de SAUNDERS et GASSELING (1963) et de ZWILLING (1974) semblent confirmer cette hypothèse).

En retour l'A.E.R. semble induire la mise en place proximo-distale des aires présomptives des segments du futur membre ; en d'autres termes, l'A.E.R. aurait la capacité d'induire des régions spécifiques à différents stades. Cette conception, née des premiers travaux mérite d'être nuancée. RUBIN et SAUNDERS, en 1972, ont conclu de leurs expériences que le signal émanant de l'A.E.R. était constant et ne variait pas en fonction de l'âge de la crête. STARK et SEARLS(1973) ont montré que toutes les aires présomptives sont présentes dans le bourgeon dès les plus jeunes stades. Le modèle de développement proposé par ces auteurs stipule que l'A.E.R. maintient le mésoblaste sous-jacent dans un état d'immaturité favorable à sa croissance ; dès qu'elles quittent la zone d'influence de la crête (400 à 500 μ) les cellules entrent en différenciation. Selon SUMMERBELL, LEWIS et WOLPERT (1973), le signal émis par l'A.E.R. agirait en maintenant à l'état indifférencié les cellules d'une zone mésodermique d'environ 300 μ d'épaisseur située juste sous l'A.E.R. (Progress Zone). Les cellules de cette zone seraient caractérisées par un état interne appelé valeur de position qui évolue avec le temps et qui est contrôlé par le nombre de divisions que chaque cellule effectue. L'épaisseur de la "Progress Zone" serait constante. Le nombre de cellules augmentant, certaines cellules sortent de la zone proximalement. Leur valeur de position serait alors fixée et deviendrait une information de position. En d'autres termes, les cellules seraient déterminées lorsqu'elles quittent la zone mésodermique apicale. L'excision de l'A.E.R. détruit cette zone et seules les cellules qui l'ont quittée peuvent évoluer conformément à leur détermination. Cette théorie intéressante qui exclut toute régulation importante car le devenir des cellules du bourgeon est fixé dès leur sortie de la Progress Zone,ne s'accorde cependant pas avec l'étude expérimentale menée par KIENY et PAUTOU (1976, 1977). Celle-ci montre en effet que le bourgeon alaire d'oiseau peut, sous certaines conditions, compenser un excès ou une déficience de matériel présomptif : des cellules supposées déterminées peuvent donc se détourner de la voie qui leur était assignée initialement.

Il n'existe que peu d'informations sur la nature du signal émis par la crête apicale. Les travaux menés <u>in vitro</u> par GLOBUS et VETHAMANY-GLOBUS en 1976 prouvent que l'A.E.R. empêche ou retarde la différenciation cartilagineuse dans des cellules mésodermiques pendant 48 heures alors qu'un ectoderme banal permet leur chondrogenèse rapide dans les mêmes conditions. On peut rapprocher de ces observations faites chez l'oiseau, des résultats obtenus par MILAIRE et MULNARD (1968) chez la souris. Des cultures de bourgeons entiers donnent des "vésicules épithéliales toujours séparées des cartilages les plus proches par une couche de mésenchyme non chondrifié".

Ces auteurs montrent dans le même travail l'intervention indispensable de l'épiblaste dans la prolifération puis dans la chondrogenèse du mésoblaste et la transmission de cette "influence" épiblastique par un facteur chimique diffusible. Toutefois, ces expériences qui établissent l'importance du rôle de l'épiblaste ne permettent pas d'assigner un rôle précis et particulier à la crête apicale.

2) Interactions ecto-mésodermiques et acquisition de l'orientation antéro-postérieure

SAUNDERS et GASSELING (1968) ont découvert l'importance d'une zone mésodermique postaxiale dans le contrôle du développement antéro-postérieur du membre antérieur d'oiseau. Cette zone baptisée en 1970 "Zone d'activité polarisante" (Z.P.A.) par BALCUNS et col., déclenche des duplications distales de l'aile si on la greffe du côté antérieur d'un jeune bourgeon, résultats comparables à ceux obtenus en inversant de 180° l'axe antéro-postérieur de l'extrémité du bourgeon (AMPRINO, 1968 ; SAUNDER et GASSELING, 1968). SUMMERBELL (1974) a proposé que cette Z.P.A. pouvait influencer l'A.E.R. et TICKLE et col. (1975) ont expliqué l'action du greffon par la diffusion d'une substance morphogène produite au niveau de la Z.P.A. Les travaux plus récents de MAC CABE et PARKER (1975 et 1976) et de CALANDRA et MAC CABE (1978) tendent effectivement à démontrer l'existence d'une substance produite par les cellules du bord postérieur du bourgeon, cette substance qui assure le maintien de l'A.E.R. diffuse vers l'avant.Le gradient ainsi créé déterminerait l'asymétrie antéro-postérieure de la crête et donc de l'aile. Mais comment un tel facteur morphogène agirait-il sur l'A.E.R. ? Pour SAUNDERS et GASSELING (1968) le mésoderme de la Z.P.A. n'a aucune influence sur la crête apicale elle-même, son action s'exercerait par l'intermédiaire des cellules mésodermiques adjacentes. Dans ces conditions, il est tentant d'affirmer que le facteur issu de la Z.P.A. et le facteur de maintien de la crête apicale ne font qu'un.

Mais rien ne permet d'affirmer que l'activité polarisante et l'activité de maintien de l'A.E.R. sont identiques puisque les cellules de la Z.P.A. n'ont apparemment aucune action directe sur l'A.E.R. et que par ailleurs, deux mutants (diplopodia et talpid) ont une crête apicale très haute dans la région antérieure du bourgeon,donc une activité mésodermique de maintien importante,mais pas d'activité polarisante détectable in vivo par la technique des transplantations (MAC CABE et ABBOTT, 1974 ; MAC CABE et col., 1975). Ces observations nous amènent donc à supposer sans plus de précision l'existence d'une corrélation entre la quantité de substance morphogène issue de la Z.P.A. et la quantité de facteur de maintien produite par le mésoderme marginal.

3) Comment situer notre travail par rapport à ces données ?

a) Nous disposons de deux types d'explants. Tous deux comportent un fragment d'A.E.R. qui recouvre un peu de mésoderme marginal mais, la distance qui

TABLEAU XXXXI

Pourcentages globaux de survie de l'A.E.R. en fonction de l'origine des explants après 36 heures in vitro.

NATURE DES EXPLANTS		STADE					
		16	17	18	19	19 âgé	20
BOURGEON ANTERIEUR	Zone 1	5%	33%	17%	16%	13%	33%
	Zone 2	70%	50%	58%	32%	36%	50%
BOURGEON POSTERIEUR	Zone 1			17%	26%	22%	29%
	Zone 2			25%	83%	76%	66%

BUS LILLE

in situ sépare ces explants d'une hypothétique Z.P.A. est différente et d'autre part, à partir des stades 18 pour le bourgeon antérieur et 19 pour le bourgeon postérieur, la zone préaxiale est affectée par des phénomènes de dégénérescence.

b) L'apparition du foyer préaxial primaire, tant au niveau du bourgeon antérieur qu'au niveau du bourgeon postérieur ne semble avoir aucune incidence sur les pourcentages globaux de survie de l'A.E.R. dans la zone 1. Les explants dont le mésoderme est sain sont très rares, même les zones 2 initialement indemnes de pycnose sont touchées par une importante dégénérescence mésodermique. Or la survie d'A.E.R. sur un mésoderme très abimé n'est pas rare (Pl. XXIII, Fig. 5-6-7) et s'oppose aux observations de MAC CABE et PARKER (1975) pour qui la mort cellulaire détectée par la présence de macrophages dans le mésoderme survient à la suite de la disparition de l'A.E.R. Peut-on envisager l'élaboration du facteur de maintien par des cellules dont une grande majorité présenterait des signes de dégénérescence consécutifs à la mise en culture ? Quelques cellules peuvent-elles assurer la fabrication de ce facteur en quantité suffisante ? Sinon peut-il y avoir conservation dans les explants isolés d'une substance élaborée in utero ? En vue d'apporter une réponse à ces questions nous avons tenté une manipulation complémentaire : les A.E.R. des zones 1 et 2 ont été séparées du mésoderme sous-jacent par action de la trypsine et mises en culture selon un protocole identique à celui utilisé pour les fragments entiers. L'observation de ces cultures en évolution nous a montré un ectoderme collé au substrat apparemment en très bon état, mais faute d'expérience peut-être, nous n'avons pu repérer la crête apicale. La récupération de ces explants pour une exploitation histologique conventionnelle ne pouvant être envisagée, c'est à une inclusion en résine pour microscopie électronique que nous avons fait appel, sous estimant les difficultés de la confection de coupes semi-fines sériées à cette échelle. A l'heure actuelle, nous ne pouvons donc apporter aucune information quant à la survie de l'A.E.R. en absence de mésoderme, donc de facteur de maintien.

c) In vitro, les deux types d'explants se comportent différemment (Tableau XXXXI). L'un d'eux (Zone 1) se révèle moins apte à assurer le maintien de l'A.E.R.. Or cet explant est le plus éloigné de l'hypothétique Z.P.A. Ce premier résultat est en accord avec les travaux de MAC CABE et PARKER en 1975 et peut s'interpréter selon le schéma proposé chez les oiseaux : un facteur diffusible se propage vers l'extrémité préaxiale du bourgeon. La concentration de ce facteur qui "stimule" l'activité de maintien de la crête apicale par le mésoderme, diminue progressivement dans la partie préaxiale du bourgeon. Un explant prélevé dans une zone intermédiaire (Zone 2) "contient" plus de substance morphogène et a plus de chance d'assurer in vitro

la survie de l'A.E.R.

d) Au stade 18 pour le bourgeon antérieur et au stade 19 pour le bourgeon postérieur la concentration du facteur morphogène semble très importante car l'activité de maintien de la crête apicale est optimale dans la zone 2 (Tableau XXXXI) La morphologie d'un bourgeon antérieur de stade 18 est très comparable à celle d'un bourgeon postérieur de stade 19. Deux explications semblent donc possibles. A ce stade de développement :

- l'activité de la Z.P.A. est maximum ;
- l'étendue de la Z.P.A. est telle que notre prélèvement postaxial comporte des cellules de cette zone qui stimuleraient in vitro le mésoderme marginal responsable de la survie de l'A.E.R. L'examen du tableau XXXV nous montre que la mise en culture de la moitié postaxiale d'un bourgeon antérieur de stade 16 (donc d'un explant comportant une grande partie de la Z.P.A. présumée se traduit par une très bonne survie de l'A.E.R. Si l'on se reporte au travail de MAC CABE et col. de 1973, on constate que le bourgeon d'aile d'oiseau présente une Z.P.A. dont l'activité augmente progressivement pour atteindre un maximum au stade 23, puis diminue et disparaît au stade 29. Or l'aspect du bourgeon alaire de stade 23 est tout à fait comparable à celui des bourgeons de souris aux stades évoqués plus haut. De plus, l'aire de répartition de cette zone s'étend à ce moment précis vers l'extrémité distale du bourgeon. Le fait que nous n'ayons pas observé de différences nettes dans les résultats obtenus avec des fragments de faible, moyenne ou forte épaisseur pourrait s'expliquer par la faible épaisseur de la Z.P.A. et par sa position très marginale. Pour fragmentaires qu'ils soient, nos résultats cadrent donc avec les observations faites chez le poulet. Chez le hamster (MAC CABE, 1976) la Z.P.A. de bourgeons de 9,5 et 10 jours semble plus étendue, si la greffe de mésoderme marginal postaxial au niveau du bord antérieur d'un bourgeon alaire hôte provoque des duplications nettes dans plus de 50 % des cas, l'insertion de mésoderme distal ou de mésoderme de la région moyenne dorsale provoque elle aussi quelques morphogenèses surnuméraires de qualité inférieure. Il est donc possible que l'aire de répartition de la Z.P.A. varie légèrement d'une espèce à l'autre.

CONCLUSION GENERALE

L'ensemble de ces résultats montre donc que la morphogenèse du membre de mammifère placentaire est abordable dans certaines conditions expérimentales. Bien sûr, le système de développement des bourgeons entiers ne permet pas encore les manipulations sophistiquées réalisées dans d'autres classes de vertébrés mais nous pensons avoir prouvé sa fiabilité et sa fidélité. Néanmoins, certains indices nous laissent supposer une "stérilisation" rapide de la zone apicale du bourgeon lors de sa mise en culture, le développement obtenu in vitro serait la simple réalisation d'un programme élaboré in utero, les cellules déjà déterminées participant seules à la mise en place des squelette observés.

Notre but immédiat est de savoir si le complexe A.E.R.-mésoderme distal est capable de fonctionner in vitro, en assurant un développement spécifique. Des tests te l'excision et la transplantation d'A.E.R. ou de Z.P.A., l'induction des anomalies provoquées par la cytosine arabinoside sur des bourgeons sains à la mise en culture, nous paraissent convenir à la réalisation de ce programme.

Les investigations menées sur les fragments distaux de bourgeon n'ont porté que sur le maintien de la crête apicale associée à du mésoderme sous-jacent d'origine et déjà de nombreuses questions sont posées. Une expérimentation basée sur des recombinaisons entre ces deux structures devrait apporter dans un premier temps les éléments de réponse au problème du repérage de la Z.P.A. dans le temps et dans l'espace. Ultérieurement, peut-être pourrons-nous obtenir des informations sur son fonctionnement.

Les résultats obtenus permettent également d'envisager une étude biochimique : la chondrogenèse normale ou perturbée expérimentalement pourrait constituer la base de ce travail. Outre l'aspect fondamental de cette recherche sur la morphogenèse du membre, il nous paraît enfin indispenseble d'élargir l'étude entreprise avec la cytosine arabinoside : en effet nous ignorons encore son mode d'action, comme celui de la plupart des autres agents tératogènes. Des informations recueillies à ce propos ouvriraient sans doute des perspectives nouvelles dans ce secteur particulier de la recherche appliquée.

BIBLIOGRAPHIE

A

AGNISH N.D., KOCHHAR D.M., 1977 - The role of somites in the growth and early development of mouse limb buds. Dev. Biol., 56, 174-183.

AMANO H., 1960 - Role of the somitic tissue in the limb development of the urodelan Amphibia. Arch. Biol., Liège, 71, 343-346.

AMPRINO R., 1968 - On the causality of the distal twinning of the chick embryo wing. Arch. Biol., 79, 471-503.

AMPRINO R., CAMOSSO M., 1958 - Analisi sperimentale delle sviluppo dell'ala nell'embrione di pollo. Roux'Arch., 150, 509-541.

AMPRINO R., AMBROSI G., 1973 - Experimental analysis of the chick embryo limb bud growth. Arch. Biol., (Bruxelles), 84, 35-86.

AYDELOTTE M.B., KOCHHAR D.M., 1972 - Development of mouse limb buds in organ culture : chondrogenesis in the presence of a proline analog, L-azetidine-2-caboxylic acid. Dev. Biol., 28, 191-201.

B

BALCUNS A., GASSELING M.T., SAUNDERS J.W., 1970 - Spatio-temporal distribution of a zone that controls antero-posterior polarity in the limb bud of the chick and other bird embryos. Amer. Zool., 10, 323.

BIGGERS J.D., GWATKIN R.B.L., HEYNER S., 1961 - Growth of embryonic avian and mammalian tibiae on a relatively simple chemically defined medium. Exp. Cell Res., 25, 41-58.

BOURGEOIS N.M., HOUBEN J.J.G., 1975 - Morphogenèse primordiale du membre antérieur et ses aspects histochimiques chez le pleurodèle et l'axolotl. C.R.Acad. Sc. Paris, 280, 2037-2040.

C

CALANDRA A.J., MAC CABE J.A., 1978 - The in vitro maintenance of the limb bud apical ridge by cell-free preparations. Dev. Biol., 62, 258-269.

CHAUBE S., MURPHY M.L., 1965 - Teratogenic effects of cytosine arabinoside in the rat fetus. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 6, 39.

CHAUBE S., KREIS W., UCHIDA K., MURPHY M.L., 1968 - The teratogenic effect of 1-β -D-arabino-furanosylcytosine in the rat. Protection by deoxycitidine. Biochem. Phar., 17, 1213-1226.

CHEVALLIER A., 1977 - Origine des ceintures scapulaires et pelviennes chez l'embryon d'oiseau. J. Embryol. exp. Morph., 42, 275-292.

CHEVALLIER A., KIENY M., MAUGER A., 1977 - Limb-somite relationship : origin of the limb musculature. J. Embryol. exp. Morph., 41, 245-258.

CHEVALLIER A., KIENY M., MAUGER A., 1978 - Limb-somite relationship : effect of removal of somitic mesoderm on the wing musculature. J. Embryol. exp. Morph., 43, 263-278.

CHRIST B., JACOB H.J., JACOB M., 1977 - Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. Anat. Embryol., 150, 171-186

D

DEUCHAR E.M., 1976 - Regeneration of amputated limb-buds in early rat embryos. J. Embryol. exp. Morph., 35, 345-354.

E

ERRICK J.E., SAUNDERS J.W. Jr., 1974 - Effects of an "inside-out" limb-bud ectoderm on development of the avian limb. Dev. Biol., 41, 338-351.

ERRICK J.E., SAUNDERS J.W. Jr., 1976 - Limb outgrowth in the chick embryo induced by dissociated and reaggregated cells of the apical ectodermal ridge. Dev. Biol., 50, 26-34.

F

FINNEGAN C.V., 1963 - Observations of depedant histogenesis in Salamander limb development. J. Embryol. exp. Morph., 11, 325-328.

FRASER R.A., ABBOTT U.K., 1971 a - Studies on limb morphogenesis.V. The expression of eudiplopodia and its experimental modification. J. Exp. Zool., 176, 219-236.

FRASER R.A., ABBOTT U.K., 1971 b - Studies on limb morphogenesis. VI. Experiments with early stages of the polydactylous mutant eudiplopodia. J. Exp. Zool., 176, 237-248.

G

GLOBUS M., VETHAMANY-GLOBUS S., 1976 - In vitro analogue of early chick limb bud outgrowth . Differentiation, 6, 91-96.

GOETINCK P.F., 1964 - Studies on avian limb morphogenesis. II. Experiments with the polydactylous mutant eudiplopodia. Dev. Biol., 10, 71-91.

H

HOUBEN J.J.G., 1976 - Aspects ultrastructuraux de la migration de cellules somitiques dans les bourgeons de membres postérieurs de souris. Arch. Biol. (Bruxelles) 87, 345-365.

J

JURAND A., 1965 - Ultrastructural aspects of early development of the forelimb buds in the chick and the mouse. Proc. R. Soc. London, Sér. B, 162, 387-405.

K

KARNOFSKY D.A., LACON C.R., 1966 - The effects of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine on the developing chick embryo. Biochem. Pharm., 15, 1435-1442.

KIENY M., 1969 - Sur les relations entre le mésoderme somitique et le mésoderme somatopleural avant et au cours de l'induction primaire des membres de l'embryon de poulet. C.R. Acad. Sci. Paris, 268, 3183-3186.

KIENY M., 1970 - Sur le rôle du mésoderme somitique dans la différenciation de la patte de l'embryon de poulet. C.R. Acad. Sc. Paris, 270, 2009-2014.

KIENY M., 1971 - Les phases d'activité morphogène du mésoderme somatopleural pendant le développement précoce du membre chez l'embryon de poulet. Ann. Embryol. Morph., 4, 281-298.

KIENY M., PAUTOU M.P., 1976 - Experimental analysis of excedentary regulation in xenoplastic quail chick limb bud recombinants. W. Roux's Archiv. Dev. Biol., 179, 327-338.

KIENY M., PAUTOU M.P., 1977 - Proximo-distal pattern regulation in deficient avian limb buds. W. Roux's Archiv.Dev. Biol., 183, 177-192.

KOCHHAR D.M., AYDELOTTE M.B., 1974 - Susceptible stages and abnormal morphogenesis in the developing mouse limb, analyzed in organ culture after transplacental exposure to vitamin A (retinoic acid). J. Embryol. exp. Morph., 31, 721-734.

KOCHHAR D.M., PENNER J.D., McDAY J.A., 1978 - Limb development in mouse embryos. II. Reduction defects, cytotoxicity and inhibition of DNA synthesis produced by cytosine arabinoside. Teratology, 18, 71-102.

M

MAC CABE A.B., GASSELING M.T., SAUNDERS J.W. Jr., 1973 - Spatiotemporal distribution of mechanisms that control outgrowth and antero-posterior polarization of the limb bud in the chick embryo. Mech. Ageing Dev., 2, 1-12.

MAC CABE J.A., ABBOTT U.K., 1974 - Polarizing and maintenance activities in two polydactylous mutants of the fowl : diplopodia and talpid. J. Embryol. exp. Morph., 31, 735-746.

MAC CABE J.A., MAC CABE A.B., ABBOTT U.K., McCARREY J.R., 1975 - Limb development in diplopodia : a polydactylous mutation in the chicken. J. Exp. Zool., 191, 383-393.

MAC CABE J.A., PARKER B.W., 1975 - The in vitro maintenance of the apical ectodermal ridge of the chick embryo wing bud : an assay for polarizing activity. Dev. Biol., 45, 349-357.

MAC CABE J.A., PARKER B., 1976 - Polarizing activity in the developing limb of the syrian hamster. J. Exp. Zool., 195, 311-317.

MAC CABE J.A., PARKER B.W., 1976 - Evidence for a gradient of a morphogenetic substance in the developing limb. Dev. Biol., 54, 297-303.

MACONNACHIE E., 1979 - A study of digit fusion in the mouse embryo. J. Embryol. exp. Morph., 49, 259-276.

MANSON J.M., DOURSON M.L., SMITH C.C., 1977 - Effects of cytosine arabinoside on in vivo and in vitro mouse limb development. In vitro, 13, 434-44

MERKER H.J., GÜNTHER T., KRÜGER U., 1978 - Effect of 4-Methylumbelliferyl-β-D-xylopyranoside on the morphology of embryonic cartilage in limb bud cultures. Teratol., 18, 291-310.

MILAIRE J., 1973 - Indices d'une participation morphogène de l'épiblaste au cours du développement de membres chez les mammifères. Arch. Biol. (Bruxelles) 84, 87-114.

MILAIRE J., 1976 - Contribution cellulaire des somites à la genèse des bourgeons de membres postérieurs chez la souris. Arch. Biol. (Bruxelles) 87, 315-343

MILAIRE J., 1976 - Rudimentation digitale au cours du développement normal de l'autopode chez les mammifères. Dans : Mécanismes de la rudimentation des organes chez les embryons de Vertébrés. Editions du C.N.R.S. Paris, 221-231.

MILAIRE J., MULNARD J., 1968 - Le rôle de l'épiblaste dans la chondrogenèse du bourgeon de membre chez la souris. J. Embryol. exp. Morph., 20, 215-236.

N

NEUBERT D., MERKER H.J., TAPKEN S., 1974 - Comparative studies on the prenatal development of mouse extremities in vivo and in organ culture. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmaco., 286, 251-270.

NEUBERT D., RAUTENBERG M., 1976 - Activity of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in mouse limb buds differentiating in vivo or in organ culture. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 1623-1635.

R

RAYNAUD A., 1976 - Les différentes modalités de la rudimentation des membres chez les embryons de reptiles serpentiformes. Dans : Mécanismes de la rudimentation des organes chez les embryons de Vertébrés, Editions du C.N.R.S. Paris, 201-219.

RUBIN L., SAUNDERS J.W. Jr., 1972 - Ectodermal-mesodermal interactions in the growth of limb buds in the chick embryo : constancy and temporal limits of the ectodermal induction. Dev. Biol., 28, 94-112.

RUGH R., 1962 - Experimental chick embryology. Histological procedures. Dans Experimental Embryology, Burgess Publishing Company Minneapolis 15, Minnesota, 417.

S

SAUNDERS J.W. Jr., 1948 - The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. J. Exp. Zool., 108, 363-403.

SAUNDERS J.W. Jr., GASSELING M.T., 1963 - Trans-filter propagation of apical ectoderm maintenance factor in the chick embryo wing bud. Dev. Biol., 7, 64-78.

SAUNDERS J.W., GASSELING M.T., 1968 - Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. In Epithelial-Mesenchymal Interactions (Ed. R.Fleischmajer & R. Billingham) p. 78-97, Baltimore, Maryland : Williams and Wilkins.

SAUNDERS J.W. Jr., GASSELING M.T., ERRICK J.E., 1976 - Inductive activity and enduring cellular constitution of a supernumerary apical ectodermal ridge frafted to the limb bud of the chick embryo. Dev. Biol., 50, 16-25.

SEARLS R.L., ZWILLING E., 1964 - Regeneration of the apical ectodermal ridge of the chick limb bud. Dev. Biol., 9, 38-55.

STARK R., SEARLS R., 1973 - A description of chick wing bud development and a model of limb morphogenesis. Dev. Biol., 33, 138-153.

SUMMERBELL D., 1974 - Interaction between the proximo-distal and antero-posterior coordinates of positional value during the specification of positional information in the early development of the chick limb-bud. J. Embryo exp. Morph., 32, 227-237.

SUMMERBELL D., LEWIS J.H., WOLPERT L., 1973 - Positional information in chick limb morphogenesis. Nature, Lond., 244, 492-496.

T

TAMARIN A., BOYDE A., 1976 - Three-dimensional anatomy of the 8-day mouse conceptus : a study by scanning electron microscopy. J. Embryol. exp. Morph., 36, 575-596.

THEILER K., 1972 - The house mouse. Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New-York.

TICKLE C., SUMMERBELL D., WOLPERT L., 1975 - Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. Nature (London) 254, 199-202.

TICKLE C., SHELLSWELL G., CRAWLEY A., WOLPERT L., 1976 - Positional signalling by mouse limb polarizing region in the chick wing bud. Nature (London) 259, 396-397.

TROWELL O., 1954 - A modified technique for organ culture in vitro. Expl. Cell Res., 6, 246-248.

Z

ZWILLING E., 1956 a - Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. II. Experimental limb duplication. J. Exp. Zool., 132, 173-187.

ZWILLING E., 1956 b - Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. I. Axes establishment. J. Exp. Zool., 132, 157-172.

ZWILLING E., 1964 - Development of fragmented and of dissociated limb bud mesoderm. Dev. Biol., 9, 20-37.

ZWILLING E., 1974 - Effects of contact between mutant (wingless) limb buds and those of genetically normal chick embryos : confirmation of an hypothesis. Dev. Biol., 39, 37-48.

ZWILLING E., HANSBOROUGH L., 1956 - Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. III. Experiments with polydactylous limbs. J. Exp. Zool., 132, 219-239.

PLANCHE III : Développement du membre de souris *in utero*.

Fig. 1 : Très jeune bourgeon de membre antérieur de stade 15. L'ectoderme épais ne comporte ni cellules péridermiques ni crête apicale.

Fig. 2 : Partie distale d'un bourgeon de membre antérieur de stade 16. Apparition d'un épaississement ectodermique ventro-marginal (⟹) et de quelques cellules péridermiques (→).

Fig. 3 : Partie distale d'un bourgeon antérieur de stade 18. La crête apicale présente sa forme caractéristique de lentille (⟹). Les cellules péridermiques aplaties sont nombreuses. La lame basale séparant l'ectoderme du mésoderme sous-jacent (⟹) est nette.

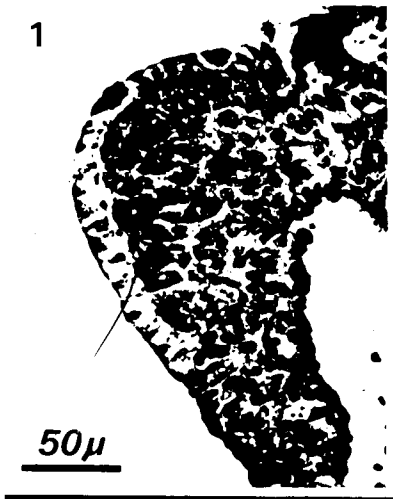
Fig. 4 : Bourgeon antérieur de stade 19 observé au microscope à balayage par sa face ventrale. Noter la dissymétrie antéro-postérieure : (▭ : Partie préaxiale). La crête apicale est visible d'une extrémité à l'autre de la palette.

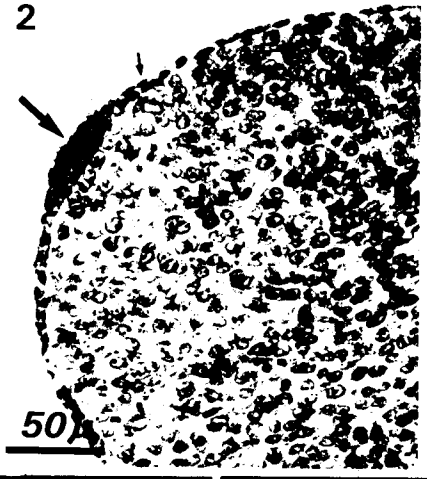
Fig. 5 : Partie préaxiale d'un bourgeon antérieur de stade 19 observé au microscope à balayage. La crête apicale est haute et large. Les noyaux des cellules péridermiques font saillie à la surface de l'ectoderme.

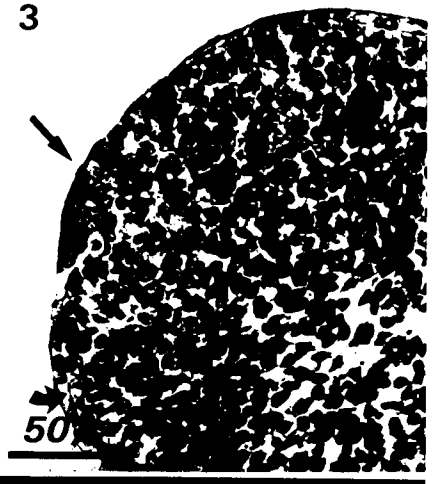
Fig. 6 : Bourgeon antérieur de stade 19. Noter l'apparition des premières condensation précartilagineuses dans la partie proximale du bourgeon (⟹).

Fig. 7 : Partie distale d'un bourgeon postérieur de stade 19. Le sinus marginal (⟹) se situe sous la crête apicale.

N.B. La face dorsale des bourgeons des Fig. 1, 2, 3, 6, 7 se trouve vers le haut de la planche.


1
50μ


2
50μ


3
50

4
0.1 mm

5
0.1 mm

6
100μ

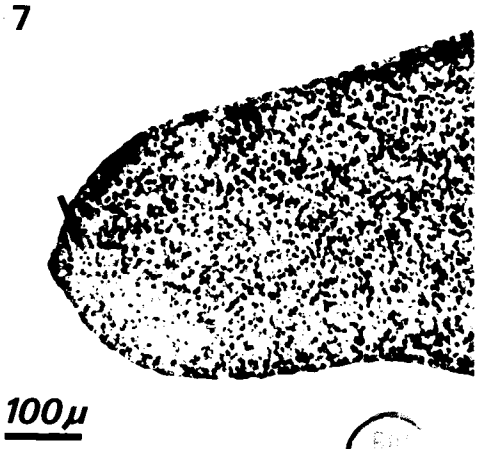

7
100μ

PLANCHE IV Fig. 1, 2, 3 - Développement du membre de souris *in utero*.

Fig. 1 : Partie distale d'un bourgeon postérieur de stade 19 âgé observé au microscope à balayage. L'ectoderme ( ) présente une crête apicale épaisse ( ) et des cellules péridermiques dont les limites sont matérialisées par de nombreuses microvillosités ( ). Dans le mésoderme et sous l'A.E.R. circule le sinus marginal contenant des cellules sanguines ( ).

Fig. 2 : Partie distale d'un bourgeon antérieur de stade 20. La crête apicale ( ) s'est nettement amincie.

Fig. 3 : Partie proximale d'un bourgeon postérieur de stade 22. Coupe au niveau du fémur montrant la différenciation cartilagineuse.

PLANCHE IV Fig. 4, 5, 6, 7 - Développement de bourgeons de membre de souris *in vitro*.

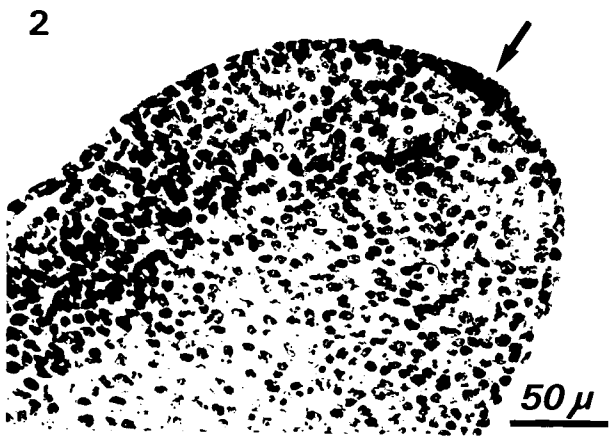
Fig. 4 : Bourgeon antérieur mis en culture au stade 20 et maintenu immergé pendant 5 jours. Seule une ceinture atrophiée (s : scapula) s'est différenciée.

Fig. 5 : Coupe histologique effectuée dans un bourgeon antérieur après 6 jours de culture en immersion. L'épiderme ( ) est kératinisé mais le mésoderme ne différencie aucun cartilage.

Fig. 6 : Bourgeon antérieur mis en culture au stade 20 selon le système de TROWELL. Après 4 jours, les différents éléments du squelette cartilagineux sont présents (s : scapula, h : humerus, c : cubitus, m : métacarpiens).

Fig. 7 : Coupe histologique effectuée dans un bourgeon antérieur après 6 jours de culture en interface. Le cartilage est bien différencié, même dans la partie distale du membre, l'ectoderme se kératinise (→) tandis que le mésoderme intercallé entre les pièces squelettiques et l'ectoderme collé au filtre millipore (non kératinisé) entre en dégénérescence ( ).

1
10 µ


2
50 µ

3

5
100 µ

4
s
0,5 mm

6
h
s
0,5 mm

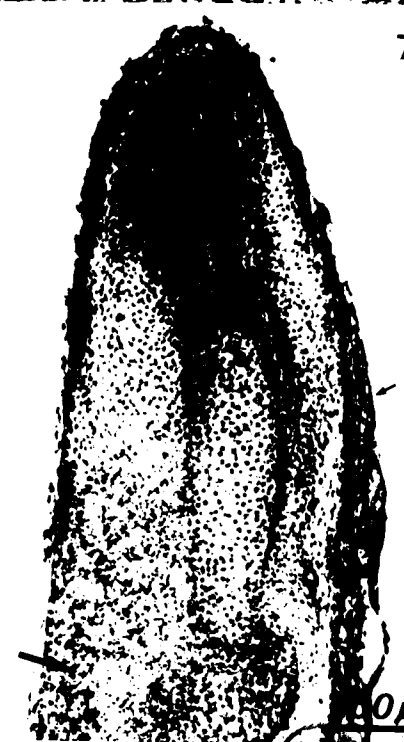

7
0 µ

PLANCHE V : Développement in vitro de bourgeons de membres de souris.

Fig. 1 : Membre obtenu à partir d'un bourgeon antérieur de stade 16 (Culture de 7 jours).

Fig. 2 : Membre obtenu à partir d'un bourgeon antérieur de stade 17 (Culture de 9 jours).

Fig. 3 : Membre obtenu à partir d'un bourgeon antérieur de stade 18 (Culture de 7 jours).

Fig. 4 : Membre obtenu à partir d'un bourgeon antérieur de stade 19 (Culture de 6 jours).

Fig. 5 : Membre obtenu à partir d'un bourgeon antérieur de stade 19 âgé (Culture de 9 jours).

Fig. 6 : Membre obtenu à partir d'un bourgeon antérieur de stade 20 (Culture de 6 jours).

Fig. 7 : Membre obtenu à partir d'un bourgeon antérieur de stade 20 âgé (Culture de 7 jours).

Fig. 8 : Membre obtenu à partir d'un bourgeon antérieur de stade 21 (Culture de 8 jours).

Fig. 9 : Membre obtenu à partir d'un bourgeon postérieur de stade 16 (Culture de 7 jours).

Fig. 10 : Membre obtenu à partir d'un bourgeon postérieur de stade 17 (Culture de 9 jours).

Fig. 11 : Membre obtenu à partir d'un bourgeon postérieur de stade 18 (Culture de 6 jours).

Fig. 12 : Membre obtenu à partir d'un bourgeon postérieur de stade 19 (Culture de 6 jours).

Fig. 13 : Membre obtenu à partir d'un bourgeon postérieur de stade 19 âgé (Culture de 9 jours).

Fig. 14 : Membre obtenu à partir d'un bourgeon postérieur de stade 20 (Culture de 9 jours).

Fig. 15 : Membre obtenu à partir d'un bourgeon postérieur de stade 20 âgé (Culture de 7 jours).

Fig. 16 : Membre obtenu à partir d'un bourgeon postérieur de stade 21 (Culture de 8 jours).

Légende :

→ ceinture

⇉ stylopode

▷ zeugopode

▷ autopode

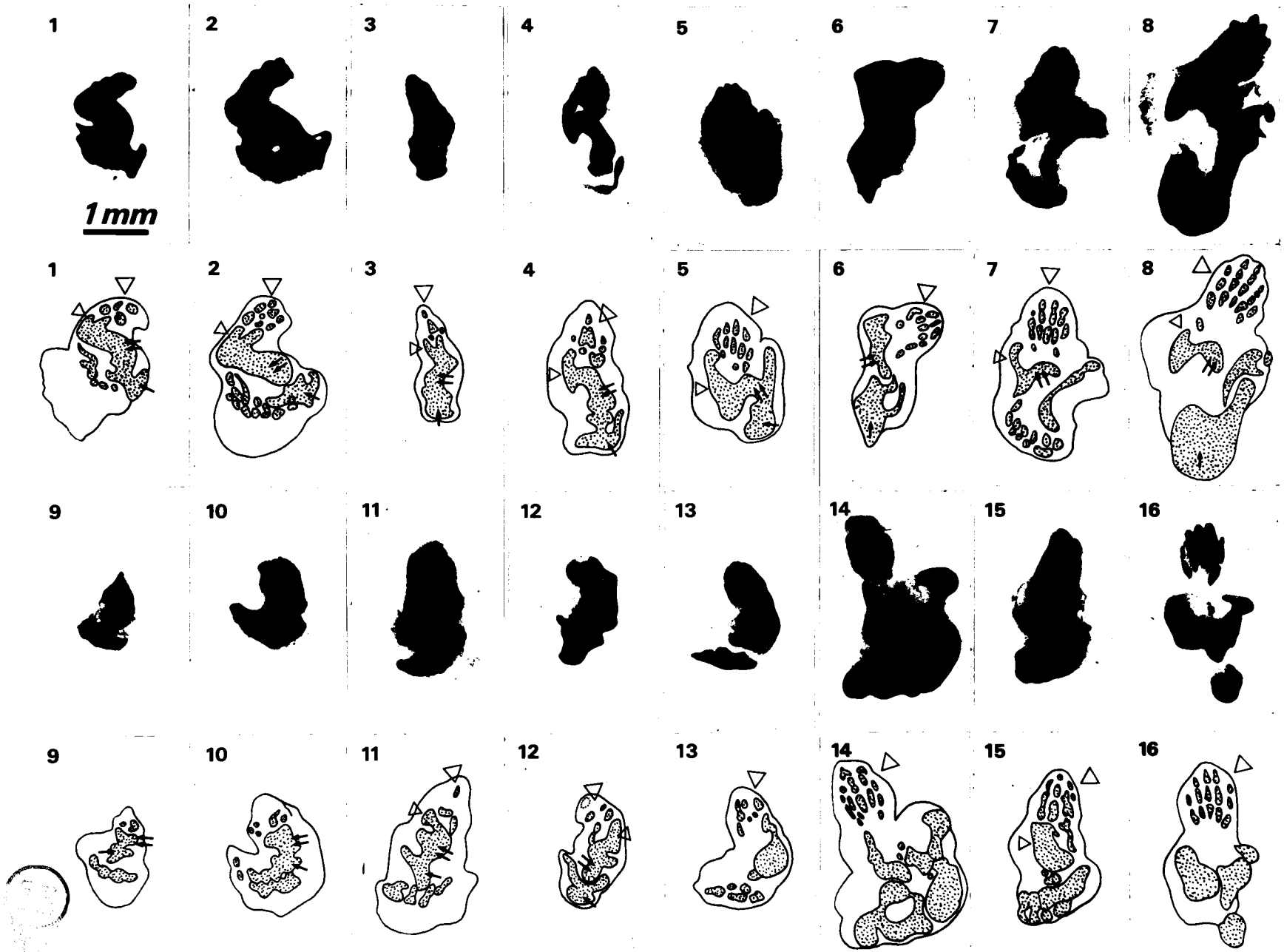

1
2
3
4
5
6
7
8
1mm
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
9
10
11
12
13
14
15
16

PLANCHE VI : Développement in utero de membres de souris traités à la cytosine arabinoside.

Fig. 1 : Embryon au 15e jour du développement atteint de micromélie, et d'une fissure palatine.

Fig. 2 : Membre antérieur gauche atteint de micromélie et d'ectrodactylie.

Fig. 3 : Membre postérieur droit atteint de micromélie, d'ectrodactylie et de syndactylie.

Fig. 4 : Membre antérieur droit atteint de micromélie et d'adactylie.

Fig. 5 : Membre postérieur droit atteint de polydactylie et de syndactylie.

Fig. 6 : Membre antérieur droit atteint de micromélie et de syndactylie.

Fig. 7 : Membre postérieur gauche micromèle montrant une hypertrophie du doigt II.

Fig. 8 : Membre postérieur gauche micromèle montrant une hypertrophie du doigt II et une vésiculisation postaxiale.

Fig. 9 : Embryon témoin au 15e jour de développement.

N.B. Toutes les figures de cette planche sont à la même échelle.

1
2
3
4
5
8
9
1mm

PLANCHE VII : Squelettes cartilagineux de membres antérieurs d'embryons traités à la cytosine arabinoside.

Fig. 1 : Squelette d'un membre antérieur gauche témoin au 15e jour de développement.

Fig. 2 : Squelette d'un membre antérieur droit obtenu in utero après traitement aux stades 13-14 (Manipulation 1). Le squelette s'est légèrement raccourci mais les proportions des différents segments sont harmonieuses.

Fig. 3 : Squelette d'un membre antérieur droit obtenu in utero après traitement aux stades 15-16 (Manipulation 2). Le membre est "miniaturisé".

Fig. 4 : Squelette d'un membre antérieur droit obtenu in utero après traitement aux stades 15-16 (Manipulation 3). Les cartilages distaux sont mal différenciés bien que la morphologie de l'autopode soit normale.

Fig. 5 : Squelette d'un membre antérieur droit obtenu in utero après traitement au stade 16 (Manipulation 4). Noter que la syndactylie (⟹) n'affecte pas le squelette de l'acropode mais celui du métapode où l'on observe un métacarpien large à la base des deux doigts fusionnés.

Fig. 6 : Squelette d'un membre antérieur droit obtenu in utero après traitement au stade 17 (Manipulation 5). On observe la fusion proximale de deux métacarpiens donnant une pièce squelettique en forme de Y (⟹).

Fig. 7 : Squelette d'un membre antérieur gauche obtenu in utero après traitement au stade 17 (Manipulation 6). Ce membre est tout à fait normal.

Fig. 8 : Squelette d'un membre antérieur gauche obtenu in utero après traitement au stade 17 âgé (Manipulation 7). On note la disparition complète d'un doigt.

Fig. 9 : Squelette d'un membre antérieur gauche obtenu in utero après traitement au stade 18 (Manipulation 8). L'autopode a disparu.

N.B. Toutes les figures de cette planche sont à la même échelle.

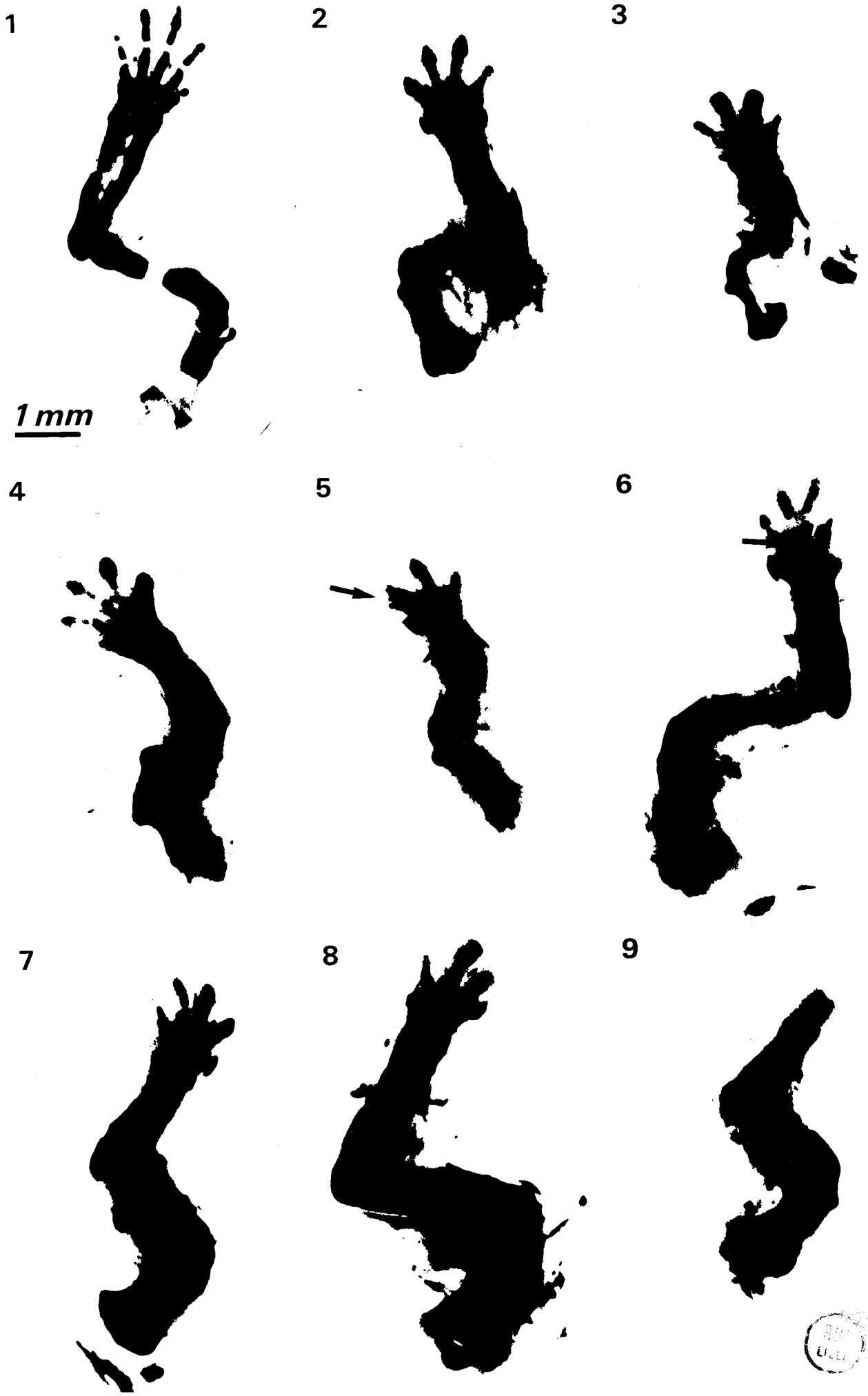

1
2
3
1 mm
4
5
6
7
8
9

PLANCHE VIII : Squelettes cartilagineux de membres postérieurs d'embryons traités à la cytosine arabinoside.

Fig. 1 : Squelette d'un membre postérieur gauche témoin au 15e jour de développement.

Fig. 2 : Squelette d'un membre postérieur gauche obtenu in utero après traitement aux stades 13-14 (Manipulation 1). Les proportions de ce squelette sont réduites mais le cartilage est bien différencié.

Fig. 3 : "Squelette" d'un membre postérieur gauche obtenu in utero après traitement aux stades 15-16 (Manipulation 2). Le membre est peu développé et le cartilage très mal différencié.

Fig. 4 : Squelette d'un membre postérieur droit obtenu in utero après traitement aux stades 15-16 (Manipulation 3). La morphologie de l'autopode est normale mais le cartilage s'y est à peine différencié.

Fig. 5 : "Squelette" d'un membre postérieur gauche obtenu in utero après traitement au stade 16 (Manipulation 4). Le phénomène de vésiculisation postaxiale touche ce membre dont le squelette est des plus rudimentaire.

Fig. 6 : Squelette d'un membre postérieur gauche obtenu in utero après traitement au stade 17 (Manipulation 5). Noter l'abscence de cartilage dans l'autopode atteint de polydactylie.

Fig. 7 : Squelette d'un membre postérieur droit obtenu in utero après traitement au stade 17 (Manipulation 6). Ce squelette paraît normal.

Fig. 8 : Squelette d'un membre postérieur gauche obtenu in utero après traitement au stade 17 âgé (Manipulation 7). On observe des anomalies distales.

Fig. 9 : Squelette d'un membre postérieur droit obtenu in utero après traitement au stade 18 (Manipulation 8). Un autopode rudimentaire existe mais il est dépourvu de cartilage.

N.B. Toutes les figures de cette planche sont à la même échelle.

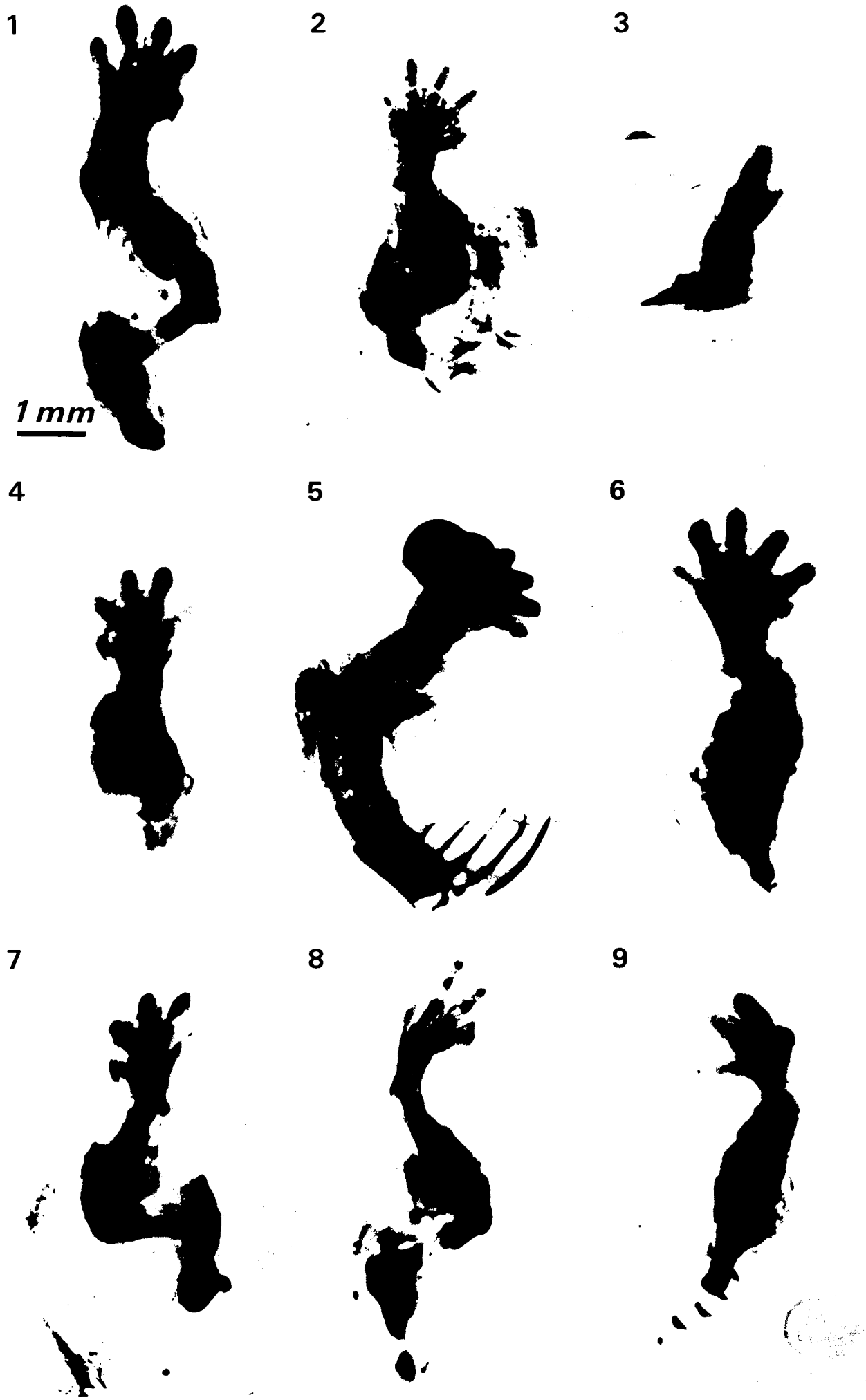

1
2
3
1 mm
4
5
6
7
8
9

PLANCHE IX : Squelettes cartilagineux obtenus in vitro à partir de bourgeons traités à la cytosine arabinoside 20 heures avant la mise en culture.

Fig. 1-2 : Mise en culture au stade 16 (traitement au stade 14)
1 Membre antérieur - Manipulation 1
2 Membre postérieur - Manipulation 1

Fig. 3-4 : Mise en culture au stade 17 (traitement au stade 15)
3 Membre antérieur - Manipulation 2
4 Membre postérieur - Manipulation 2

Fig. 5 à 8 : Mise en culture au stade 17 âgé (traitement au stade 15 âgé)
5 Membre antérieur - Manipulation 2
6 Membre antérieur - Manipulation 3
7 Membre postérieur - Manipulation 2
8 Membre postérieur - Manipulation 3

Fig. 9 à 16 : Mise en culture au stade 18 (traitement au stade 16)
9 Membre antérieur - Manipulation 10
10 Membre antérieur - Manipulation 3
11 Membre antérieur - Manipulation 4
12 Membre antérieur - Manipulation 3
13 Membre postérieur - Manipulation 3
14 Membre postérieur - Manipulation 10. Noter la présence d'une vésicule distale.
15 Membre postérieur - Manipulation 10
16 Membre postérieur - Manipulation 10. Deux phalanges s'articulent sur un même métatarsien.

Fig. 17 à 22 : Mise en culture au stade 19 (traitement au stade 17)
17 Membre antérieur - Manipulation 10
18 Membre antérieur - Manipulation 5
19 Membre antérieur - Manipulation 6
20 Membre antérieur - Manipulation 6
21 Membre postérieur - Manipulation 5
22 Membre postérieur - Manipulation 6

Fig. 23-24 : Mise en culture au stade 19 âgé (traitement au stade 17 âgé)
23 Membre antérieur - Manipulation 7
24 Membre postérieur - Manipulation 7

Fig. 25 à 28 : Mise en culture au stade 20 (traitement au stade 18)
25-26 Membres antérieurs - Manipulation 8
27-28 Membres postérieurs - Manipulation 8

Légende
→ ceinture
⇉ stylopode
▷ zeugopode
▷ autopode

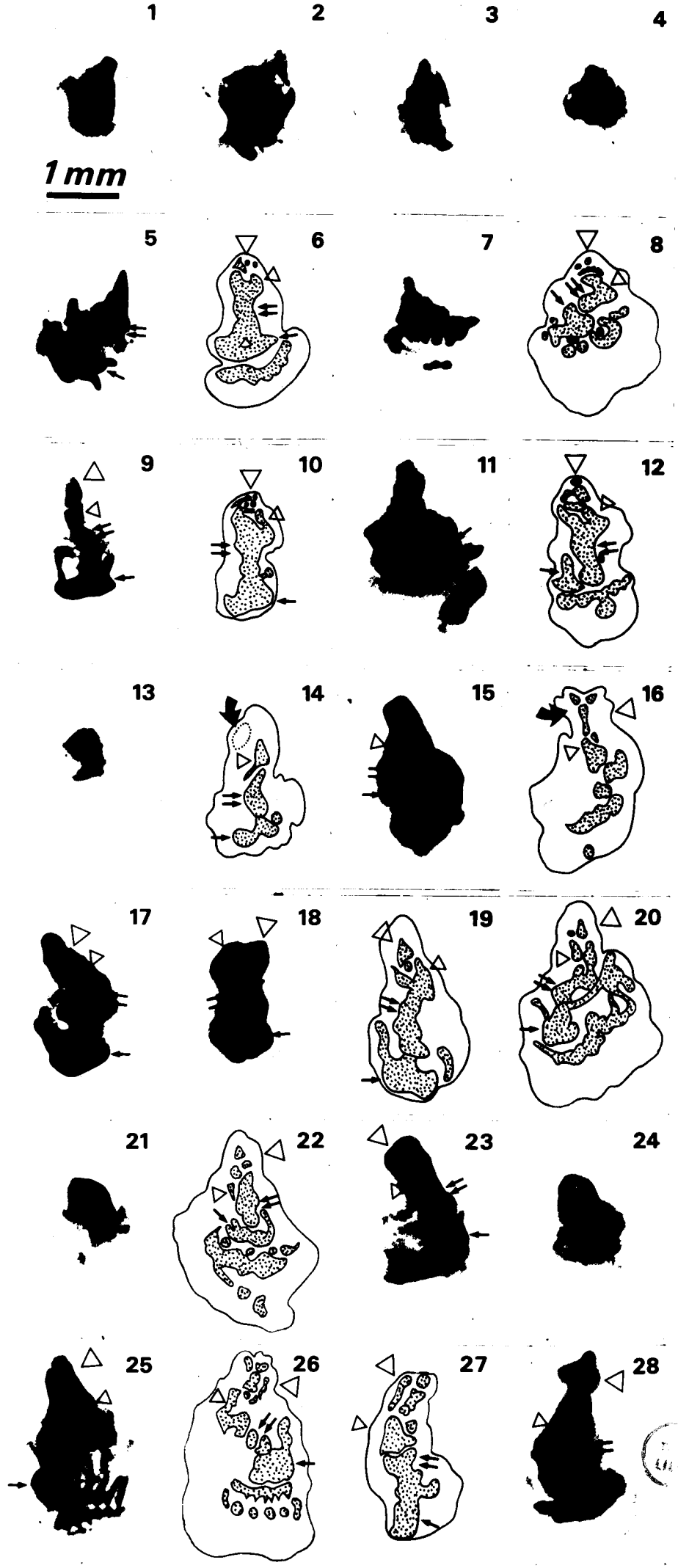

1
2
3
4
1 mm
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

PLANCHE X : Aspects histologiques des bourgeons de membres traités à la cytosine arabinoside.

Au cours de chaque manipulation (20 heures après l'injection de 25 mg/kg de cytosine arabinoside) un des embryons prélevés a été fixé pour étude en coupes histologiques.

Fig. 1 : Coupe transversale d'un bourgeon antérieur de stade 16 issu de la manipulation 1. L'A.E.R. est hypertrophiée, le mésoderme est atteint d'une pycnose diffuse.

Fig. 2 : Coupe transversale d'un bourgeon antérieur de stade 17 âgé issu de la manipulation 2. L'A.E.R. hypertrophiée recouvre un mésoderme distal très pycnotique.

Fig. 3 : Coupe transversale d'un bourgeon antérieur de stade 18 issu de la manipulation 3. Seule la présence d'une légère pycnose dans le mésoderme traduit l'effet de l'agent tératogène.

Fig. 4 : Coupe transversale d'un bourgeon antérieur de stade 18 issu de la manipulation 4. La base de l'A.E.R. présente un aspect glandulaire. Le mésoderme est touché par une pycnose importante.

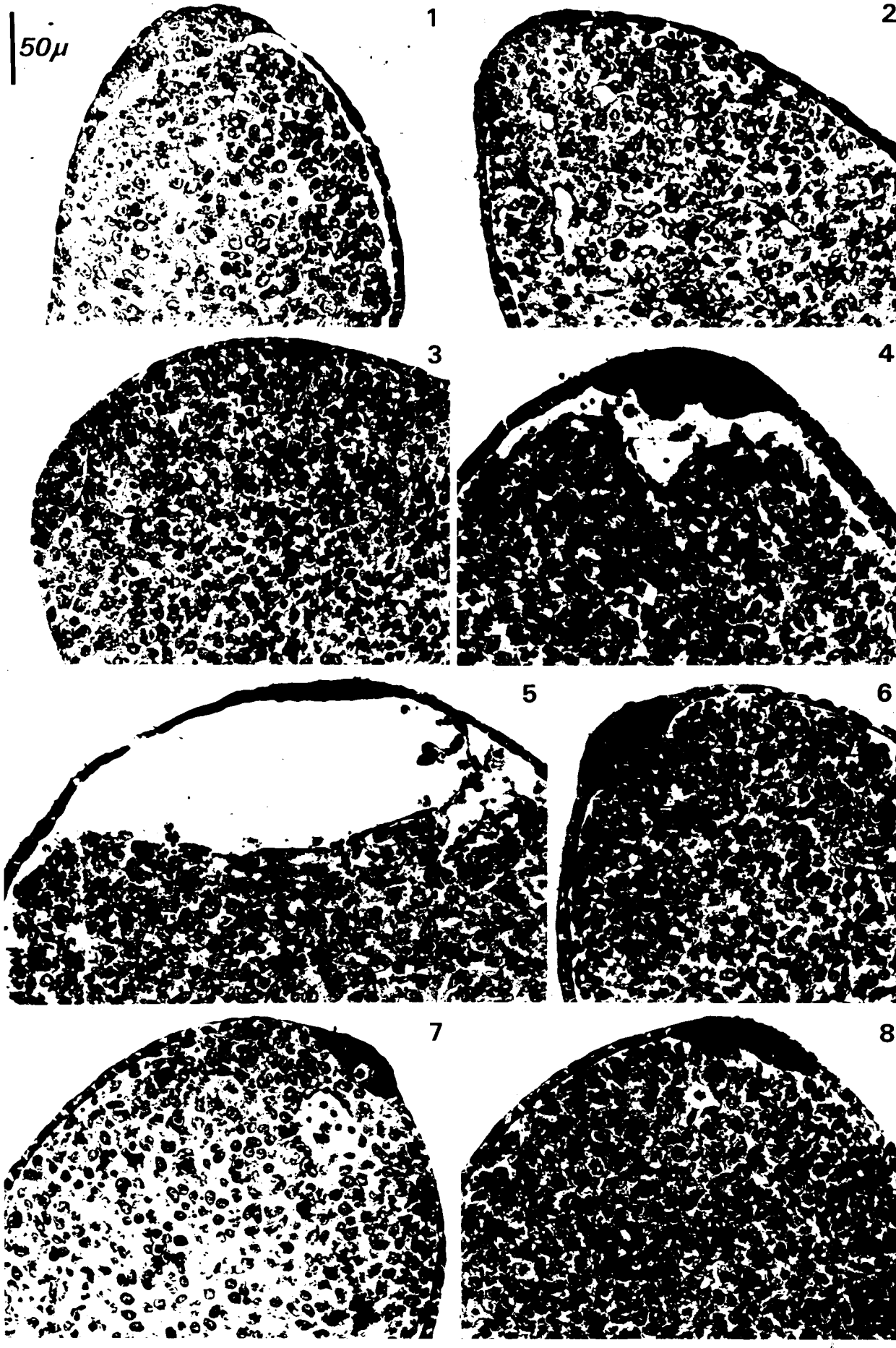
Fig. 5 : Coupe transversale d'un bourgeon postérieur de stade 18 issu de la manipulation 4. L'A.E.R. a presque disparu, une vaste cavité se creuse dans le mésoderme distal.

Fig. 6 : Coupe transversale d'un bourgeon antérieur de stade 19 issu de la manipulation 5. L'A.E.R. est hypertrophiée et le mésoderme distal montre des traces de dégénérescence importante.

Fig. 7 : Coupe transversale d'un bourgeon antérieur de stade 19 âgé issu de la manipulation 7. L'A.E.R est assez épaisse. Le mésoderme périphérique est atteint de pycnose dans la région distale du bourgeon.

Fig. 8 : Coupe transversale d'un bourgeon postérieur de stade 19 âgé issu de la manipulation 7. La base de l'A.E.R. est irrégulière, le mésoderme distal contient de nombreux débris cellulaires.

N.B. Toutes les figures de cette planche sont à la même échelle.


50μ
1
2
3
4
5
6
7
8

PLANCHES XI à XXI

Ces planches permettent de comparer, pour un stade de prélèvement défini :

- un membre obtenu in vitro sans traitement
- un membre obtenu in vitro après traitement à la cytosine arabinoside
- un membre obtenu in utero chez l'un des embryons jumeaux après le même traitement.

a) membre antérieur obtenu in vitro sans traitement
b) membre antérieur obtenu in vitro après traitement
c) membre antérieur obtenu in utero après le même traitement
d) membre postérieur obtenu in vitro sans traitement
e) membre postérieur obtenu in vitro après traitement
f) membre postérieur obtenu in utero après le même traitement

Légende

- ceinture
- stylopode
- zeugopode
- autopode
- zone d'ossification

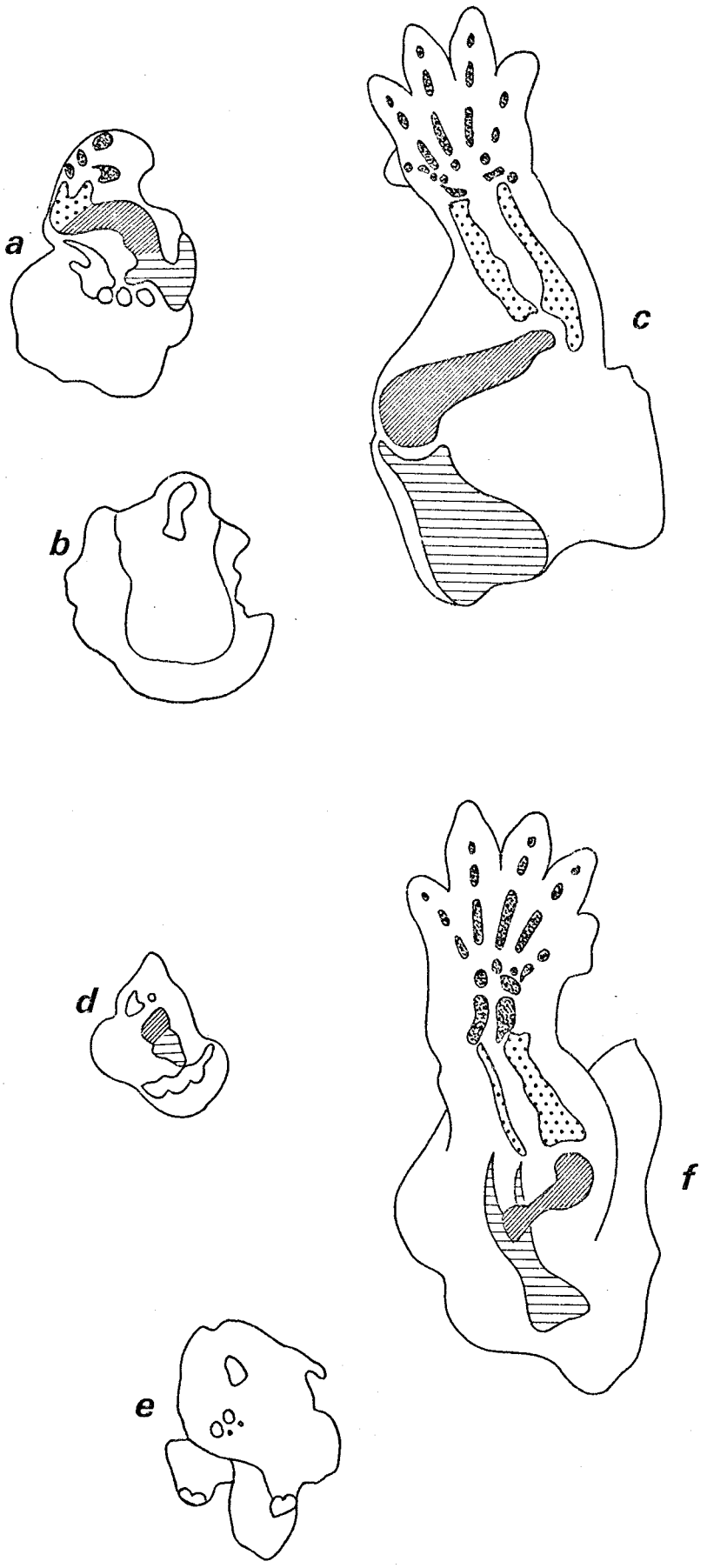
N.B. Toutes les figures de ces planches sont à la même échelle.

PLANCHE XI

Squelettes obtenus à partir de bourgeons de stade 16.

Les bourgeons traités sont issus de la manipulation 1.

Manipulation 1



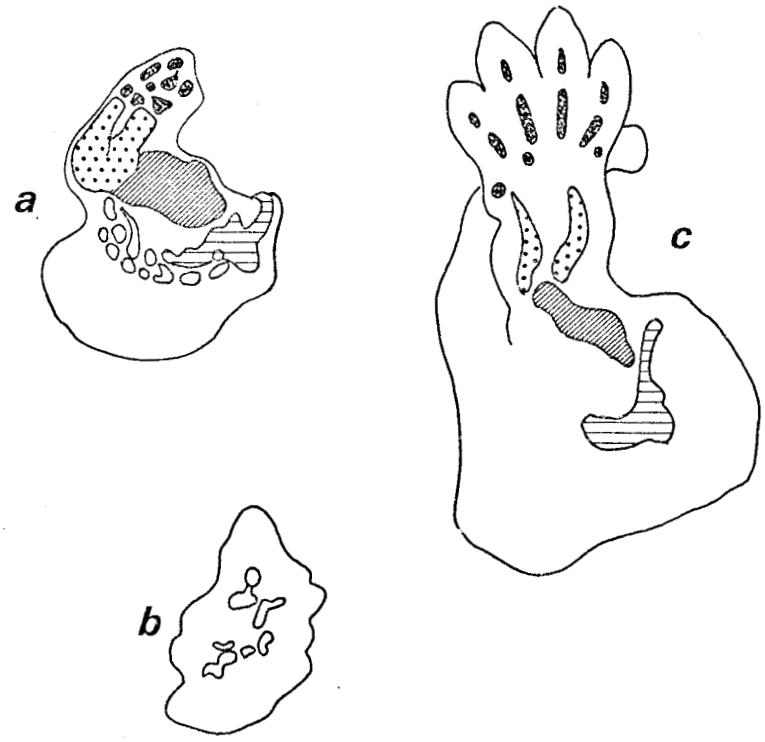
BUS LILLE

PLANCHE XII

Squelettes obtenus à partir de bourgeons de stade 17.

Les bourgeons traités sont issus de la manipulation 2.

Manipulation 2



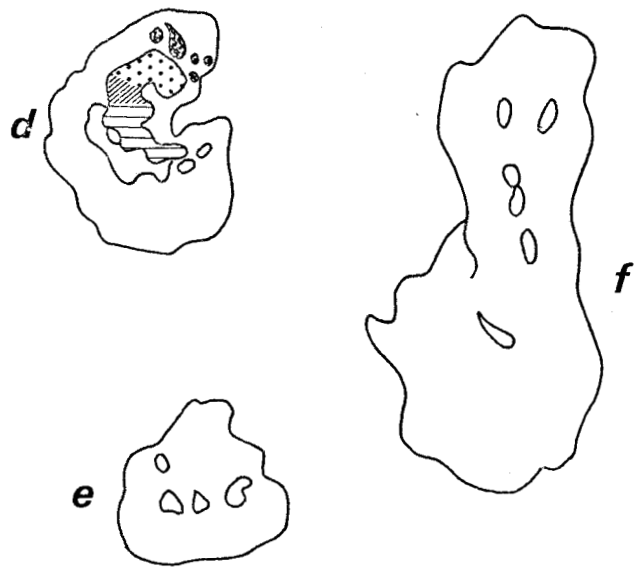
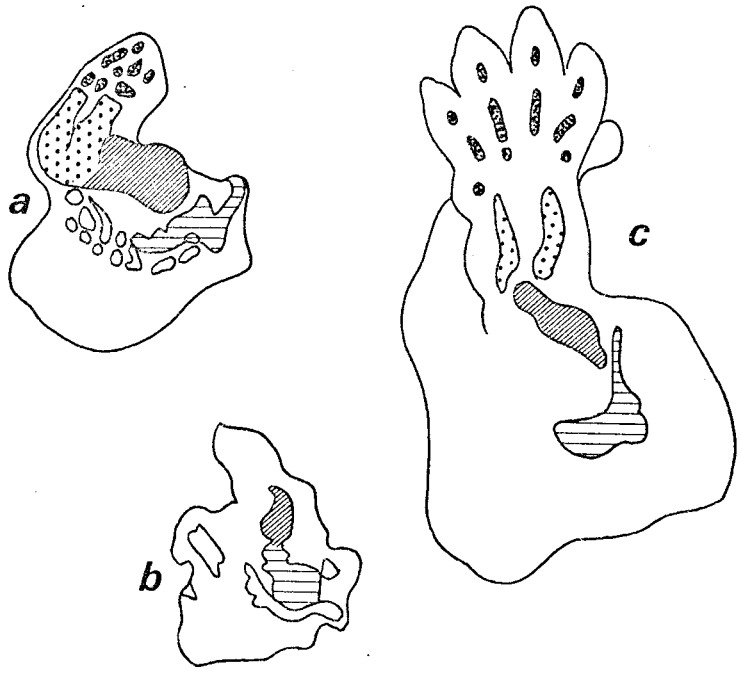


PLANCHE XIII

Squelettes obtenus à partir de bourgeons non traités de stade 17 (a - d) et de bourgeons traités de stade 17 âgé issus de la manipulation 2.

Manipulation 2



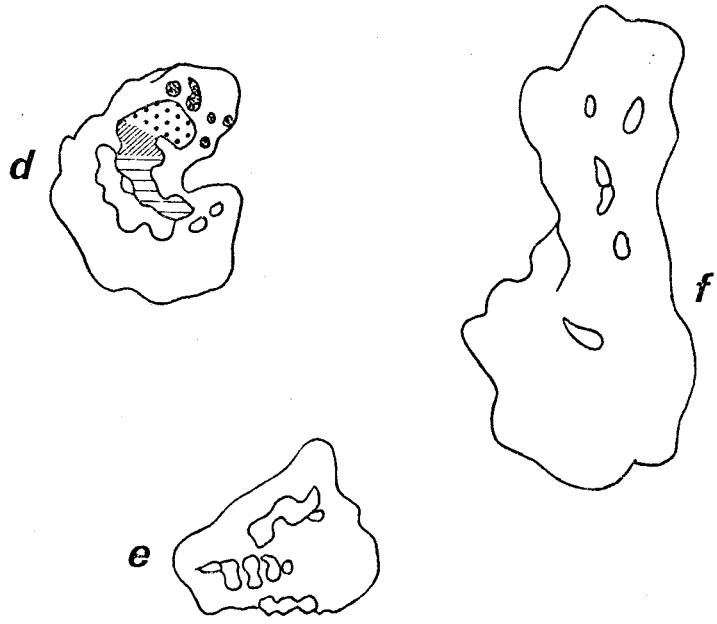
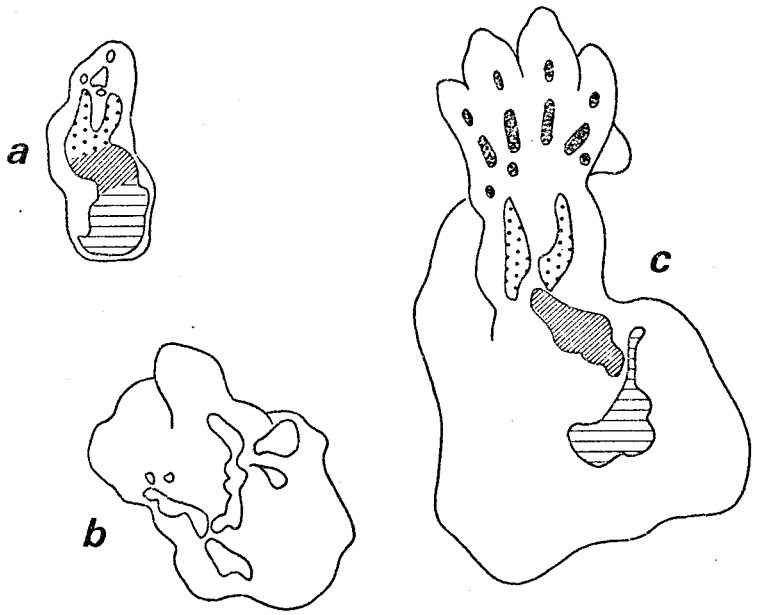


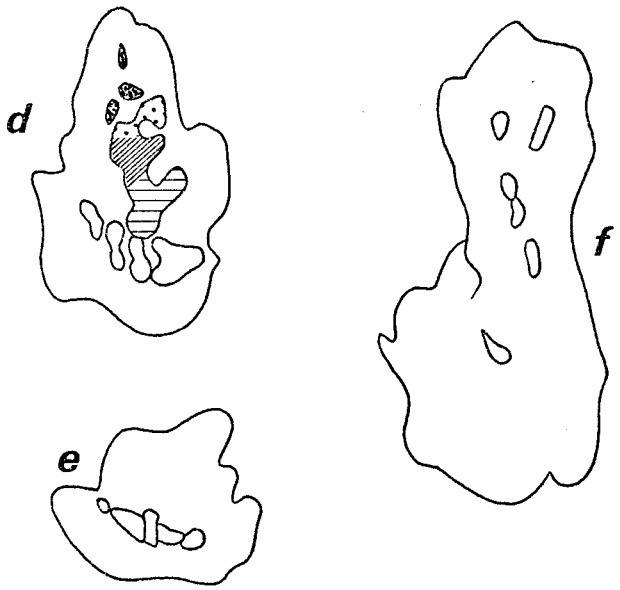
PLANCHE XIV

Squelettes obtenus à partir de bourgeons de stade 18.

Les bourgeons traités sont issus de la manipulation 2.

Manipulation 2





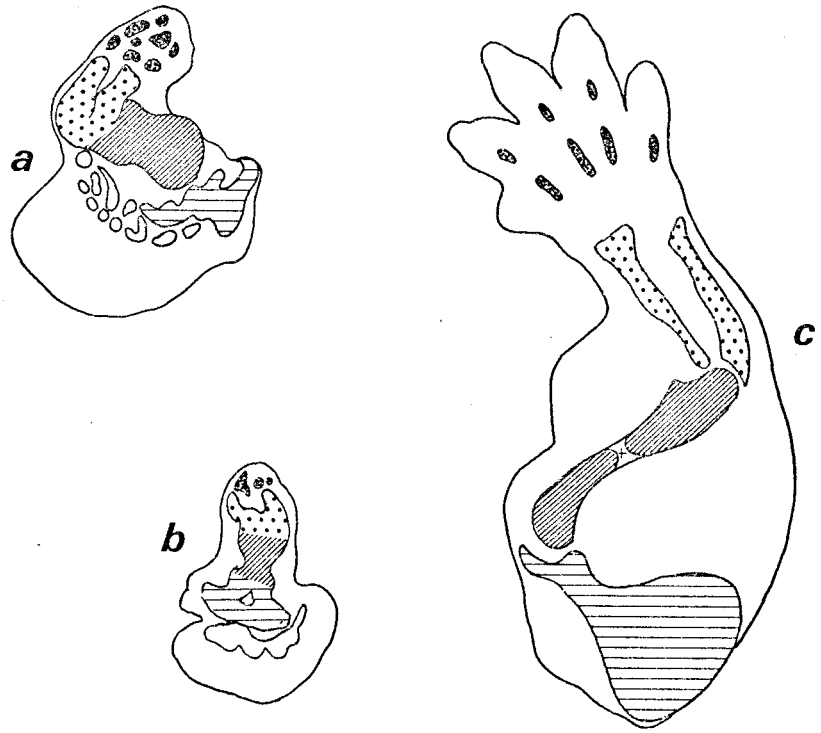
BUS LILLE

PLANCHE XV

Squelettes obtenus à partir de bourgeons de stade 17.

Les bourgeons traités sont issus de la manipulation 3.

Manipulation 3



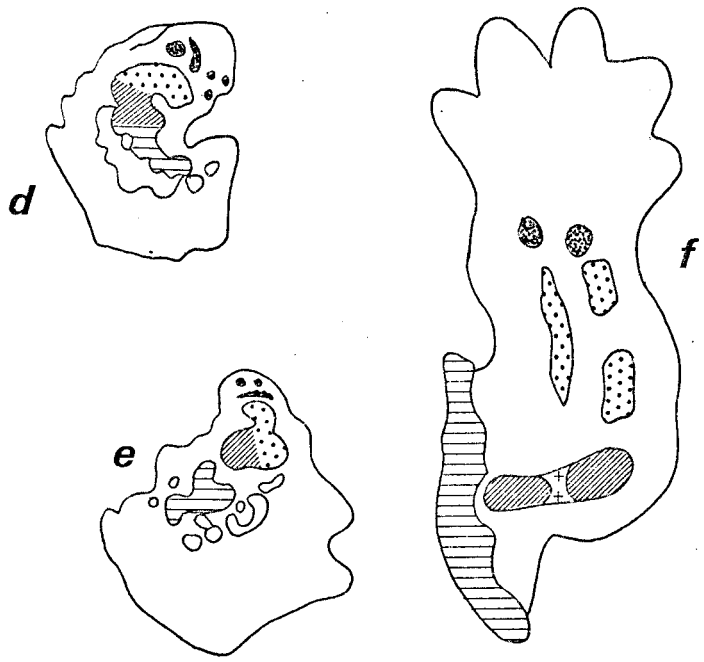
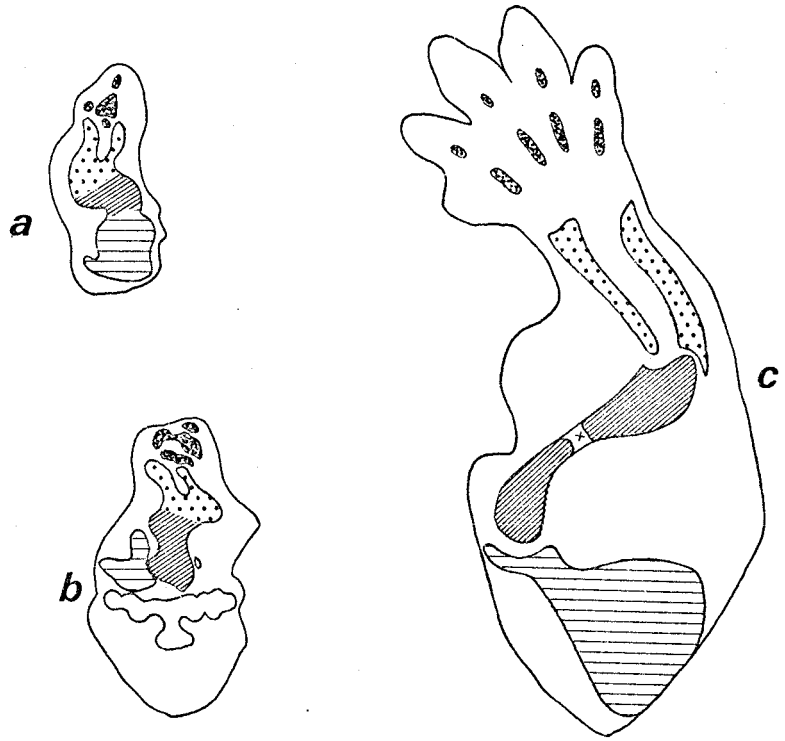


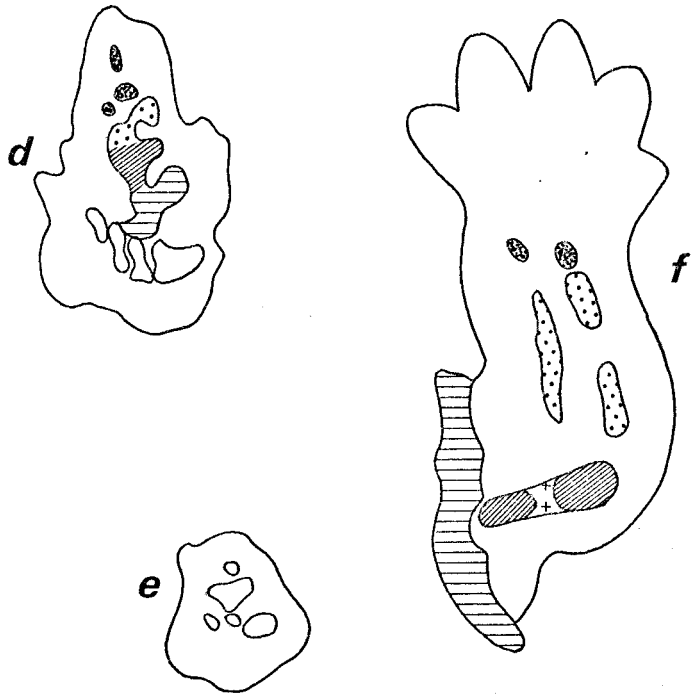
PLANCHE XVI

Squelettes obtenus à partir de bourgeons de stade 18.

Les bourgeons traités sont issus de la manipulation 3.

Manipulation 3





BUS LILLE

PLANCHE XVII

Squelettes obtenus à partir de bourgeons de stade 18.

Les bourgeons traités sont issus de la manipulation 4.

Manipulation 4

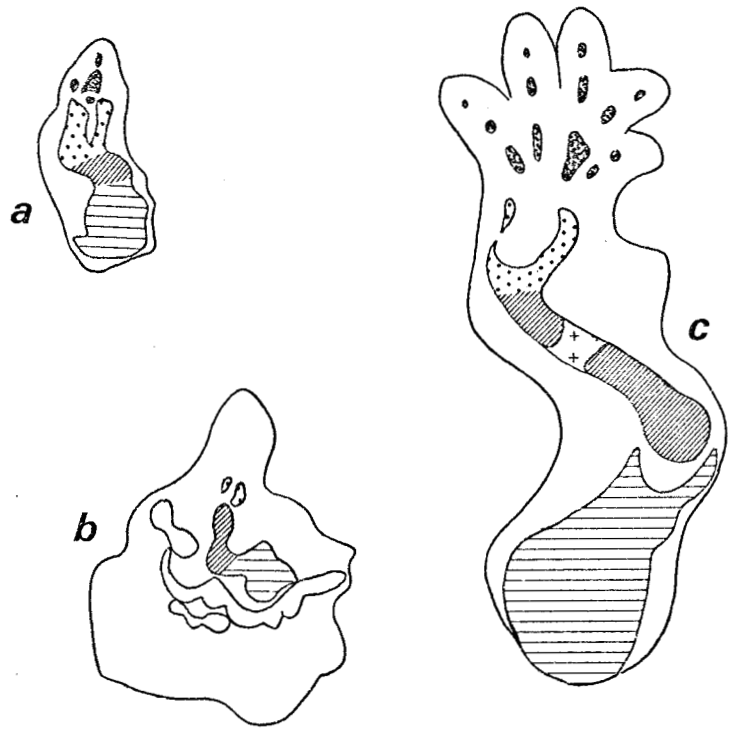
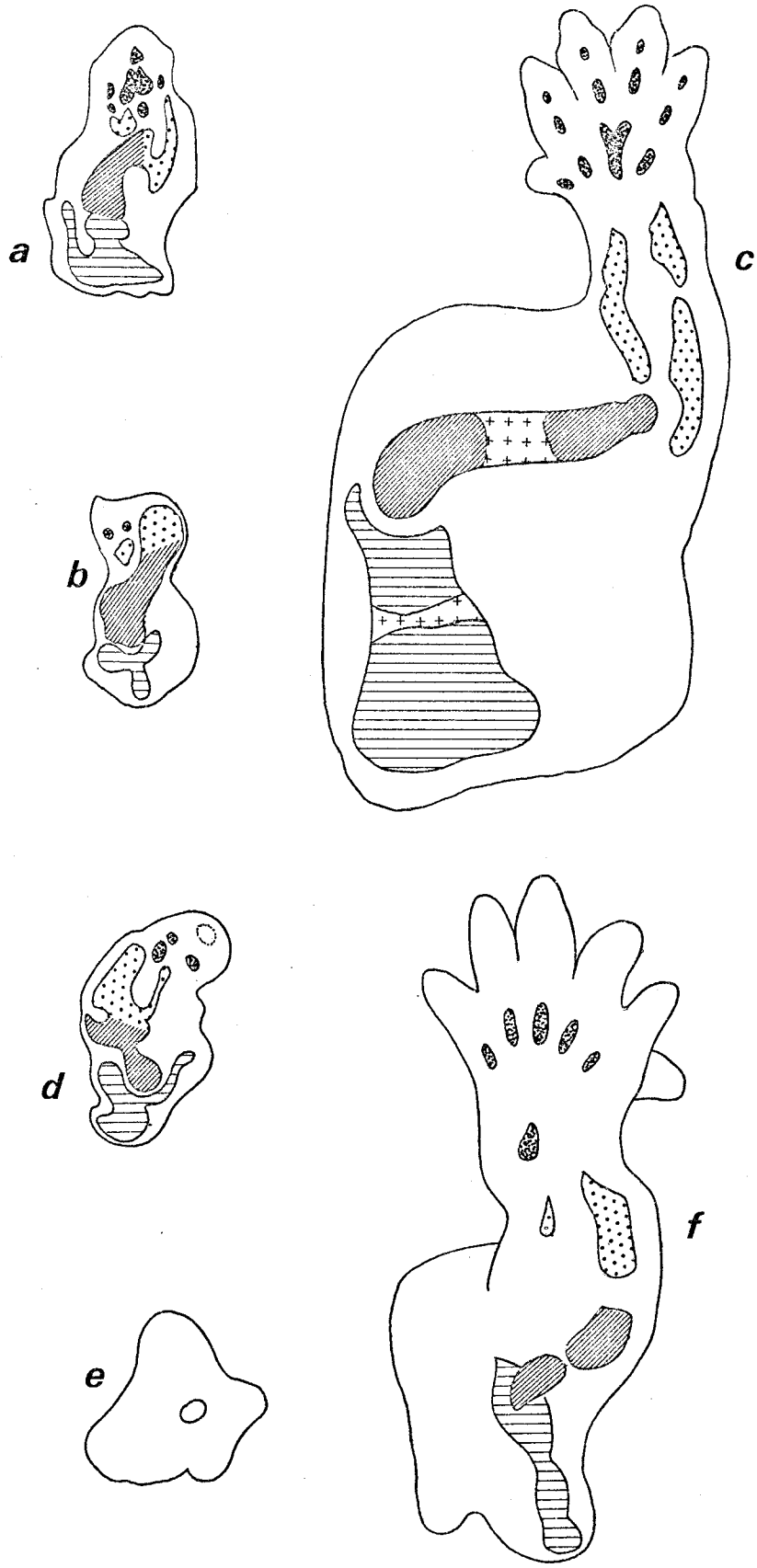


PLANCHE XVIII

Squelettes obtenus à partir de bourgeons de stade 19.

Les bourgeons traités sont issus de la manipulation 5.

Manipulation 5



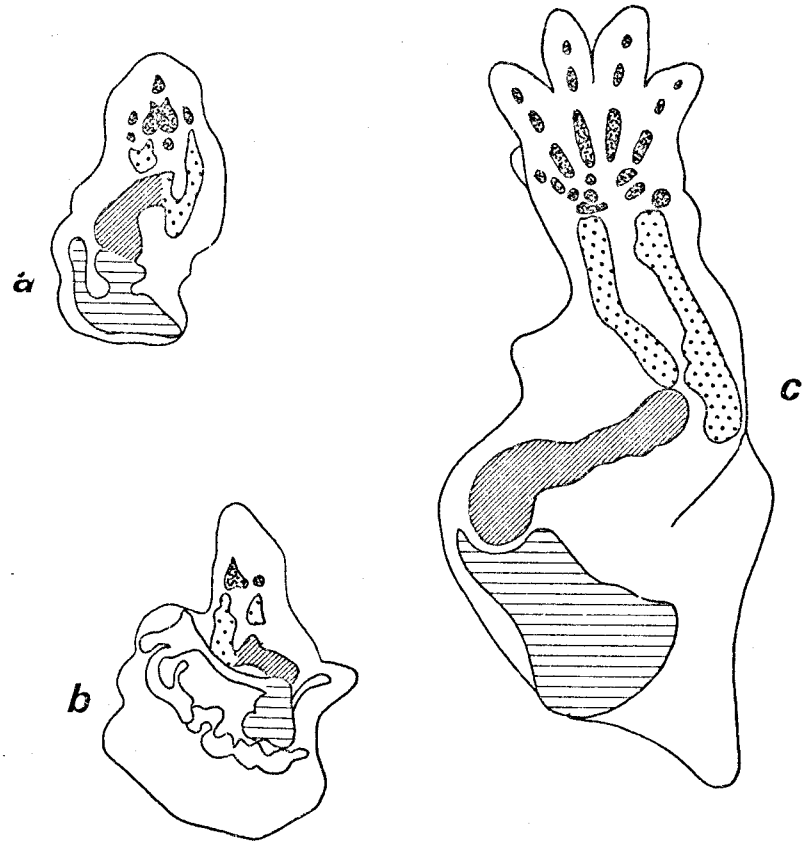
BUS LILLE

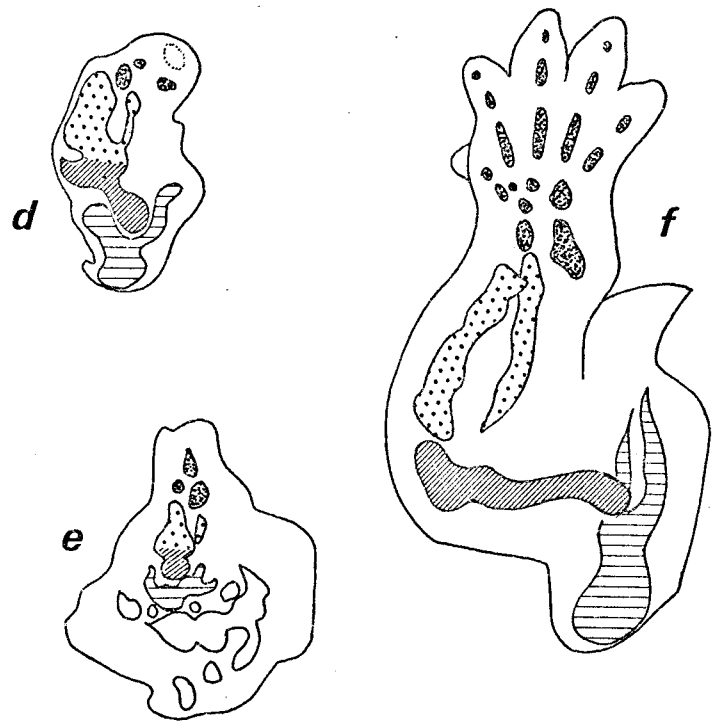
PLANCHE XIX

Squelettes obtenus à partir de bourgeons de stade 19.

Les bourgeons traités sont issus de la manipulation 6.

Manipulation 6





BUS LILLE

PLANCHE XX

Squelettes obtenus à partir de bourgeons de stade 19 âgés.

Les bourgeons traités sont issus de la manipulation 7.

Manipulation 7

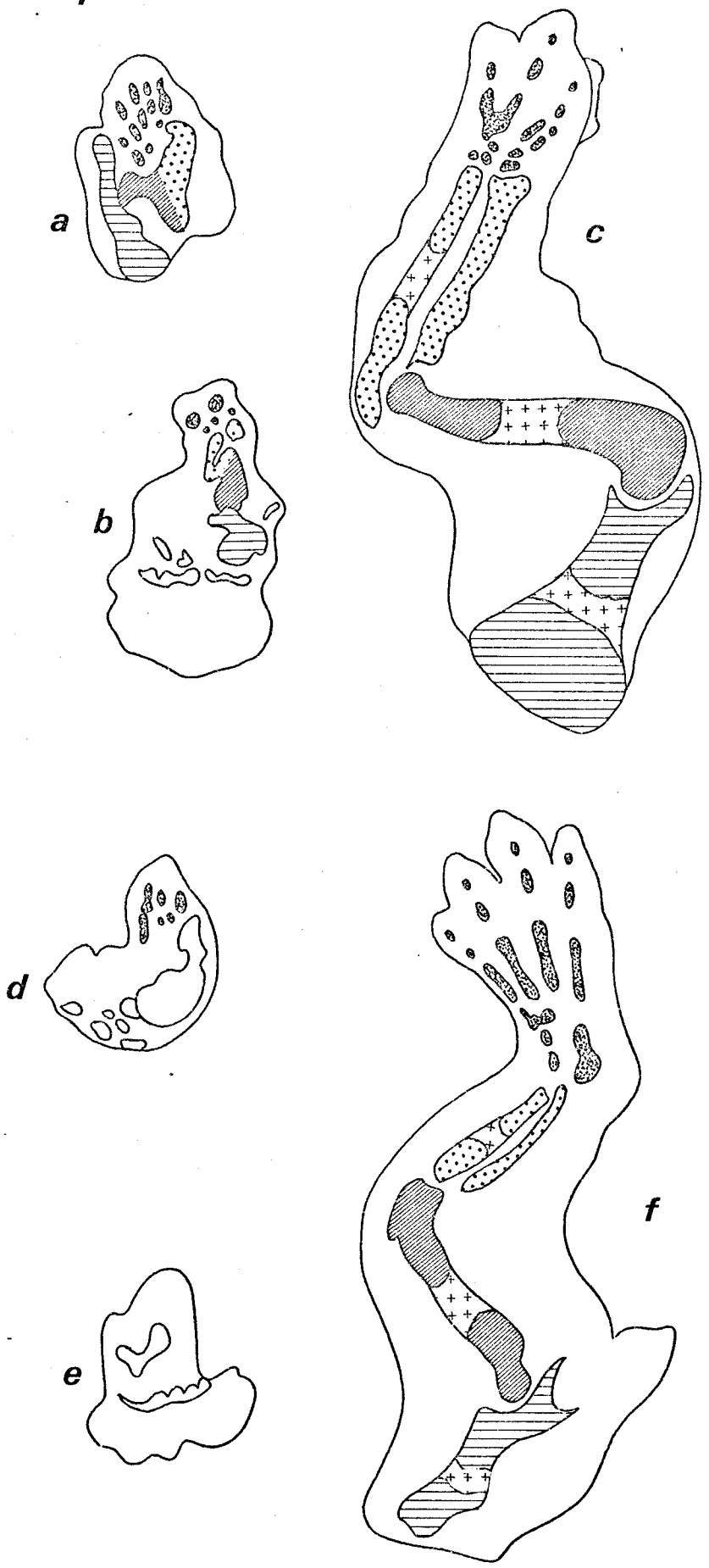
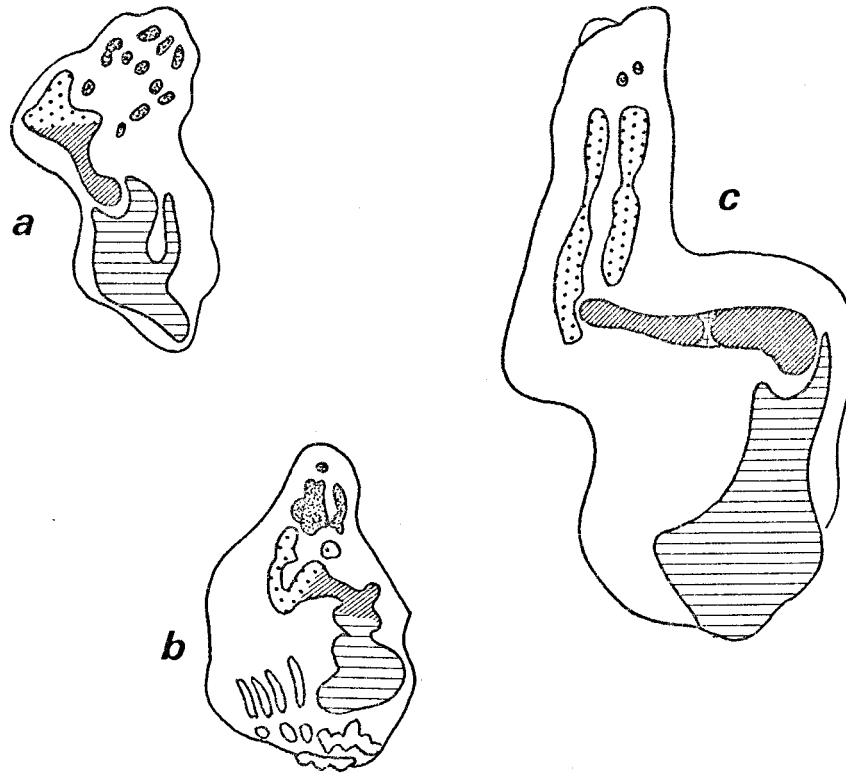


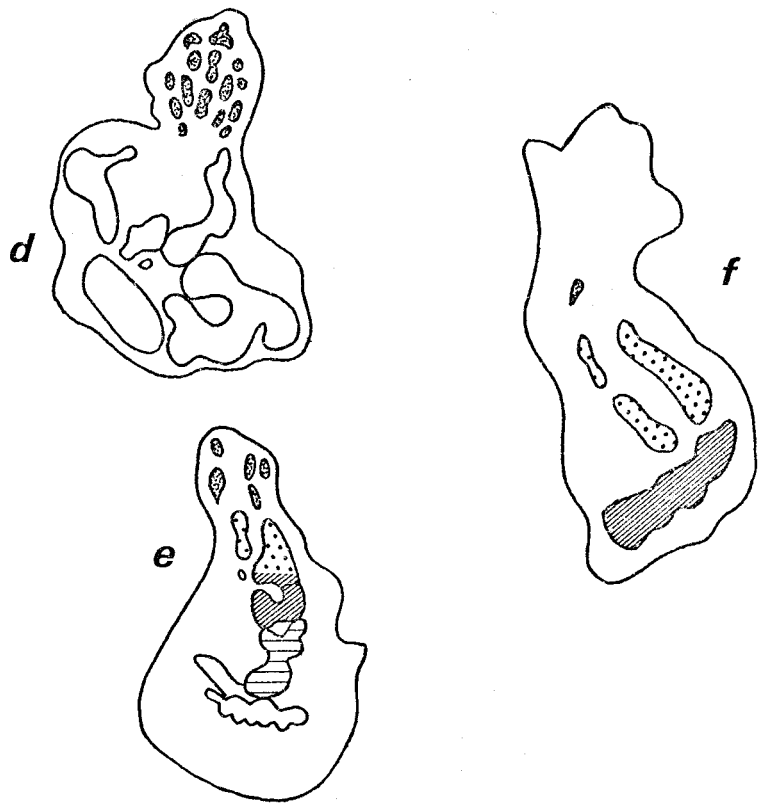
PLANCHE XXI

Squelettes obtenus à partir de bourgeons de stade 20.

Les bourgeons traités sont issus de la manipulation 8.

Manipulation 8





BUS LILLE

PLANCHE XXII : Comparaison du développement in vitro de bourgeons non traités et de bourgeons traités de même stade (les témoins in utero manquent).

a) membre antérieur obtenu in vitro sans traitement

b) membre antérieur obtenu in vitro après traitement

c) membre postérieur obtenu in vitro sans traitement

d) membre postérieur obtenu in vitro après traitement

Fig. 1 : Manipulation 9 - Stade 17 à la mise en culture.

Fig. 2 : Manipulation 10 - Stade 18 à la mise en culture.

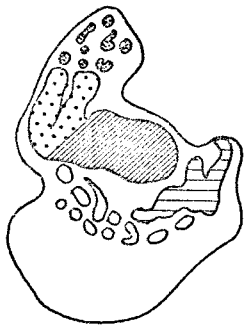
Fig. 3 : Manipulation 10 - Stade 19 à la mise en culture.

Fig. 4 : Manipulation 11 - Stade 19 à la mise en culture.

N.B. Légende identique à celle des planches XI à XXI.

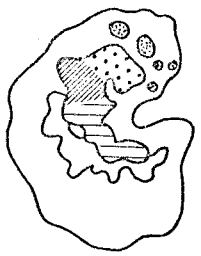
Manipulations 9 , 10 , 11

1



a

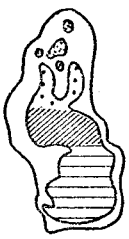
b



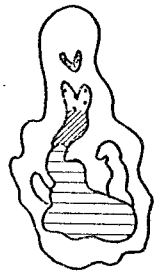
c

d

2

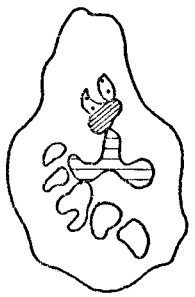


a



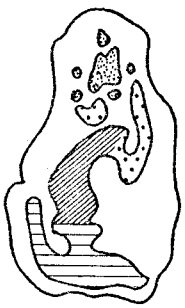
b

c

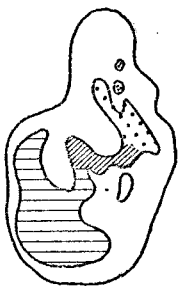


d

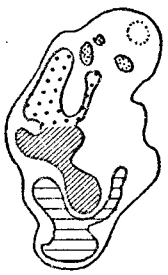
3



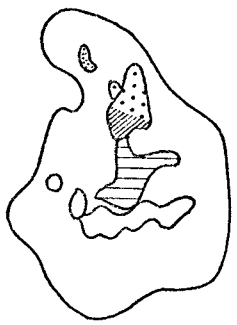
a



b

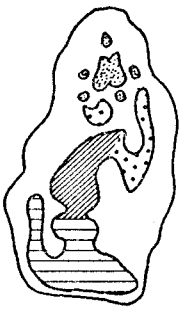


c



d

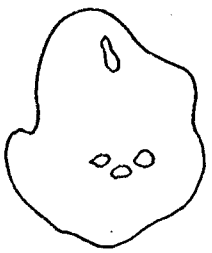
4



a

b

c



d

BUS LILLE

PLANCHE XXIII : Aspects histologiques des cultures de fragments distaux de bourgeons.

Fig. 1 : Zone 2 prélevée sur un bourgeon postérieur de stade 19. L'explant s'est fixé au substrat. Le sinus marginal (➡) est situé en profondeur et contient de nombreux débris cellulaires.

Fig. 2 : Zone 2 prélevée sur un bourgeon antérieur de stade 17 où l'on distingue une mitose (➡). L'explant n'adhère pas au substrat et l'ectoderme entoure un mésoderme sain où la pycnose est très rare.

Fig. 3 : Moitié postaxiale d'un bourgeon antérieur de stade 16. Au niveau de l'A.E.R. coexistent mitose (➡) et traces de dégénérescence (▭). L'ectoderme est formé d'une couche de cellules basales et d'une couche de cellules péridermiques.

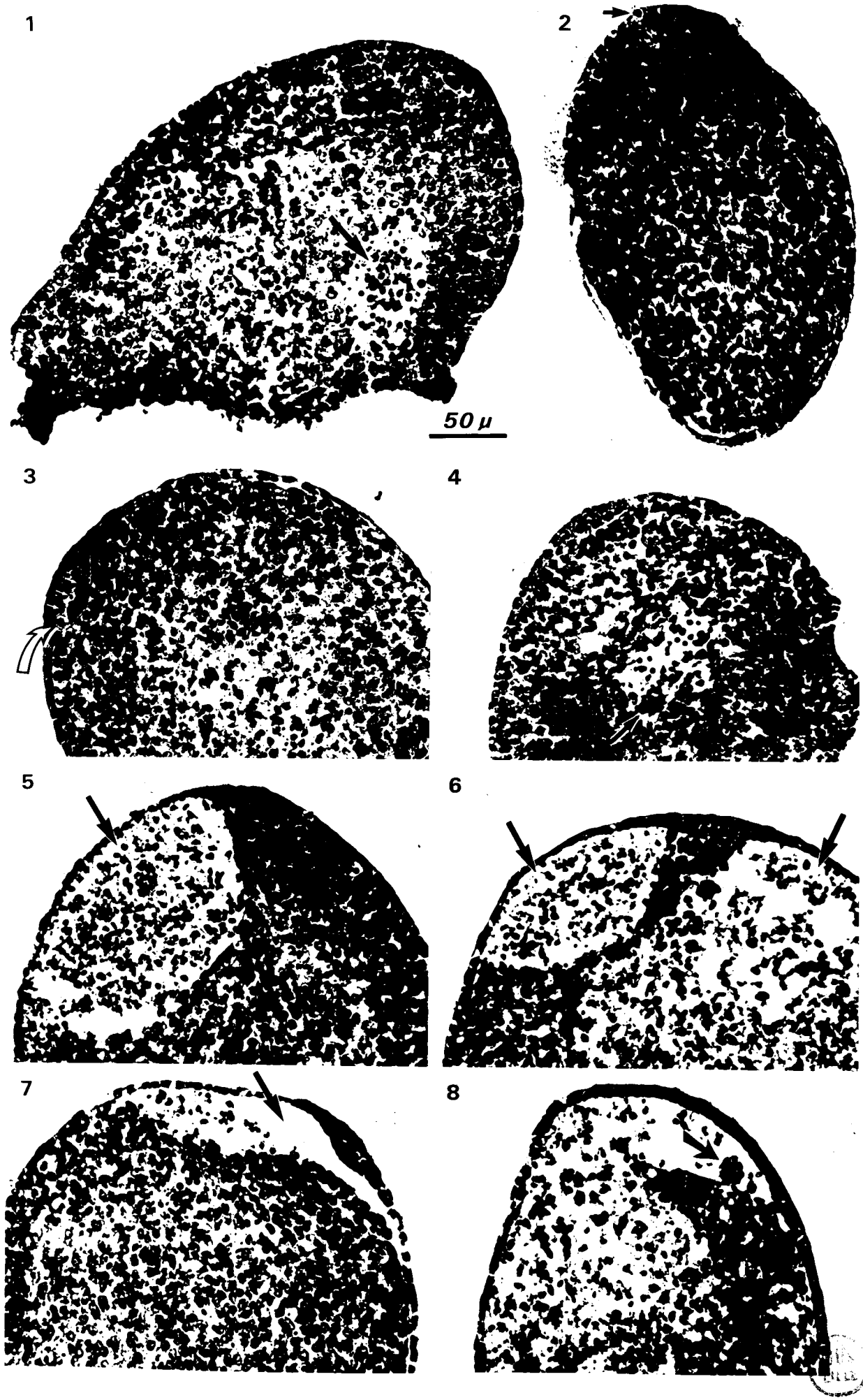
Fig. 4 : Zone 1 prélevée sur un bourgeon antérieur de stade 19. Des débris cellulaires s'accumulent dans le sinus marginal (➡).Le reste du mésoderme est peu atteint par la pycnose mais l'A.E.R. est peu épaisse.

Fig. 5 : Zone 2 prélevée sur un bourgeon postérieur de stade 19. Les produits de dégénérescence cellulaire s'accumulent dans une cavité périphérique qui borde l'A.E.R.(➡). Noter la différence de densité entre le mésoderme marginal et le mésoderme central.

Fig. 6 : Zone 2 prélevée sur un bourgeon postérieur de stade 19. Une travée mésodermique traverse la cavité où se sont accumulés les débris cellulaires (➡) et semble soutenir une A.E.R. de faible épaisseur.

Fig. 7 : Zone 2 prélevée sur un bourgeon postérieur de stade 19. L'A.E.R. est complètement isolée du mésoderme sous-jacent par une cavité où se sont accumulés des débris cellulaires. D'autres débris sont disséminés parmi les cellules saines.

Fig. 8 : Zone 1 prélevée sur un bourgeon postérieur de stade 19. Une très grosse cellule semble contenir des produits de dégénérescence (➡).


1
2
50 μ
3
4
5
6
7
8