

50376
1983
57

50376
1983
57

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

Année 1983

N° 1065

THÈSE

pour l'obtention du

**DOCTORAT DE 3^{ème} CYCLE
DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES**

présentée et soutenue publiquement le ⁵ juillet 1983

par

Mustapha OUDKHIR



**INFLUENCE DE LA DÉNERVATION SUR L'ÉVOLUTION DES CELLULES
RÉGÉNÉRATRICES DU MEMBRE D'UN AMPHIBIEN URODÈLE,
PLEURODELES WALTLII MICHAH**

JURY

Président : Monsieur A. CAPURON
Rapporteur : Monsieur B. BOILLY
Examineurs : Monsieur P. CHIBON
Madame M. COLLYN D'HOOGHE
Monsieur E. LHEUREUX

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

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

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

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

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

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

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNOT Ernest	Biologie végétale

.../...

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie générale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FOURET René	Physique du solide
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences économiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ALLAMANDO Etienne	Electronique et électrotechnique
M. ANCIAN Bernard	Spectrochimie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. BONNELLE Jean Pierre	Catalyse
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BOUQUELET Stéphane	Biochimie structurale
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie physique

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide et cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, électrotechnique, automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique et moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre

Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences économiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAHIEU Jean Marie	Physique atomique et moléculaire.
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESMACQUE Gérard	Génie mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et biochimie appliquées
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PETIT Francis	Chimie organique, minérale et analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean Paul	Physiologie animale
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, électrotechnique, automatique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. VILETTE Michel	Résistance des matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique

M. WATERLOT Michel
M. WERNER Georges
M. WOSNIAK Michel
Mme ZINN JUSTIN Nicole

Géologie générale
Informatique fondamentale appliquée
Hydrométallurgie
Algèbre

PRÉAMBULE

Ce travail consacré à l'étude de l'influence de la dénervation sur le cycle des cellules de régénération des membres de l'Amphibien *Pleurodeles waltlii*, m'a été confié par Monsieur le Professeur B. BOILLY et a été réalisé sous la direction de B. BOILLY et B. LASSALLE au sein de l'équipe de Morphogenèse Animale (ERA CNRS 1047) de l'Université de LILLE I ; l'analyse automatique d'images microscopiques a été effectuée au Laboratoire de microscopie quantitative de l'Université scientifique et médicale de GRENOBLE.

Une partie de ce travail a fait l'objet de 4 communications.

- Colloque Régénération, Clermont ferrand, 1982.

Influence du système nerveux sur la synthèse de DNA dans le blastème de régénération du membre de *Pleurodeles waltlii* M.

- XVth. EDBO International Embryological Conference Strasbourg, 1982.

Etude *in vivo* et *in vitro* de la prolifération des cellules de régénération après dénervation du membre de Triton *Pleurodeles waltlii* M.

- Limb Development and Regeneration, Storrs Connecticut, 1982.

Cellular cycle after denervation in Amphibian limb regeneration.

- Colloque Régénération, Marseille, 1983.

Evolution des cellules de régénération mésodermiques de blastèmes de membre dénervé de *Pleurodeles waltlii* M.

AVANT PROPOS

Avant d'exposer les résultats de mon travail, j'ai le plaisir d'exprimer à Monsieur le Professeur B. BOILLY, ma profonde gratitude pour les conseils et les encouragements de tous ordres qu'il m'a prodigués sans cesse en dirigeant mes recherches. Sa disponibilité permanente à mon égard et à sa très grande amabilité ont facilité mon travail de façon déterminante. Auprès de lui, et grâce à la confiance qu'il m'a accordée, j'ai beaucoup appris du métier de chercheur. Je le prie de trouver en ce mémoire le témoignage de ma reconnaissance et de mon attachement.

Il m'est particulièrement agréable de remercier Monsieur le Docteur B. LASSALLE qui m'a apporté un soutien constant dans la réalisation de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie très vivement :

- Monsieur le Professeur A. CAPURON d'avoir bien voulu examiner ce mémoire et de présider le jury chargé d'examiner ce travail;

- Monsieur P. CHIBON, Professeur à l'Université de Grenoble, en acceptant d'examiner mon travail. Sa compétence en cinétique cellulaire est telle que je suis particulièrement honoré de sa présence dans le jury de cette thèse;

- Madame le Docteur COLLYN d' HOOGE du centre de recherche sur le cancer de Lillé d'apporter sa compétence en matière de cycles cellulaires à l'examen de mon mémoire;

- Monsieur le Docteur E. LHEUREUX qui m'a initié à la technique de cytophotométrie d'absorption, de bien vouloir accepter d'examiner ce travail.

Je tiens aussi à remercier l'Equipe de microscopie quantitative de GRENOBLE sans laquelle une partie de ce travail n'aurait pas pu être réalisée : nos vifs remerciements vont à Monsieur Y. MOUSTAFA qui nous a beaucoup aidé dans l'analyse d'images de nos préparations microscopiques, Monsieur G. BRUGAL pour les discussions critiques et l'ensemble des chercheurs qui nous ont apporté leurs concours à l'apprentissage de cette technique;

La Société Thomson TITN qui a mis le SAMBA 200 à notre disposition.

Je tiens à remercier également Mademoiselle A. ROUSSEAU qui m'a apporté une aide technique précieuse, Mademoiselle C. BESSAU qui a mis beaucoup de soins à la dactylographie de ce mémoire, Madame BONET pour l'initiation à la technique d'autoradiographie . Monsieur CHUIN pour l'élevage des animaux et Monsieur CAREY pour la traduction du texte résumé en anglais.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
POSITION DU PROBLÈME ET MÉTHODOLOGIE	3
A - POSITION DU PROBLEME	4
B - METHODOLOGIE	8
MATERIEL ET TECHNIQUES	10
A - MATERIEL	11
B - TECHNIQUES	11
1) Techniques opératoires	11
2) Technique de culture	12
3) Mesure de la synthèse de DNA	13
- <i>In vivo</i>	13
- <i>In vitro</i>	13
4) Techniques histologiques	13
- Microscopie photonique	13
- Mesure de l'indice mitotique	15
- Microscopie électronique	15
5) Techniques d'autoradiographie	16
- <i>In vivo</i>	16
- <i>In vitro</i>	16
- Microscopie photonique	16
- Microscopie électronique	16
6) Cytophotométrie	17
7) Analyse automatique d'images microscopiques	17
a - Description de l'appareil	17
b - Processus d'acquisition des images de cellules	19
α) Acquisition	19
β) Traitement	20
γ) Classification	21
- Méthode de reconnaissance non supervisé	22
. Principe	22

- Analyse discriminante et analyse canonique	22
. Principe	23
. Analyse canonique	24
 RÉSULTATS	
 CHAPITRE I : EVOLUTION DE LA SYNTHÈSE DE DNA ET L'INDICE MITOTIQUE APRÈS DÉNERVATION	26
 I - EVOLUTION DE LA SYNTHÈSE DE DNA APRES DENERVATION	26
 A - RESULTATS	26
1) <i>In vivo</i>	26
a) Synthèse de DNA dans les blastèmes entiers	26
b) Synthèse de DNA dans l'épiderme et le mésoderme du blastème	27
2) <i>In vitro</i>	
a) Synthèse de DNA dans les blastèmes entiers	30
b) Synthèse de DNA dans l'épiderme et le mésoderme du blastème	31
3) Discussion	32
 II - EVOLUTION DE L'INDICE MITOTIQUE APRES DENERVATION	36
 A - RESULTATS	36
1) <i>In vivo</i>	36
2) <i>In vitro</i>	38
 B - DISCUSSION	40
 III - DISCUSSION GENERALE	41
 CHAPITRE II : INFLUENCE DE LA DÉNERVATION SUR L'ÉVOLUTION DES CELLULES DE RÉGÉNÉRATION DANS LE CYCLE CELLULAIRE. RÉSULTATS CYTOPHOTOMÉTRIQUES.	43
 I - RESULTATS	43
 II - DISCUSSION	51

CHAPITRE III : INFLUENCE DE LA DÉNERVATION SUR L'ÉVOLUTION DES CELLULES DE RÉGÉNÉRATION DANS LE CYCLE CELLULAIRE. RÉSULTATS AUTORADIOGRAPHIQUES	53
I - ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE <i>IN VIVO</i>	55
A - MICROSCOPIE PHOTONIQUE	55
B - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	57
C - DISCUSSION	58
II - ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE <i>IN VITRO</i>	59
A - RESULTATS	59
B - DISCUSSION	61
III - CONCLUSION	61
 CHAPITRE IV : ETUDE DE L'ÉVOLUTION DU CYCLE DES CELLULES DE RÉGÉNÉRA- TION APRÈS DÉNERVATION PAR ANALYSE D'IMAGES MICROSCOPIQUES (SAMBA 200)	 63
I - INTRODUCTION	63
II - RESULTATS	65
A - EPIDERME	71
B - MESODERME	72
III - DISCUSSION	74
A - ÉVOLUTION DU POURCENTAGE DE CELLULES DANS LES PHASES S, G ₂ et M APRÈS DÉNERVATION	74
B - ÉVOLUTION DU POURCENTAGE DE CELLULES DANS LES PHASES G ₁ et G ₀ APRÈS DÉNERVATION	75
CONCLUSION GÉNÉRALE	80
RÉSUMÉ	82
SUMMARY	83
BIBLIOGRAPHIE	84

INTRODUCTION

Parmi les facteurs contrôlant la régénération du membre d'Amphibien, le système nerveux a retenu depuis longtemps l'attention des chercheurs. On sait, en effet, depuis les travaux de TODD (1823) qu'un membre dénervé au moment de l'amputation est incapable de régénérer ; dans ces conditions le moignon cicatrise normalement, mais on n'observe pas d'accumulation de cellules mésenchymateuses derrière l'épiderme cicatriciel alors que les tissus de la souche subissent une certaine histolyse (WEISS, 1925 ; SCHOTTE, 1926 ; SCHOTTE et BUTLER, 1941). Cependant, la réponse du membre dénervé dépend de l'âge du régénérat au moment de la dénervation (SINGER et CRAVEN, 1945 ; BUTLER et SCHOTTE, 1949) ; il existe, en effet, au cours de la régénération une période critique au delà de laquelle le régénérat manifeste une certaine indépendance vis-à-vis du système nerveux ; si la dénervation est réalisée avant cette période, c'est à dire à une époque où la différenciation du blastème n'a pas encore commencé, le blastème cesse de croître et subit même une régression ("phase dépendante du système nerveux") ; au delà de cette période, la croissance du blastème dénervé, bien que ralentie, se poursuit jusqu'à l'édification d'un régénérat normalement constitué, mais de petite taille ("phase indépendante du système nerveux").

En fait, le contrôle des premières phases de la régénération par le système nerveux dépend de la quantité de fibres nerveuses (ou d'axoplasme) présente au niveau du front de section (SINGER, 1952, 1974 ; RZEHAk et SINGER, 1966). Ces fibres exercent leur action en libérant un facteur de nature protéique (facteur trophique ou neurotrophique), dont on a pu montrer qu'il intervenait sur le métabolisme des acides nucléiques et des protéines (SINGER, 1978).

Cependant, si l'existence du facteur neurotrophique et ses modalités d'action sur la régénération font l'unanimité des chercheurs, il n'en est pas de même de son mode d'action au niveau cellulaire.

POSITION DU PROBLÈME ET MÉTHODOLOGIE

A - POSITION DU PROBLEME.

L'arrêt de la régénération par dénervation doit être envisagé au niveau du cycle des cellules de régénération. Le cycle cellulaire (HOWARD et PELC, 1953) comprend quatre phases (Fig. 1).

- * La phase G_1 , période post-mitotique ou de présynthèse du DNA.
- * La phase S, période de synthèse de DNA
- * La phase G_2 , période de post-synthèse ou prémitotique.
- * La phase M, période de division de la cellule ou mitose.

Les phases G_1 et G_2 sont caractérisées par une teneur en DNA respectivement de 2C et 4C.

Lorsque dans une population cellulaire, une cellule cesse temporairement de se diviser, elle est dite en G_0 (PATT et QUASTLER, 1963), cette phase G_0 étant équivalente en ce qui concerne sa teneur en DNA à une phase G_1 (2C) ou parfois à une phase G_2 (4C). Cette sortie du cycle peut être transitoire, dans ce cas les cellules sont mises en réserve, soit en G_1 (G_{01}), soit en G_2 (G_{02}) (Fig. 1), ces cellules pouvant réintégrer facilement le cycle en cas de besoin.

La sortie du cycle peut être définitive ; dans ce cas les cellules s'engagent dans la différenciation, cette évolution concerne les cellules ayant une teneur en DNA égale à 2C et proviennent donc de G_1 ; ces cellules peuvent dans certaines conditions retourner dans le cycle par dédifférenciation notamment au cours de la régénération.

L'arrêt de la régénération après dénervation peut être dû :

- soit à un ralentissement du cycle cellulaire qui se traduit par une diminution de la multiplication cellulaire, ce ralentissement du cycle peut être la conséquence d'un allongement d'une ou plusieurs phases du cycle.

- soit à un arrêt du cycle (correspondant à une sortie du cycle), celui-ci pouvant se faire soit en G_2 soit en G_1 . Ce comportement cellulaire peut être accompagné d'une disparition des cellules par lyse dans une phase du cycle, celle par exemple où les cellules s'arrêteraient.

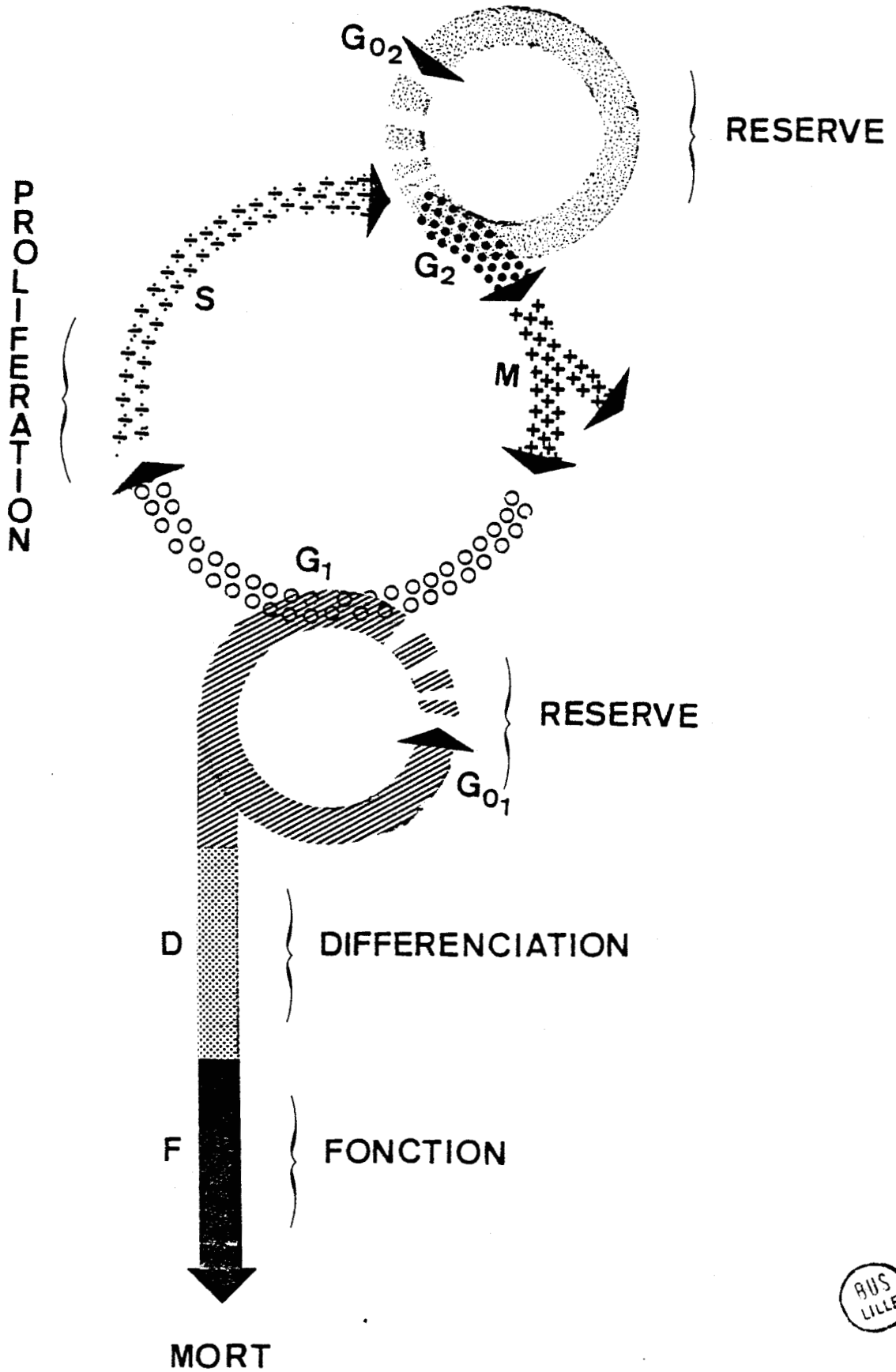


Figure 1 : Représentation schématique du cycle cellulaire (d'après GIROUD, 1982).

La première réponse à ce problème a été apportée par TASSAVA et coll. (1974, 1975 et 1978). Après dénervation du membre (d'*Ambystoma mexicanum* ou de *Notophthalmus viridescens*) soit au moment de l'amputation soit 8 jours après, ces auteurs ont constaté que les cellules du blastème ne se divisent plus alors qu'elles étaient encore capables d'incorporer la thymidine tritiée ; ce comportement particulier des cellules de régénération après dénervation était interprété comme un blocage du cycle de ces cellules en G_2 . Toutefois, des études micro-densitométriques de coupes colorées au Feulgen effectuées par ces auteurs montraient que le rapport du nombre de cellules à 4N (équivalente à 4C) sur le nombre de cellules à 2N (équivalente à 2C) était identique chez les dénervés et les témoins ; à la lumière de ces résultats, ces auteurs considéraient donc que les cellules bloquées en G_2 étaient éliminées, cette disparition cellulaire rendant compte de la résorption du blastème après dénervation.

L'hypothèse d'un blocage du cycle en G_2 n'a pas rencontré beaucoup de succès. Seuls quelques auteurs dont CARLONE et FORET (1979) ont approuvé cette interprétation sur la base de résultats obtenus *in vitro*. Ces auteurs, dans le cadre d'études de la restauration de la prolifération de blastèmes dénervés par apport d'extraits nerveux ou d'AMPc, ont constaté une augmentation significative de l'indice mitotique dans un délai de 8 h. ; compte-tenu de la durée de G_2 , l'apparition d'un pic de mitoses 8 h. après l'addition d'extraits de cerveau ou d'AMPc ne peut provenir, selon ces auteurs, que des cellules bloquées en G_2 par la dénervation.

Des études de même nature effectuées cette fois *in vivo* par JABAILLY et SINGER (1977) peuvent être interprétées de la même façon. Ces auteurs ont constaté que l'infusion d'extraits de cerveau dans des blastèmes dénervés 12 à 13 jours après l'amputation entraînait une augmentation importante de l'incorporation de la thymidine 3H après 24 h. de traitement ; dans l'hypothèse d'un blocage en G_2 , ce délai correspondrait à la durée des phases M, G_1 et d'une partie de S, ce qui semble compatible avec la durée du cycle telle qu'elle a été établie par MADEN (1976) ; par contre, ce dernier (MADEN, 1978) rejete l'hypothèse de TASSAVA après avoir constaté qu'il existait des mitoses dans les blastèmes dénervés et que dans ces derniers, l'indice mitotique évoluait pratiquement comme le pourcentage de

cellules incorporant la thymidine ^3H .

D'autre part, cet auteur a constaté que des cellules bloquées en G_2 (par une irradiation aux rayons X) ne sont pas éliminées ainsi que le supposait TASSAVA (dans le cas d'une dénervation).

Enfin TASSAVA (1978) a tenté d'apporter de nouveaux éléments à la solution de ce problème en analysant le cycle des cellules de blastèmes dénervés et innervés. Malheureusement, cet auteur n'a pas constaté de différences significatives dans la durée du cycle cellulaire de ces deux types de blastèmes ; il estime que ses mesures de durée de cycle, méthode de (QUASTLER et SHERMAN, 1959), sont rendues imprécises après un temps de dénervation supérieur à 3 jours en raison du peu de mitoses rencontrées dans ces conditions et des phénomènes de résorption consécutifs à la dénervation. TASSAVA et coll. ont établi récemment (1983) le cycle cellulaire de blastèmes dénervés partiellement et dont la régénération n'était donc pas bloquée mais simplement retardée ; là encore, les résultats obtenus par ces auteurs n'ont pas montré de différences significatives entre dénervés et innervés pour les durées de ($G_2 + 1/2M$) d'une part et de S d'autre part.

Ainsi, à la lumière de ces résultats, il apparaît que la mesure de l'indice mitotique et du pourcentage de cellules incorporant la thymidine ^3H à l'exclusion de la mesure des paramètres du cycle cellulaire ont permis d'aborder le problème du comportement des cellules de régénération après dénervation sans toutefois le résoudre ; en effet, ils permettent les uns de considérer que la dénervation bloque les cellules en G_2 (TASSAVA et coll., 1974, 1975, 1978 ; CARLONE et FORET, 1979), les autres de rejeter cette hypothèse (MADEN, 1978).

Cependant, un autre type d'étude réalisé par MADEN (1979) d'une part et LOYD et CONNELLY (1981) d'autre part a apporté d'autres éléments de réponse ; cette étude basée sur la cytophotométrie de cellules squashées et colorées au Feulgen a montré qu'après dénervation d'un blastème de régénération au stade cône, les cellules s'accumulent en G_1 ; selon MADEN, cette accumulation de cellules en G_1 serait due soit à un allongement de G_1 , soit à une mise hors cycle d'un certain nombre de cellules. Pour LOYD et CONNELLY, cette accumulation en G_1 ne concernerait que les blastèmes "nerf-indépendant" ; dans ce cas, une redifférenciation précoce des blastèmes

dénervés rendrait compte de cette évolution ; par contre, les blastèmes "nerf-dépendant" ne présentent pas de différence particulière après dénervation au niveau du cycle...

Compte tenu du caractère hétérogène des résultats obtenus, il nous a semblé opportun de répondre à ce problème sur des bases nouvelles.

B - METHODOLOGIE.

Nous avons utilisé des blastèmes de régénération au stade cône; ce stade, dépendant du système nerveux, présente plusieurs avantages :

- Il est facilement identifiable sur le plan morphologique et permet donc une plus grande homogénéité dans les régénérats utilisés.
- Il présente une taille suffisante pour être cultivé *in vitro*.
- Il correspond à une phase d'intense prolifération cellulaire et permet donc d'apprécier plus facilement l'influence du système nerveux sur ce phénomène.
- Le grand nombre de cellules qu'il contient donne la possibilité d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Toutefois, ces avantages sont entachés d'un inconvénient, dû à la proximité de la phase de différenciation qui apparaît au stade suivant (palette).

Une étude du cycle des cellules de régénération après dénervation à été menée *in vivo* et *in vitro*, à la fois sur les deux types de cellules mésodermiques et épidermiques composant les blastèmes. Deux types d'approche méthodologiques ont été utilisées :

Dans le premier type, un certain nombre de techniques classiques permettant de préciser le comportement des cellules au cours du cycle ont été utilisées à l'exclusion de la mesure directe des différentes phases du cycle cellulaire par la méthode des pourcentages de mitoses marquées, technique qui s'est avérée imprécise en raison du peu de mitoses rencontrées dans les blastèmes dénervés. Dans un premier temps, nous avons mesuré la synthèse de DNA et l'indice mitotique des cellules de régénération afin de

détecter éventuellement un blocage dans une phase du cycle. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé la cytophotométrie afin de préciser le comportement des cellules dans le cycle. Dans un troisième temps, grâce à l'autoradiographie, nous avons évalué le pourcentage de cellules hors cycle.

Dans le deuxième type d'approche méthodologique, nous avons étudié la cinétique cellulaire des blastèmes par analyse automatique des images microscopiques de noyaux de cellules de régénération à l'aide du système d'analyse microphotométrique à balayage automatique.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

A - MATERIEL.

Les animaux utilisés, *Pleurodeles waltlii* Michah (Amphibien, Urodèle) proviennent d'un élevage réalisé au laboratoire ; ils sont âgés de 6 mois à 1 an et demi et leur taille est comprise entre 4 et 9 cm.

Les animaux maintenus dans l'eau de robinet à la température de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ sont nourris de larves de chironomes et de foie de boeuf haché, deux fois par semaine ; l'eau d'élevage est changée après chaque repas.

B - TECHNIQUES.

1) Techniques opératoires.

Les blastèmes de régénération sont obtenus par section des membres antérieurs au niveau du stylo-pode à proximité du coude. Avant l'opération, les animaux sont anesthésiés au MS 222 (Tricaine méthane sulfonate Sandoz) à 1 ‰.

L'effet de la dénervation est étudié *in vivo* et *in vitro* :

- *In vivo* : La dénervation est effectuée au moment où le régénérat a atteint le stade cône (Pl. I) environ 15 à 20 jours après l'amputation. Elle est obtenue par section des nerfs spinaux 3,4 et 5 au niveau du plexus brachial du membre droit, le membre gauche dont l'innervation est conservée sert alors de témoin. Cette opération est répétée tous les 2 jours afin d'éviter la réinnervation du blastème par les fibres nerveuses régénérées.

- *In vitro* : La culture *in vitro* permet de rendre les blastèmes excisés (au stade cône) strictement aneurogéniques ; les effets du système nerveux sont étudiés par association de ces blastèmes avec des ganglions provenant de la racine dorsale des nerfs spinaux 3 et 4 brachiaux et 16 et 17 cruraux d'un Pleurodèle donneur.

Lorsque l'étude séparée des 2 tissus (épiderme et mésoderme) constituant le blastème s'avère nécessaire, les régénérats sont plongés dans une solution d'E.D.T.A. (éthylène diamine tétraacétique) à 1 p. 1000

dans le liquide de Steinberg sans calcium ni magnésium à 35°C pendant 15 minutes. L'épiderme est alors séparé mécaniquement du mésoderme.

2) Technique de culture.

La culture de blastème est réalisée selon la technique de LASSALLE (1983). Les blastèmes excisés sont stérilisés pendant 10 mn dans une solution de Ringer contenant de la pénicilline (500 U/ml), de la streptomycine (500 µg/ml) et de la mycostatine (500 U/ml). Après un passage rapide d'environ 1 mn dans une solution de chloramine à 1 % pour parfaire la stérilisation, les blastèmes sont rincés dans la solution saline stérile. Les ganglions spinaux subissent le même traitement.

Les explants sont cultivés individuellement à l'interface air-milieu. Ils sont posés sur des filtres millipore (diamètre des pores : 8 µm), eux-mêmes placés sur des grilles en acier en forme de trépied (Fig. 2) reposant sur le fond d'une boîte de pétri en matière plastique de 4 cm de diamètre (modèle Corning).

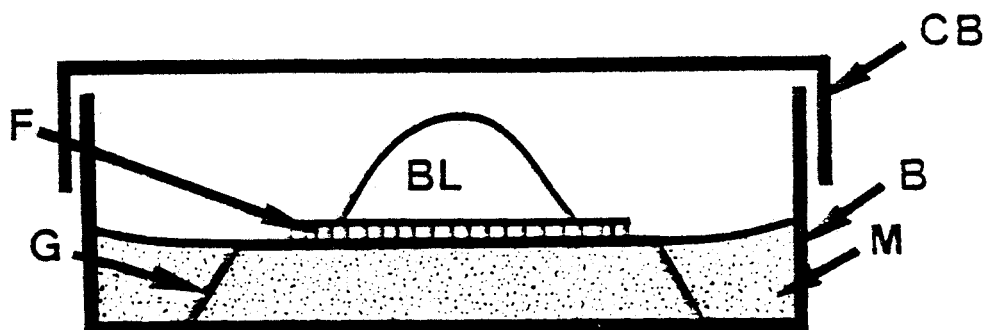


Figure 2 : Schéma du dispositif de culture ; CB : couvercle de la boîte de pétri ; M : milieu de culture ; B : boîte de pétri ; F : filtre millipore ; G : grille en forme de trépied.

Le milieu de culture est constitué de Leibowitz L15 (GIBCO) dilué à 70 % auquel sont ajoutés 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine ainsi que de l'insuline (CHOLAY) à raison de 0,035 U/ml. Les cultures sont maintenues à 25°C dans une atmosphère normale.

3) Mesure de la synthèse de DNA.

- *In vivo.*

La synthèse de DNA est appréciée par l'incorporation de thymidine tritiée (activité spécifique : 1 Ci/mM, CEA) ; le précurseur est injecté intrapéritonéalement 8 h. (Fig. 3) avant le prélèvement du blastème à raison de 40 μ Ci par animal.

Les blastèmes sont alors homogénéisés individuellement dans 1 ml d'eau distillée à l'aide d'un homogénéiseur de POTTER et ELVEHJEM. Chaque homogénat est transféré dans un tube à essai placé dans la glace fondante auquel est ajouté 1 ml d'eau distillée provenant du rinçage de l'homogénéiseur. Un échantillon de 0,4 ml est prélevé soit pour la détermination de la quantité de protéines par la méthode de LOWRY et coll. (1951) modifiée (MARKWELL et coll., 1978) ; soit la détermination de la quantité de DNA par la méthode de CLIFFORD et coll. (1979).

Le volume restant (1,6 ml) est précipité par l'acide trichloroacétique (ATCA) (0,2 ml) pendant 15 mn à 0°C. Le précipité est recueilli sur un filtre en fibre de verre (WHATMAN GF/C). Ce dernier est placé dans un tube contenant 6 ml de liquide scintillant (Lipoluma) et la radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation (LKB, WALLAC 1215).

- *In vitro.*

Pour mesurer la synthèse de DNA *in vitro*, chaque blastème est cultivé pendant 24 h. (Fig. 4) en présence de 3 μ Ci/ml de thymidine ^3H (activité spécifique : 1 Ci/mM, CEA) 48 h. après l'explantation. Les explants sont alors rincés dans un milieu dépourvu de précurseur radioactif puis subissent le même traitement qu'*in vivo*.

4) Techniques histologiques.

- Microscopie photonique.

Les blastèmes de régénération destinés à l'étude histologique sont fixés au liquide de BOUIN HOLLANDE sans acide acétique pendant 48 h. Après lavage, les échantillons sont inclus dans la paraffine et débités en coupes sériées de 5 à 7 μ m d'épaisseur.

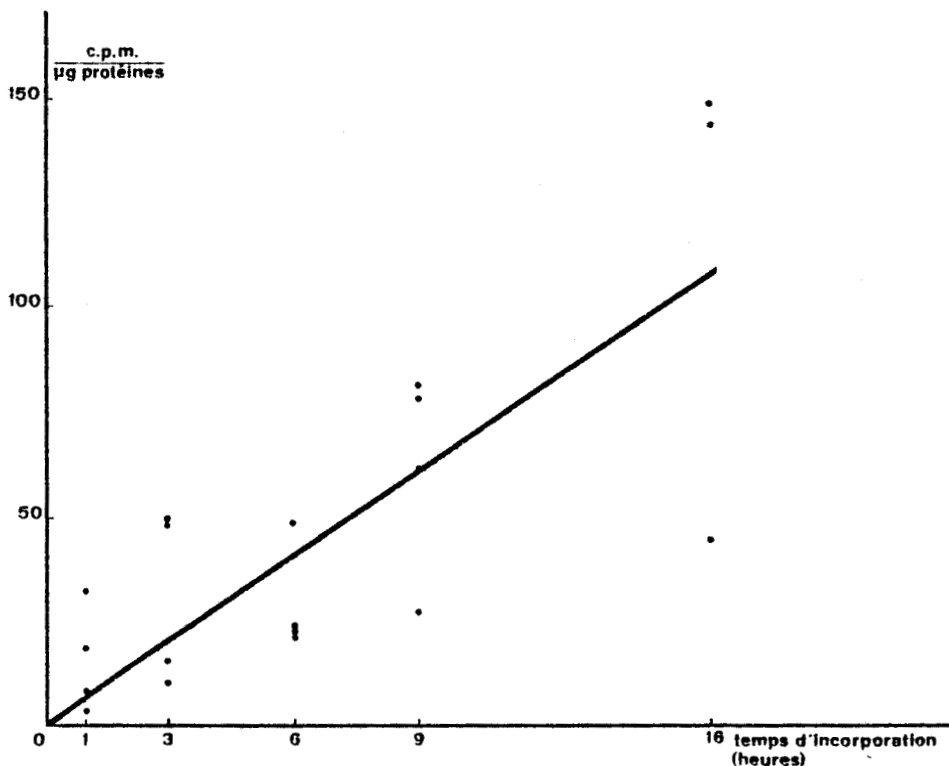


Figure 3 : Evolution de l'incorporation de la thymidine ^3H in vivo en fonction du temps d'incubation.

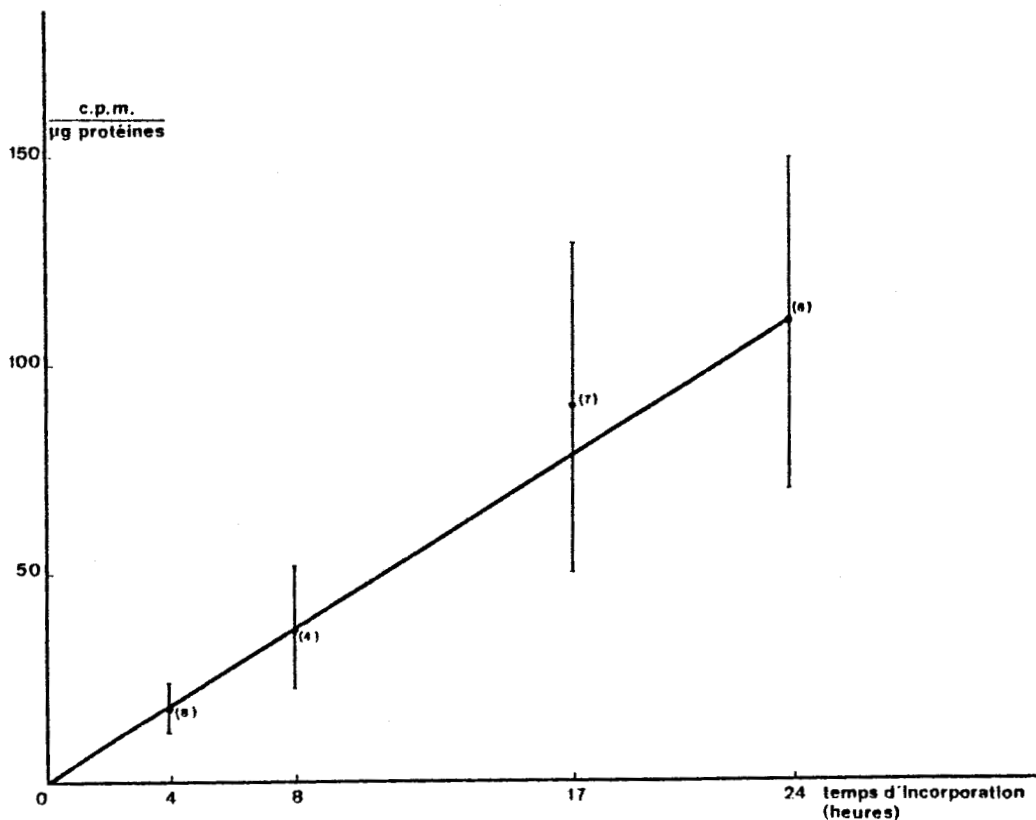


Figure 4 : Evolution de l'incorporation de la thymidine ^3H in vitro en fonction du temps d'incubation. Entre parenthèses : nombre d'échantillons utilisés.



Les coupes sont colorées au Rouge Nucléaire/Picroindigo Carmin ou par la réaction de Feulgen Rossenbeck et montées au Xam.

Les régénérats destinés à l'analyse du contenu nucléaire sont traités par la méthode des "squashes" selon le protocole suivant :

Après séparation du mésoderme de l'épiderme, les 2 tissus sont traités pendant 20 minutes dans une solution de trypsine à 2 p. 100 dans le liquide de STEINBERG dépourvu de calcium et magnésium à la température de 35°C, puis fixés dans la solution de SMITH pendant 18 h. à 4°C. Après lavage à l'eau courante pendant 24 h., les échantillons sont stockés dans l'alcool 70. Au moment de la coloration, les échantillons sont écrasés entre deux lames dans une goutte d'acide acétique à 45 p. 100. L'ensemble des deux lames est ensuite refroidie à - 40° C sur une galette de carboglace ; chacune des 2 lames, après séparation mécanique est collodionnée et hydratée ; les préparations sont ensuite hydrolysées dans l'acide chlorhydrique 5N à 26°C pendant 1 h. La coloration de DNA est obtenue par la "réaction nucléale" de FEULGEN et ROSSENBECK (1924) ; les préparations sont colorées dans le réactif de SCHIFF (MERCK) pendant 1 h. à 26°C.

- Mesure de l'indice mitotique.

Toutes les cellules présentant une phase de mitose allant de la prophase à la télophase sont dénombrées toutes les deux coupes, tandis que le nombre total de cellules blastémales est dénombré toutes les 4 coupes.

L'indice mitotique est évalué en faisant le rapport du nombre de cellules en mitose sur un nombre de cellules supérieur ou égal à 10.000.

- Microscopie électronique.

Les blastèmes sont fixés pendant 4 h. à 4° C dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % dans le tampon cacodylate de sodium 0,1 M (pH 7,4). Les pièces sont ensuite lavées pendant 1 nuit dans la même solution tampon et post-fixées au tétroxyde d'Osmium à 1 % dans le même tampon à la température ambiante. Les échantillons enrobés dans l'araldite sont débités en coupes semi-fines et ultrafines à l'aide d'un ultramicrotome. Les coupes semi-fines sont colorées au bleu Azur à 0,1 % ou au bleu de Toluidine à 0,2 % ; les coupes ultrafines sont contrastées par l'acétate d'Uranyle à 2 % puis par le citrate de Plomb selon la technique de REYNOLDS (1963).

Les coupes recueillies sur grilles nues sont observées au microscope électronique JEOL.JEM 120 CX.

5) Techniques d'autoradiographie.

L'autoradiographie a été menée à l'aide de la thymidine ^3H . Cette technique a été utilisée à la fois *in vivo* et *in vitro* afin de mesurer l'indice de marquage ($\text{IL} = \frac{\text{nombre de cellule marquée}}{\text{nombre de cellule total}} \times 100$) ; ce dernier est établi au microscope photonique sur un nombre de cellule supérieur ou égal à 5.000.

- In vivo.

Les autoradiographies ont été réalisées d'une part après un temps d'incubation court (1h.), d'autre part, après un temps d'incubation long (48h. et 96h.) : dans ce dernier cas les injections de précurseur sont répétées toutes les 6 h. Le précurseur est injecté intrapéritonéalement à raison de 20 $\mu\text{Ci}/\text{animal}$ (activité spécifique : 1Ci/mM CEA) 4 jours après la dénervation.

- In vitro.

Les blastèmes excisés sont mis en présence de thymidine ^3H soit 3 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ (activité spécifique : 1Ci/mM. CEA) 48h. après le début de la culture. Les échantillons sont ensuite traités pour la microscopie photonique

- Microscopie photonique.

Après montage des coupes sur des lames gélatinées et après déparaffinage, les lames sont déshydratées, séchées puis recouvertes d'émulsion nucléaire NTB^{*}III 50/50 dans l'eau distillée, à 40°C. Les lames émulsionnées sont conservées à l'obscurité en atmosphère sèche pendant 12 jours puis révélées durant 2 minutes et demi dans le révélateur KODAK D19B à 20°C. Les lames sont ensuite colorées au Rouge nucléaire-picro indigo carmin et montées dans le Xam.

- Microscopie électronique.

Les coupes sont déposées sur des lames préalablement plongées dans une solution de celloïdine à 2 % dans l'acétate d'isoamyle. Les coupes portées par les lames sont contrastées, par trempage des lames dans une solution d'acétate d'uranyle à 2,5% puis le citrate de plomb selon la technique indiquée précédemment. Après rinçage, les lames sont séchées et recouvertes d'un film de carbone. Elles sont ensuite émulsionnées à

l'aide de l'émulsion ILFORD L4 (1 volume pour 4 volumes d'eau distillée, à 40° C), puis conservées à l'obscurité en atmosphère sèche pendant 5 semaines. Après révélation, le film de celloidine portant les coupes est séparé de la lame par immersion de celle-ci dans l'eau : les coupes sont alors récupérées sur des grilles et observées au microscope électronique.

6) Cytophotométrie.

Elle a été réalisée à l'aide d'un microphotomètre LEITZ MPVI sur des préparations de cellules de régénération squashées et colorées par la réaction de FEULGEN et ROSSENBECK. La quantité de DNA contenue dans les noyaux de ces cellules a été mesurée par la méthode des 2 longueurs d'onde (PATAU, 1952) respectivement à 570 et 498 nm, en utilisant les tables de MENDELSON (1958) ; elle est exprimée en unité arbitraire. L'étude a porté sur un minimum de 100 noyaux par tissu de blastème. Chaque population analysée est représentée sous forme d'histogramme de fréquence. Sur chaque histogramme, nous avons estimé la valeur moyenne 2C de la quantité de DNA des cellules quiescentes, puis calculé les valeurs correspondant à 3C (synthèse partielle du DNA) et 4C (synthèse complète du DNA).

7) Analyse automatique d'images microscopiques.

a - Description de l'appareil.

Elle est réalisée à l'aide du SAMBA 200 (Thomson-TITN), système d'analyse microscopique à balayage automatique dont le hardware et le software ont été décrits par BRUGAL et coll. (1979). Ce système en intégrant les paramètres densitométriques et morphométriques permet de classer automatiquement les cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (GIROUD, 1982 ; MOUSTAFA et BRUGAL, 1983).

Le système se compose (Fig. 5) d'organes d'analyse, de commande, de traitement et des périphériques.

Les organes d'analyse comprennent :

- Un microscope disposant d'une platine porte lame motorisée dans les trois directions (X, Y, Z).
- Un module de balayage X, Y à miroirs croisés (Scanners).
- Un capteur d'analyse rapide à barette de photodiodes.

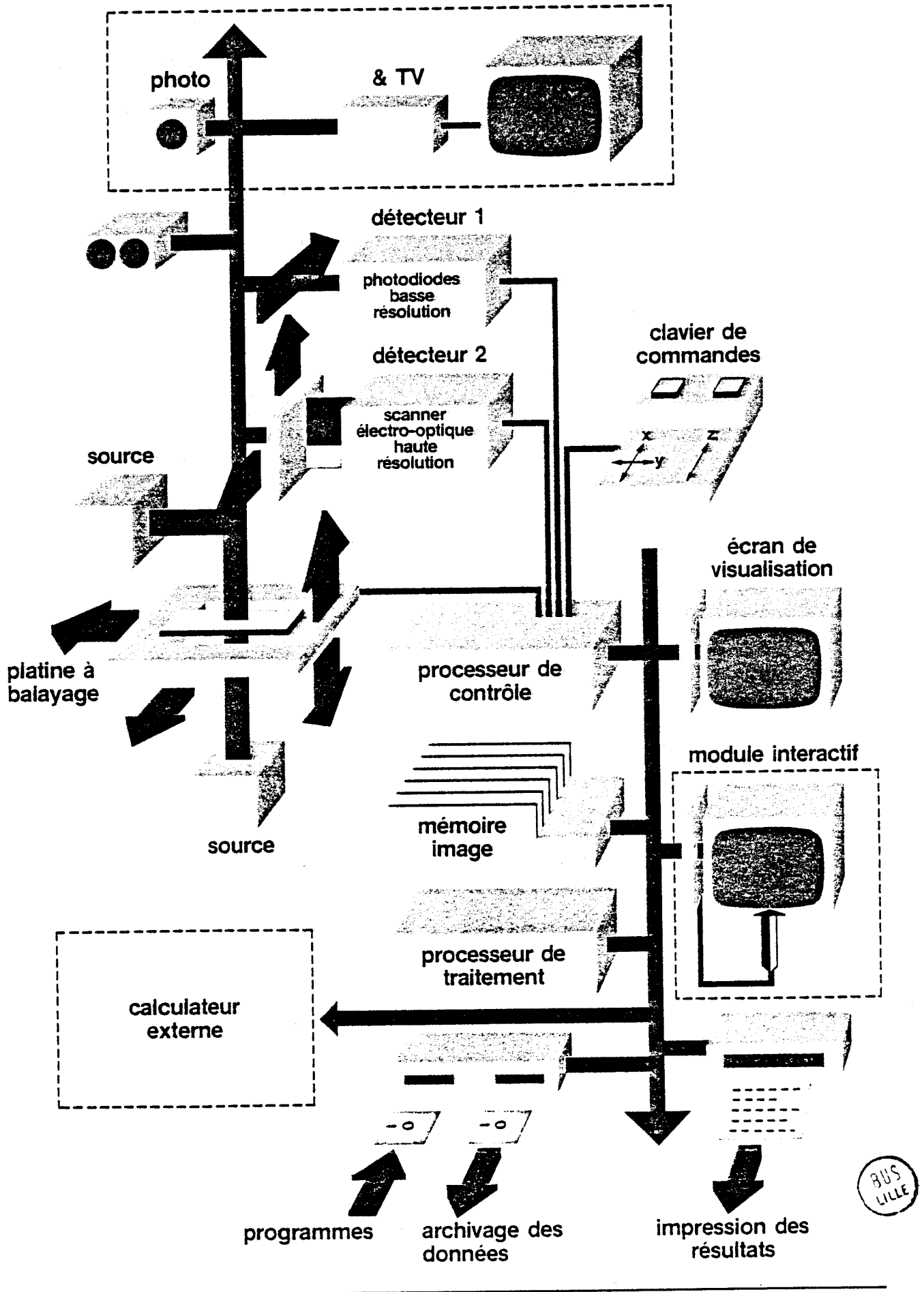


Figure 5 : Schéma fonctionnel du Samba 200.

- Un capteur d'analyse fine à photomultiplicateur
- Un barillet porte-filtre à quatre positions (rouge, vert, bleu, et une quatrième longueur d'onde au choix de l'opérateur).

Des organes de commande et de traitement :

- Une électronique de commande des platines, des scanners X, Y du barillet porte-filtre et des obturateurs.
- Une électronique d'acquisition des signaux délivrés par les capteurs photodiodes et photomultiplicateur.
- Les interfaces avec le système informatique.
- Un processeur de commande et de contrôle exécutant toutes les fonctions logicielles liées au matériel.
- Un processeur de traitement supportant les logiciels d'application.
- Une mémoire commune de 112 Koctets.
- Une mémoire image de 256 X 256 X 19 bits, dont 1 bit d'Overlay.

Les périphériques.

- Un écran couleur pour l'affichage des images de toutes les indications nécessaires à l'opérateur.
- Un lecteur enregistreur de cassettes pour le chargement des programmes spécifiques de l'application ("Floppy disks").
- Un pupitre de commande.

b - Processus d'acquisition des images de cellules.

α) Acquisition.

L'acquisition se fait en deux étapes. La première, à basse résolution, permet de repérer sur la lame les cellules isolées destinées à être analysées et classées ; la deuxième, à haute résolution, donne de la cellule centrée dans le champ du microscope une ou plusieurs images. Cette décomposition de l'acquisition permet d'accélérer considérablement la cadence d'acquisition des cellules.

L'acquisition à basse résolution se fait par l'intermédiaire de la barette et du déplacement automatique de la lame devant l'objectif : en sommant quatre photodiodes consécutives de la barette, on obtient une image formée de 64 lignes de 64 points à la résolution maximale de 25 µm.

Les images de portions de lames ainsi acquises sont placées par le processeur de commande dans la mémoire commune. Elles sont analysées ensuite par le deuxième processeur qui calcule pour chaque objet, isolé par un seuil, les paramètres de surface et de périmètre ainsi qu'un facteur de forme (rapport périmètre²/surface ou P²/S) et la densité optique intégrée.

Le processeur de traitement conserve ensuite dans une table les adresses des objets dont les valeurs des paramètres sont ceux d'une cellule isolée. Les amas de cellules ont en effet, soit une surface et un facteur de forme élevés dans le cas de cellules se touchant, soit un facteur de forme élevé mais une surface moyenne dans le cas de cellules se chevauchant.

Lorsque le nombre requis de cellules repérées est atteint, le processeur de traitement commande le positionnement et l'acquisition en une ou plusieurs images spectralement différentes des objets dont il a mémorisé la position. Cette phase se fait également en bascule entre les deux processeurs, le premier acquérant les images et le deuxième les traitant.

β) Traitement.

Le schéma global du traitement des images haute résolution est le suivant :

- segmentation de l'image pour classer chaque point dans l'une des classe : fond, noyau, cytoplasme.;
- élimination des points artefactuels : point d'objet ou de fond isolés ;
- paramétrisation des objets sur la base de 2 traitements :
 - . étude de la connexité pour évaluer les paramètres de texture et de couleur : luminance, saturation, teinte moyenne et intégrée, histogrammes, paramètres extraits des matrices de cooccurrence et des matrices de longueurs de sections.;
 - . étude du contour pour évaluer les paramètres de forme : énergie de courbure, nombre de lobes, etc...

Dix huit paramètres sont analysés :

- Les paramètres densitométriques
 - . La densité optique intégrée (D.O.I) : mesure la quantité de DNA nucléaire exprimée en unités arbitraires.
 - . La densité optique moyenne (D.O.M)'.; rapport entre la D.O.I et la surface du noyau : la D.O.M. augmente avec la concentration du DNA nucléaire.

. La variance de la densité optique (D.O.V) : mesure l'hétérogénéité densitométrique du noyau.

- Les paramètres de texture : Ces paramètres mesurent la distribution des niveaux de gris dans l'objet par référence au degré d'hétérogénéité et au caractère de la répartition de la chromatine. Les paramètres sont déduits des matrices de cooccurrence et des longueurs de section selon les méthodes décrites par PRESSMAN (1976) et DURIE et coll. (1978) et adaptées pour le software du SAMBA 200 par CHASSERY (1980) ; la matrice de cooccurrence représente la fréquence des couples de points (séparés d'une distance donnée dans une direction donnée) associant deux niveaux de gris ; les 250 niveaux originaux sont regroupés en 8 ou 16 classes pour établir la matrice de cooccurrence ; la matrice des longueurs de section qui représente le nombre de segments de l'image de longueur donnée et dont tous les points appartiennent à la classe de niveau donné.

. Contraste : mesure le nombre de points de jonction entre les régions nucléaires de valeurs d'extinction différentes, elle augmente avec le nombre d'ilots de chromatine denses et bien séparés.

. Moyenne locale : mesure le degré global de condensation de chromatine puisqu'il est en corrélation avec la DOM.

. Distribution des niveaux de gris : mesure l'uniformité de la distribution de la densité optique.

. Distribution des courtes et longues sections : mesure la fréquence de faibles et fortes condensations de chromatine.

- Les paramètres morphométriques :

- . Surface (S)
- . Périmètre (P)
- . Facteur forme P^2/A
- . Energie de courbure.

γ) Classification.

Le but est de reconnaître automatiquement la cellule au vu des paramètres qui lui sont associés . Deux méthodes de classification statistiques sont utilisées pour la reconnaissance automatique des phases du cycle cellulaire : l'une nécessite un apprentissage préalable du SAMBA 200 (analyse linéaire discriminante) l'autre permet une reconnaissance automatique non supervisée.

- Méthode de reconnaissance non supervisée.

C'est une méthode de reconnaissance d'une variable continue au moyen d'un processus d'interrogation séquentiel selon EMPTOZ et coll. (1978) et TERRENOIRE et TOUNISSOUX (1979). Elle a été adaptée aux problèmes de reconnaissance des phases du cycle cellulaire par MOUSTAFA et BRUGAL (1983).

. Principe.

Etant donné une population X, on considère une application w de X dans [0,1] définissant la variable dite "à expliquer". Pour un individu x de X, w(x) représente la variable de comportement ou privilégiée (dans notre cas, c'est la densité optique). On dispose d'un ensemble de variables explicatives : $Q^1 \dots Q^m$, chacune de ces variables Q^j est supposée ne posséder qu'un nombre fini d'états et ainsi peut-être identifiée à une partition de X:

$$(Q_1^j \dots Q_{\alpha_j}^j)$$

Nous dirons que Q^j est une question d'issues $Q_1^j \dots Q_{\alpha_j}^j$. Pour un individu $x \in X$, on note $Q^j(x)$ l'élément de la partition Q^j auquel appartient x, et on dit que $Q^j(x)$ est la réponse de x à la question Q^j .

A chaque pas la population X est soumise à la question Q^j ; les variances des 2 sous populations sont calculées et la question qui permet d'avoir la somme des variances la plus minimale est retenue. Elle permet donc la bipartition de Q^1 et correspond au caractère le plus discriminant explicatif. Cette méthode est une méthode séquentielle à structure arborescente.

Ces auteurs ont mis au point une nouvelle méthode à structure non arborescente en utilisant les tests de Student et Fischer-Snedecor pour comparer les moyennes des sous-populations classées; ainsi les erreurs sont réparées par des fusions à chaque pas.

- Analyse discriminante et analyse canonique.

Cette analyse que GIROUD (1982) a adaptée aux problèmes de reconnaissance des phases du cycle cellulaire correspond à un programme d'analyse discriminante (programme 7 M) de la bibliothèque du CICG.

. Principe

X cellules choisies (définies selon n paramètres) sont introduites en tête d'analyse pour chacune des k classes à discriminer (c'est à dire pour chacune des phases du cycle cellulaire). Ces "cellules choisies" serviront de base de calcul.

Le but de l'analyse discriminante qui fait suite est de chercher parmi l'ensemble des n paramètres qui caractérise une cellule, ceux qui conduisent à la meilleure discrimination des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.

Le programme opère pas à pas en n étapes successives, il y a autant d'étape qu'il y a de paramètre ; il cherche à chaque étape quel paramètre doit être point aux paramètres les plus discriminants, déjà sélectionnés au cours des précédentes étapes ou bien quel paramètre doit être écarté de l'analyse car "non discriminant", afin de maximiser le pourcentage d'observations bien classées : le paramètre le plus discriminant étant celui qui demeure le plus constant pour les différents éléments d'une même classe.

A chaque étape, le programme calcule autant de fonctions discriminantes qu'il y a de classes: ces fonctions discriminantes sont définies comme des fonctions linéaires de y variables ou paramètres ($1 < y < n$) : à chaque nouvelle étape, ces fonctions discriminantes incluent ou non une nouvelle variable car un nouveau paramètre est pris en considération.

Quand le processus prend fin, k fonctions linéaires de n paramètres au plus (fonctions de vraisemblance) sont définies; à chacune des k classes envisagées est affectée une fonction de vraisemblance ; les k fonctions ainsi définies, différent les unes des autres par les coefficients attribués à chacun des n paramètres. Le programme indiquera quels sont les coefficients des différents paramètres pour chacune des fonctions de vraisemblance.

Lorsque les fonctions de vraisemblance sont ainsi déterminées, on calcule le pourcentage de cellules bien reclassées : les valeurs des n paramètres, de chaque "cellule choisie" introduite en tête d'analyse permettent de calculer la valeur prise par chacune des k fonctions de vraisemblance caractéristique de la classe qui correspond à la fonction de vraisemblance ayant la plus forte valeur.

Enfin, le problème d'identification *a posteriori* d'une nouvelle cellule se résume de la façon suivante :

- On suppose que la nouvelle cellule appartient sûrement à l'une des classes considérées initialement ;

RÉSULTATS

- On calcule les probabilités, *a posteriori*, pour une cellule d'appartenir à l'une des classes et on décide d'affecter la cellule à la classe correspondant à la plus forte probabilité : les probabilités *a posteriori* de classement d'une cellule dans une classe sont des fonctions croissantes des fonctions de vraisemblance.

Selon la présentation faite ci-dessus de l'analyse discriminante mise en oeuvre, chaque classe discriminée au sein de la population considérée est caractérisée par une fonction linéaire définie dans R^n (n étant le nombre de paramètres) ; chaque élément de la population est un point dont les coordonnées le situent dans un espace à n dimensions : cet espace est appelé "l'espace des individus".

. Analyse canonique.

Le but de cette analyse canonique est de définir le plan de "projection" (plan factoriel) sur lequel l'ensemble des points de la population présentera la meilleure dispersion afin de favoriser la lecture du nuage ainsi obtenu. Le plan, défini sur R^2 , présente un repère orthogonal ; sur chacun des axes est portée une variable canonique définie comme une fonction linéaire de n paramètres considérés affectés d'un coefficient particulier.

Au terme d'une analyse canonique faisant intervenir n paramètres, n variables canoniques sont calculées. Alors que le calcul des fonctions de vraisemblance était basé sur la valeur du pouvoir discriminant d'un paramètre donné, le calcul des variables canoniques est basé sur la détermination du paramètre qui exprime le plus la dispersion de la population étudiée.

Lorsque les n variables canoniques sont déterminées, la matrice de covariance correspondante est établie puis diagonalisée : les variables canoniques sont alors décorrelées. La variable canonique alors affectée de la valeur la plus élevée sur la diagonale de la matrice, sera considérée comme "premier axe" définissant le plan factoriel optimal . Le second axe sera choisi perpendiculairement au premier et de façon à ce que la dispersion des cellules de la population soit également maximale. Dans ce nouveau repère orthogonal, chaque élément est donc défini par un simple couple de coordonnées.

La validité de la classification de TERRENOIRE est testée par l'analyse discriminante, les erreurs sont analysées au moyen d'une matrice de confusion.

CHAPITRE I

ÉVOLUTION DE LA SYNTHÈSE DE DNA ET DE L'INDICE
MITOTIQUE APRÈS DÉNERVATIONI - EVOLUTION DE LA SYNTHÈSE DE DNA APRES DENERVATION.A - RESULTATS.

L'évolution de la synthèse du DNA après dénervation a été appréciée par l'incorporation de thymidine ^3H ; l'étude a été réalisée *in vivo* et *in vitro*.

1) In vivo.

Deux séries expérimentales ont été effectuées : dans la première, la synthèse de DNA est étudiée dans le blastème entier et la radioactivité est ramenée aux protéines du blastème mesurées par la méthode de LOWRY modifiée ; dans la deuxième, la synthèse de DNA est étudiée dans l'épiderme et le mésoderme séparément et la radioactivité est ramenée à la quantité de DNA mesurée par la méthode de CLIFFORD.

a) Synthèse de DNA dans les blastèmes entiers.

Les résultats sont consignés dans le tableau 1 sur la figure 6.

T	D.	Te.	D/Te.
24 h.	* (8) 252 ± 24	* (7) 337 ± 41	0,74
48 h.	(6) 208 ± 41	—	0,61
72 h.	(7) 150 ± 31	—	0,46
96 h.	* (4) 112 ± 35	* (2) 219 ± 6	0,33
168 h.	* (8) 102 ± 16	* (6) 177 ± 18	0,30

Tableau 1 : Incorporation de thymidine tritiée en cpm/ μg des protéines dans des blastèmes de pattes dénervées (D) et témoins (Te) en fonction

du temps de post-dénervation (T). Le rapport (D/Te) a été calculé à partir du témoin 24 h. Les astérisques indiquent que la différence entre les blastèmes dénervés et témoins est significative avec un risque inférieur ou égal à 5 % ; entre parenthèses le nombre de blastèmes utilisés.

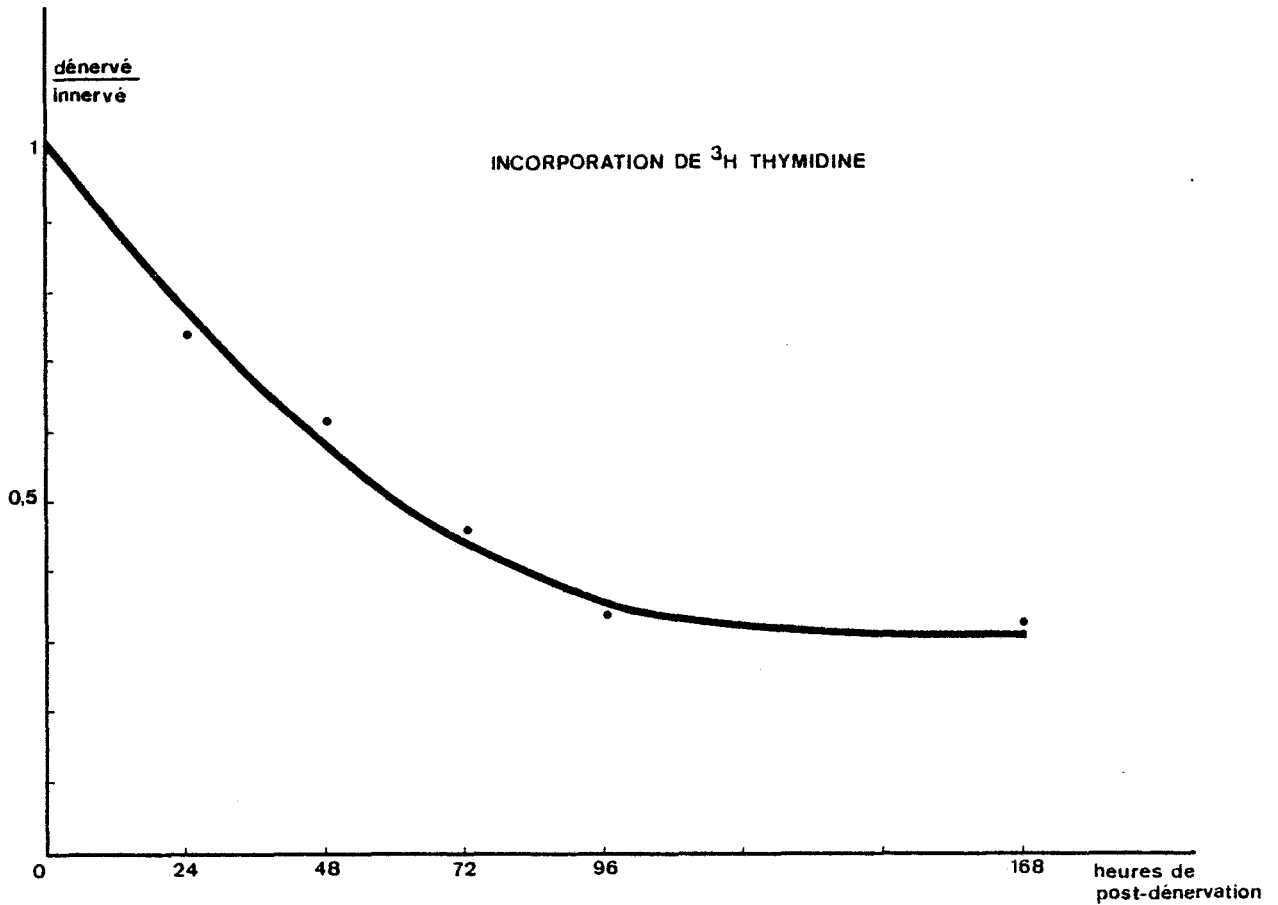


Figure 6 : Rapport des incorporations de thymidine ³H des blastèmes dénervés (D) et témoins (Te) en fonction du temps de post dénervation .

Ces résultats montrent que la synthèse de DNA diminue à mesure que le temps de dénervation s'accroît pour atteindre 30 % de la valeur des blastèmes innervés après 4 jours de dénervation, valeur qui se maintient jusqu'à 168 h.



b) Synthèse de DNA dans l'épiderme et le mésoderme du blastème.

Les résultats sont consignés dans le tableau 2 et sur la figure 7.

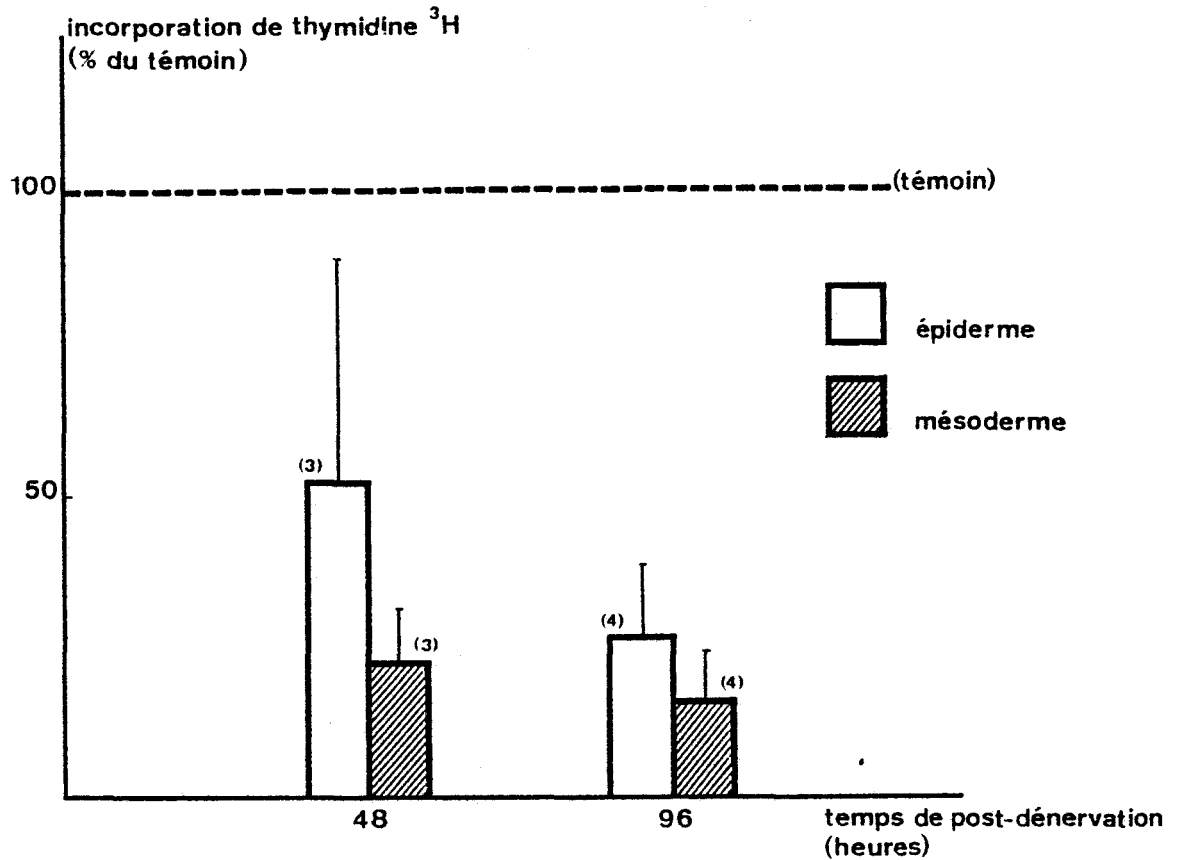


Figure 7 : Influence de la durée de dénervation sur les synthèses de DNA du mésoderme et de l'épiderme ; les rectangles indiquent la moyenne et les traits verticaux 1/2 écart-type.

T	Epiderme (D/Te)	Mésoderme (D/Te)
48 h.	×(3) 52,40 ± 36,75	×(3) 21,80 ± 9,02
96 h.	×(4) 25,72 ± 12,59	×(4) 14,75 ± 8,67



Tableau 2 : Pourcentage des incorporations de thymidine ³H des blastèmes dénervés (D) et témoins (Te) en fonction du temps de post-dénervation (T).

Comme dans les blastèmes entiers, la synthèse de DNA de l'épiderme et du mésoderme chute après dénervation et ce, d'autant plus que le temps de dénervation est plus long. D'autre part, on constate que la diminution de synthèse de DNA est pour un même temps de dénervation plus importante dans le mésoderme que dans l'épiderme.

Nous avons vérifié ces résultats par l'étude autoradiographique de blastèmes de Pleurodèle ayant reçu une dose intrapéritonéale de thymidine ^3H pendant 1 heure avant la fixation (marquage bref) et ce pour des blastèmes dénervés depuis 96 h. Le pourcentage de cellules marquées (indice de marquage) a été mesuré à la fois pour l'épiderme et le mésoderme de la partie distale du blastème (soit sur une longueur de 200 μm) (fig. 8 et Pl. II, fig. a, b, c et d)

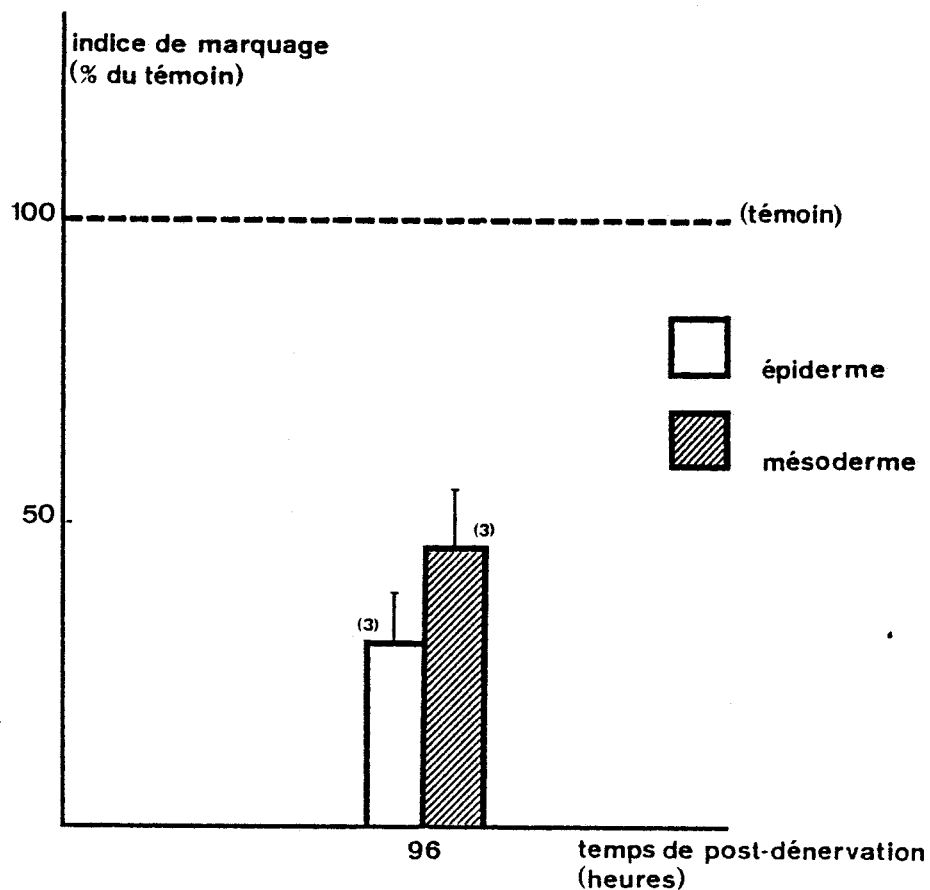


Figure 8 : Influence de la dénervation sur les indices de marquage de l'épiderme ($30 \pm 9 \%$) et du mésoderme ($46 \pm 10 \%$). Pour chacun de ces deux tissus, la différence avec le témoin est significative avec un risque inférieur ou égal à 5 %.

Ces résultats montrent que les indices de marquage de l'épiderme et du mésoderme sont significativement affectés par la dénervation. Les diminutions sont respectivement pour l'épiderme et le mésoderme de 70 % et 54 %.

2) In vitro.

Comme *in vivo*, la mesure de la synthèse de DNA a été effectuée sur le blastème complet puis sur les deux tissus composant celui-ci.

a) Synthèse du DNA dans les blastèmes entiers.

Elle a été réalisée par LASSALLE (1983). Deux lots de blastèmes ont été mis en culture seuls ou en présence de ganglions spinaux sur le milieu de Leibowitz L 15 pendant 48 h., la thymidine ^3H est ensuite ajoutée aux deux lots pendant 24 h. et la radioactivité est ramenée à la quantité de protéines des blastèmes (Fig. 9).

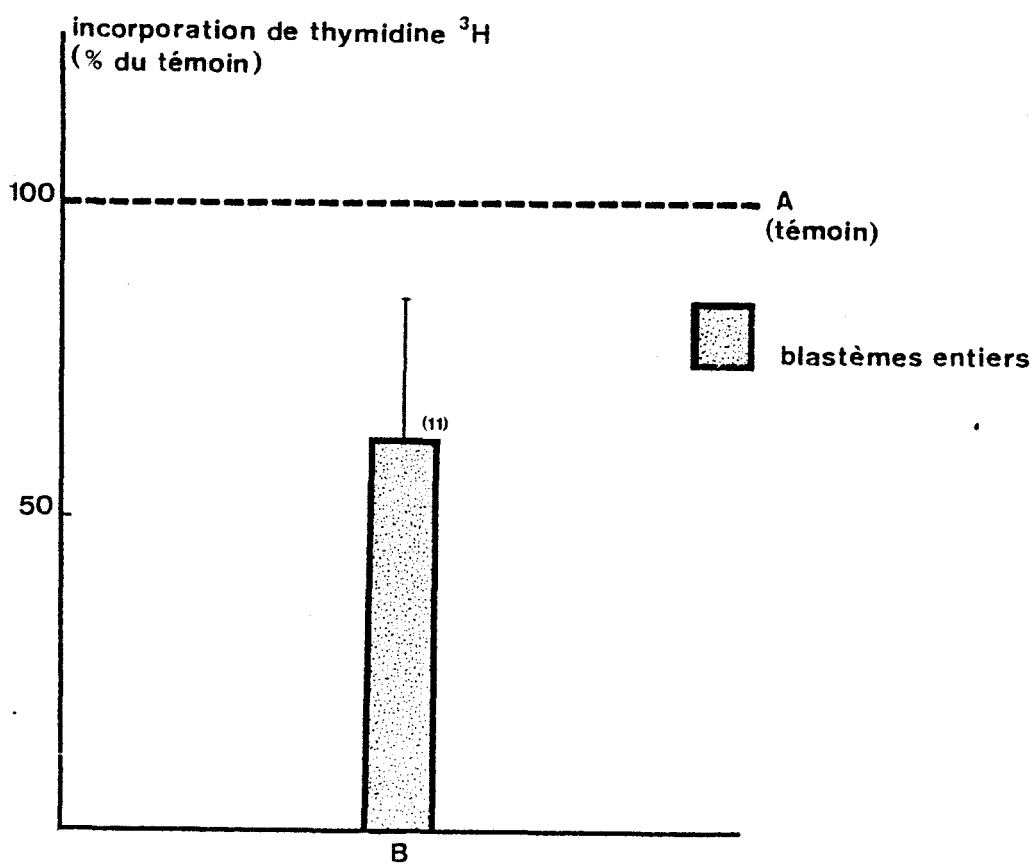


Figure 9 : Incorporation de la thymidine ^3H des blastèmes explantés et cultivés pendant 3 jours; A : en présence d'un ganglion nerveux ; B : en l'absence d'un ganglion nerveux. (D'après LASSALLE, 1983).

Les résultats obtenus montrent que les capacités de synthèse du DNA des blastèmes cultivés en l'absence de tissu nerveux, correspondent à 62 % de celles mesurées sur les blastèmes cultivés en présence de ganglions nerveux.

b) Synthèse des DNA dans l'épiderme et le mésoderme du blastème.

Deux lots de blastèmes ont été utilisés et la thymidine ^3H est ajoutée après 48 h. et 72 h. de culture, l'épiderme et le mésoderme sont séparés avant la mesure de la radioactivité qui est ramenée à la quantité de DNA des blastèmes (Fig. 10 et tableau 3).

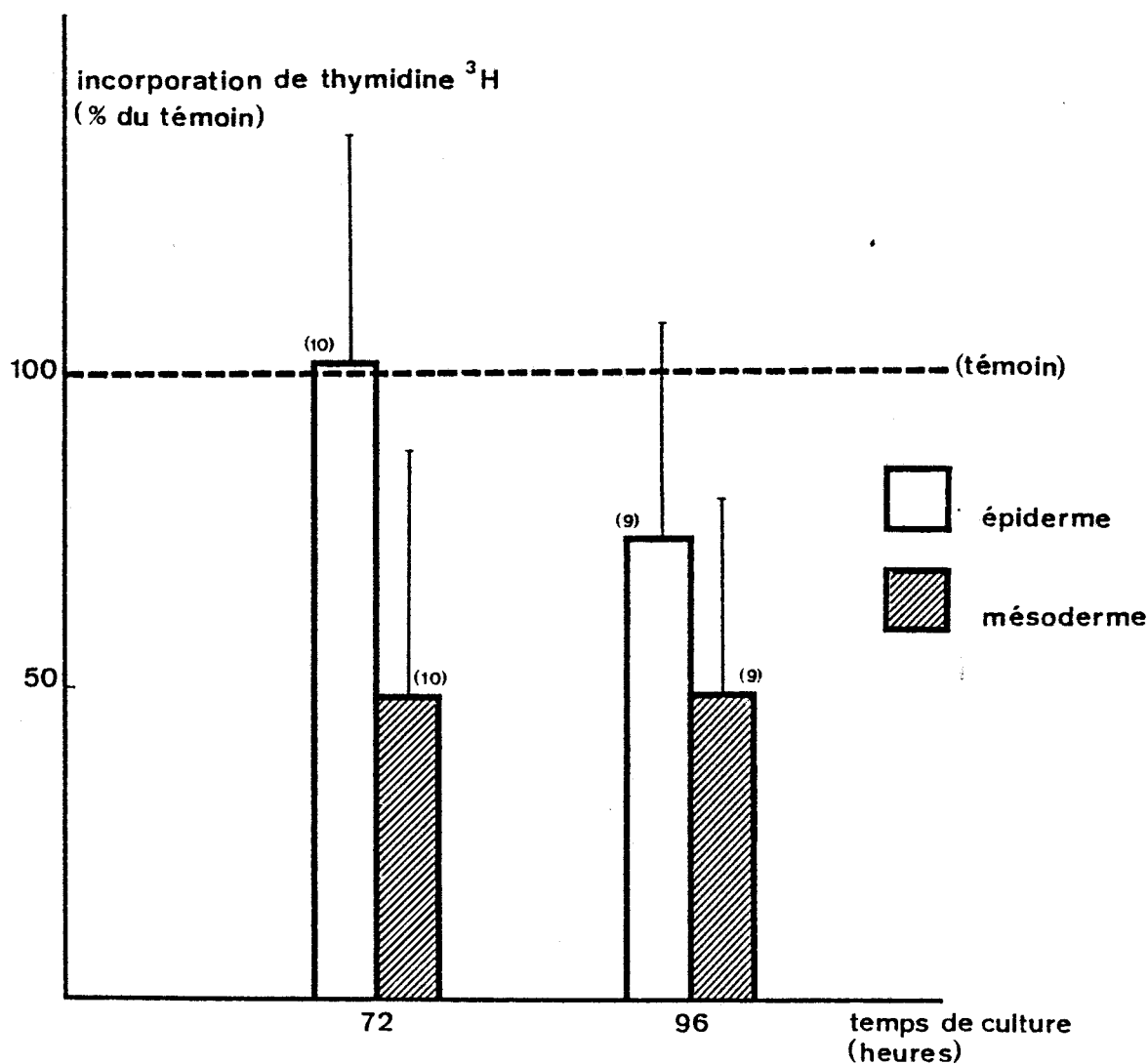


Figure 10 : Incorporation de la thymidine ^3H dans les deux tissus formant le blastème après 3 et 4 jours de culture.

T.	Epiderme (% du témoin)	Mésoderme (% du témoin)
72 h.	(10) 102,45 ± 35,73	* (10) 47,38 ± 40,85
96 h.	* (9) 74,80 ± 33,58	* (9) 48,20 ± 32,42

Tableau 3 : Pourcentage des incorporations de thymidine ^3H par rapport au témoin (blastème avec ganglion nerveux) en fonction du temps de culture (T).

Ces résultats montrent que la synthèse du DNA dans l'épiderme est significativement affectée par la culture en l'absence de ganglions nerveux seulement après quatre jours de culture; par contre le mésoderme subit une diminution de synthèse de DNA d'environ 50 % dans les deux temps de culture étudiés.

B - DISCUSSION.

L'incorporation de la thymidine ^3H traduisant essentiellement une synthèse de DNA (JABAILLY et SINGER, 1977), nos résultats ont montré des changements significatifs dans la synthèse de DNA après dénervation *in vivo*, changements qui se traduisent par une chute rapide de ces synthèses durant les 2 premiers jours suivant la dénervation, plus lente pour les 2 jours qui suivent; au bout du quatrième jour le niveau de synthèse atteint un plateau qui se maintient au moins jusqu'au septième jour de post-dénervation.

Ces résultats sont globalement en accord avec ceux obtenus précédemment par d'autres auteurs (DRESDEN, 1969.; SINGER et CASTON, 1972) sur une autre espèce de triton *Triturus viridescens* (Tableau 4); il convient de noter que cette diminution des capacités de synthèse de DNA des blastèmes dénervés traduit une chute générale de l'activité métabolique des blastèmes après dénervation puisque les synthèses de RNA et de protéines sont affectées dans des

proportions similaires (DRESDEN, 1969 ; SINGER et CASTON, 1972).

Auteurs et année	Matériel	Stade et température	Durée de dénervation	Synthèse de DNA
				D/Te.
DRESDEN (1969)	<i>Diemictylus viridescens</i>	palette 23 ± 1°C	- 21 h.	0,66
			- 52 h.	0,34
			- 100 h.	0,24
SINGER et CASTON (1972)	<i>Triturus viridescens</i>	cône 25°	- 24 h.	0,72
			- 51 h.	0,53

Tableau 4 : Résumé des travaux relatifs à la mesure de la synthèse de DNA des blastèmes dénervés (D) et innervés (Te).

Lorsque des mesures de synthèse de DNA sont effectuées non plus sur le régénérat complet mais sur les deux tissus qui le constituent, on constate que le mésoderme est préférentiellement affecté par la dénervation. En effet, les capacités de synthèse de celui-ci sont réduites au quart de leur valeur initiale alors que celles de l'épiderme ne le sont que de moitié pour une dénervation de 48 h. et à une valeur légèrement supérieure pour une dénervation de 96 h. Les valeurs que nous avons obtenues chez le Pleurodèle sont d'ailleurs similaires à celles avancées par GERAUDIE et SINGER (1978) dans un travail semblable effectué sur une autre espèce. Ces auteurs ont constaté, en effet, que des blastèmes de *Notophthalmus viridescens* dénervés au stade cône présentent après 48 heures de dénervation une synthèse de DNA plus importante dans l'épiderme (57 % du témoin) que dans le mésoderme (28 % du témoin) ; toutefois, GERAUDIE et SINGER n'ont pas mesuré la synthèse de DNA au delà de 48 h. de dénervation.

Cependant, les résultats que nous avons obtenus par la mesure de l'indice de marquage, s'ils confirment que les deux tissus du blastème épiderme et mésoderme sont affectés par la dénervation, apparaissent en contradiction avec les observations concernant la moins grande sensibilité de l'épiderme à la dénervation. En effet, on constate que la diminution de cet indice consécutive à la dénervation est plus importante pour l'épiderme (70 % pour 4 jours de dénervation) que pour le mésoderme (54 %) tissu pour lequel d'ailleurs d'autres auteurs (tableau 5) ont obtenu des résultats similaires aux nôtres.

Auteurs et année	Matériel	Stade	Durée de dénervation	Indice de marquage	
				D	Te.
TASSAVA et coll. (1974)	<i>Ambystoma mexicanum</i>	Dédifféren- tion	7 jours	10 %	20 %
MESHER et TASSAVA (1975)	<i>Notophthalmus viridescens</i>	Dédifféren- tion	14 jours	18,25%	33,83%
MADEN (1978)	<i>Ambystoma mexicanum</i>	Dédifféren- tion	4 jours 6 jours	30 % 15 %	42 % 60 %
TASSAVA et Mc CULLOUGH (1978)	<i>Ambystoma mexicanum</i>	Cône précoce	0 jour 8 jours	* 80 % * 30 %	* 80 % * 60 %

Tableau 5 : Résumé des travaux relatifs à la mesure de l'indice de marquage des cellules mésodermiques de blastèmes dénervés (D) et innervés (Te). Astérisques : valeur estimée d'après une représentation graphique.

Sans doute faut-il tenir compte de la façon dont la synthèse de DNA est appréciée pour interpréter ces résultats ; en effet, la mesure de l'incorporation de thymidine ^3H est réalisée dans un cas par scintigraphie à partir de blastèmes mis en présence des précurseurs pendant 8 h. alors que dans l'autre cas, elle est effectuée par autoradiographie par mesure des indices de marquage après un temps d'incubation bref (1 h.). Dans ces conditions on doit considérer que la faiblesse de l'indice de marquage de l'épiderme comparativement au mésoderme (Tableau 6) résulte de caractéristiques particulières du cycle cellulaire des cellules épidermiques compte-tenu du fait que ces cellules sont sous le contrôle de facteurs hormonaux liés à la mue. En effet, à la prolifération normale de l'épiderme en relation avec la régénération se superpose l'activité cyclique de ces cellules en relation avec des décharges périodiques de thyroxine qui déterminent un certain synchronisme dans ce tissu (comparativement à l'asynchronisme des cellules mésodermiques). Cette situation se traduirait donc par une augmentation relative de la durée de leur cycle et expliquerait donc le faible indice de marquage de ces cellules. En conséquence, la méthode du marquage bref n'apparaît pas fiable pour comparer deux tissus aussi différents ; nous nous abstiendrons donc d'utiliser les résultats de cette méthode dans la discussion de ce chapitre.

T	Epiderme		Mésoderme	
	D	Te.	D	Te.
96 h.	(3) $3,97 \pm 1,17$	(3) $13,17 \pm 2,04$	(3) $22,53 \pm 4,83$	(3) $48,83 \pm 7,37$

Tableau 6 : Indices de marquages des cellules épidermiques et mésodermiques de blastèmes dénervés (D) et innervés (Te) après 96 h. de post déner-
vation.

In vitro, l'absence du tissu nerveux associé au blastème empêche les explants d'atteindre le niveau de synthèse en DNA des blastèmes associés à un ganglion spinal (D/Te = 62 %). Cette différence de niveau métabolique est due essentiellement à la diminution des capacités de synthèse du mésoderme, puisque dans nos conditions expérimentales, l'épiderme n'est significativement affecté par l'absence de tissu nerveux qu'après 4 jours de culture.

Des résultats comparables ont été obtenus par VETHAMANY-GLOBUS et coll. (1978) chez *Notophthalmus viridescens*. Ces auteurs ont, en effet, observé une diminution de la synthèse de DNA de 27 % pour l'ensemble du blastème après 36 h. de culture dans un milieu contenant quatre fois plus d'insuline que le nôtre ; toutefois, ces auteurs n'ont pas recherché quelle était la part de chacun des tissus du blastème dans cette diminution de synthèse.

L'incorporation de thymidine ³H reflète essentiellement les synthèses de DNA qui précèdent la division cellulaire. La mesure de cette incorporation peut constituer un moyen d'évaluation de la prolifération cellulaire, dans la mesure où les cellules ayant synthétisé leur DNA poursuivent leur cycle et entrent en mitose. Il convenait donc pour préciser les effets de la dénervation sur les tissus du blastème de mesurer l'indice mitotique du mésoderme et de l'épiderme en présence et en l'absence de tissu nerveux.

II - EVOLUTION DE L'INDICE MITOTIQUE APRES DENERVATION.

A - RESULTATS.

L'effet de la dénervation sur l'indice mitotique a été étudié *in vivo* et *in vitro*.

1) In vivo.

L'étude a porté sur les deux tissus constituant le blastème (Planche II, figures e et f), le mésoderme a été étudiée après 24 h., 48 h., 72 h., 96 h. et 168 h. de temps de post-dénervation et l'épiderme après 96 h. de dénervation. Les résultats sont consignés dans les tableaux 7 et 8 et sur la figure 11.

T	D.	Te.	D/Te.
24 h.	(3) 1,05 ± 0,13	(3) 1,85 ± 0,43	* 0,57
48 h.	(3) 0,74 ± 0,12	(3) 1,19 ± 0,63	* 0,62
72 h.	(3) 0,47 ± 0,13	(3) 1,68 ± 0,12	* 0,28
96 h.	(3) 0,29 ± 0,09	(3) 1,06 ± 0,61	* 0,27
168 h.	(3) 0,28 ± 0,23	(3) 1,05 ± 0,46	* 0,27

Tableau 7 : Evolution de l'indice mitotique exprimé en (%) dans le mésoderme des blastèmes de pattes dénervées (D) et témoins (Te) en fonction du temps de post-dénervation (T). Les astérisques indiquent que la différence entre les blastèmes dénervés et témoins est significative avec un risque $\leq 5\%$ (test de t). Entre parenthèses le nombre de blastèmes utilisés.

T	D.	Te.	D/Te.
96 h.	(3) 0,37 ± 0,04	(3) 0,96 ± 0,24	* 0,39

Tableau 8 : Indice mitotique exprimé en (%) dans l'épiderme des blastèmes de pattes dénervées (D) et témoins (Te) en fonction du temps de post-dénervation (T).



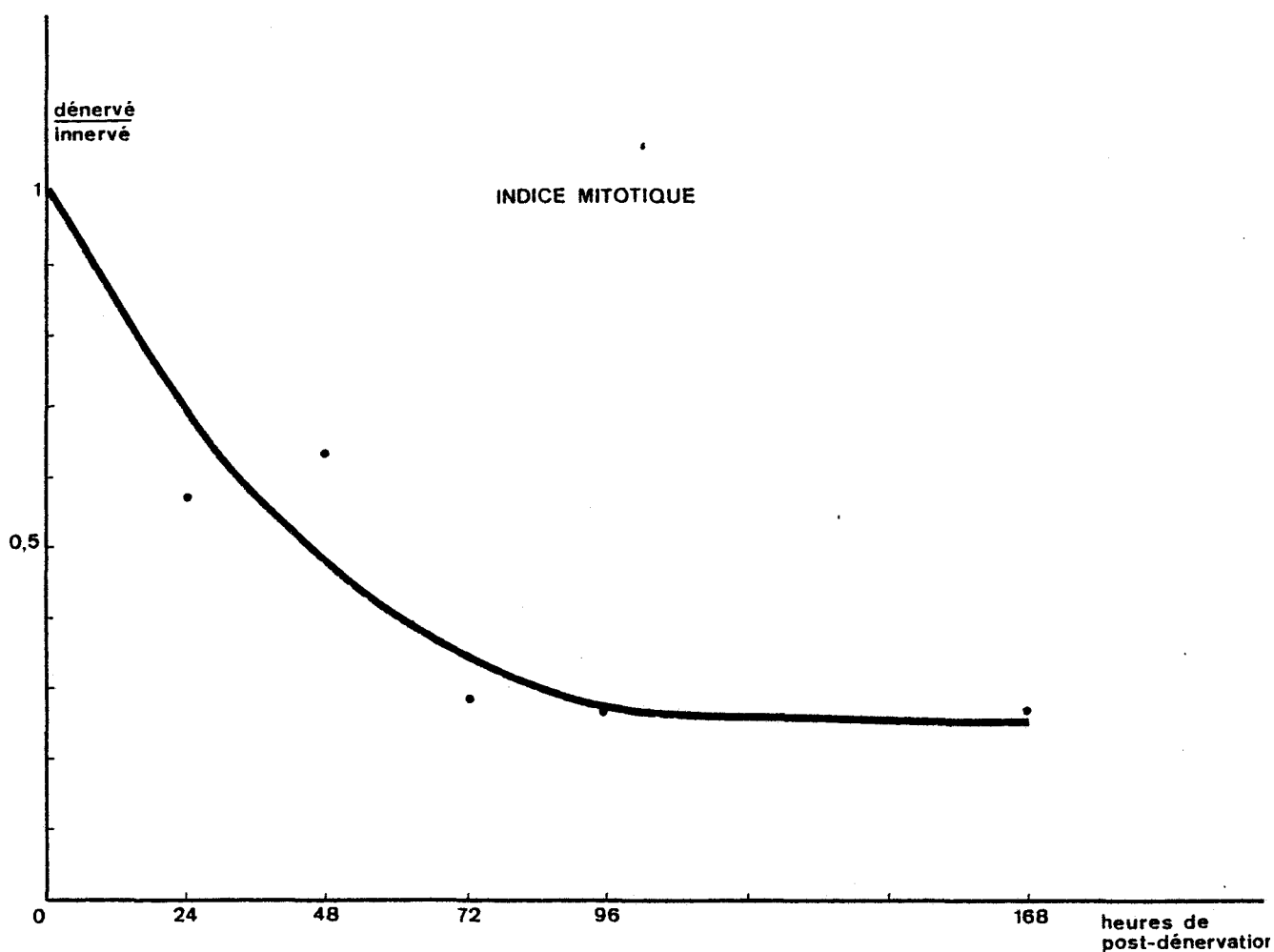


Figure 11 : Evolution du rapport des indices mitotique des cellules mésodermiques des blastèmes de pattes dénervées (D) et témoins (Te) en fonction du temps de post-dénervation.

Les résultats montrent que l'indice mitotique diminue de la même façon que la synthèse de DNA après dénervation ; cet indice diminue jusqu'à 3 à 4 jours de post-dénervation où il se situe à 30 % de la valeur du témoin ; à la même époque l'indice mitotique de l'épiderme du blastème dénervé se situe à 40 % de la valeur du témoin.

2) *In vitro*.

L'étude de l'influence du système nerveux sur la prolifération des cellules mésodermiques de blastèmes cultivés a été abordée après 4 jours de culture. Ce travail réalisé par LASSALLE (1983) comporte deux séries

expérimentales. Dans la première, les blastèmes sont cultivés en association avec des ganglions nerveux (Pl. II, fig. g) ; dans la deuxième série, les blastèmes sont cultivés seuls (Pl. II, fig. h). Les résultats sont consignés sur la figure 12.

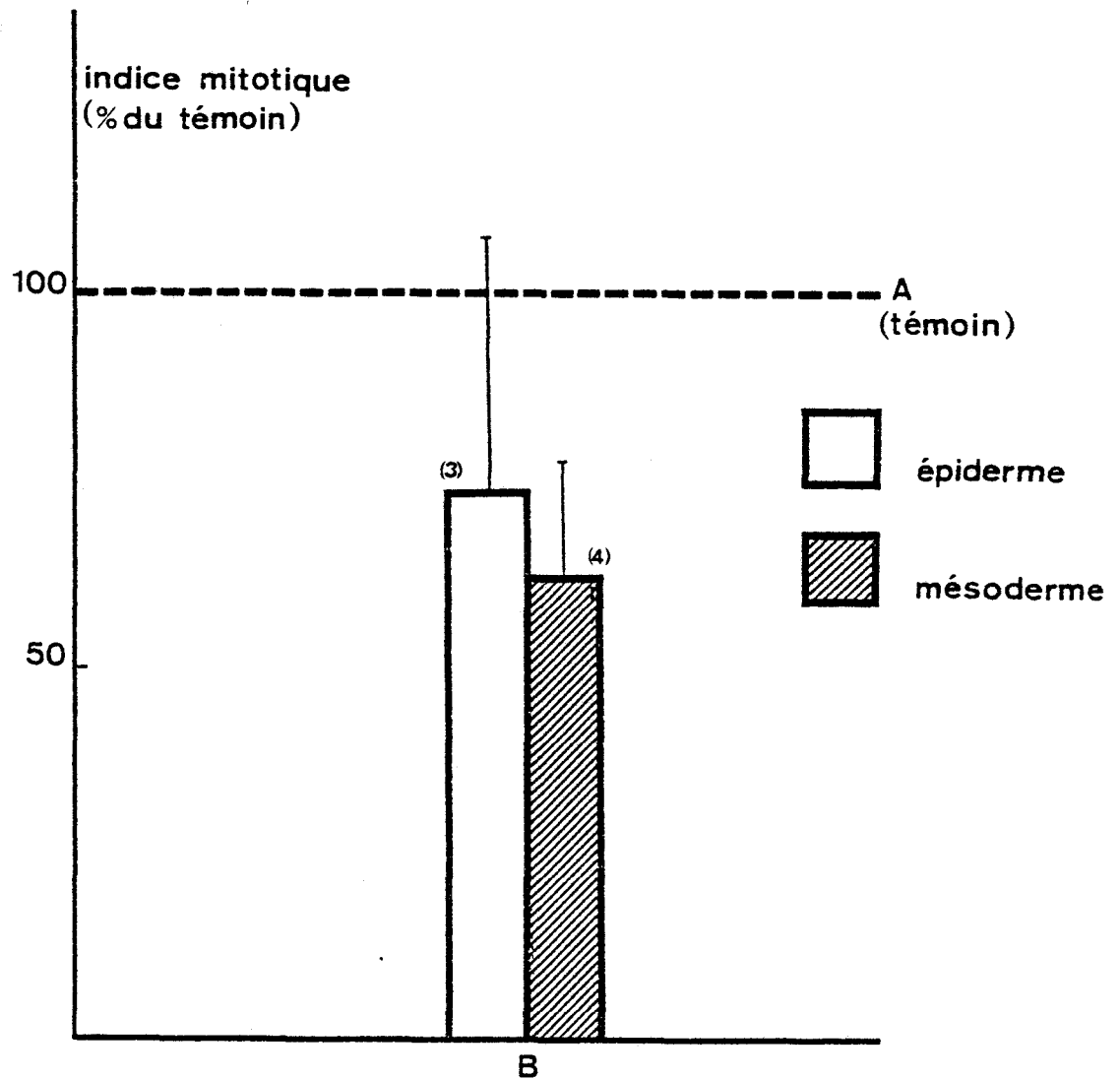


Figure 12 : Pourcentage des indices mitotiques de l'épiderme et du mésoderme des blastèmes cultivés en présence de ganglions nerveux (Témoin : A) et en l'absence de ganglions nerveux (B) après 4 jours de culture.

Les résultats obtenus montrent que seul l'indice mitotique du mésoderme diminue significativement dans les blastèmes cultivés en l'absence de ganglions nerveux par rapport aux blastèmes cultivés en présence de ganglions nerveux ; la diminution est de l'ordre de 40 %.

B - DISCUSSION.

In vivo, l'indice mitotique des cellules de régénération mésodermiques évolue après dénervation selon un schéma pratiquement identique à celui de la synthèse de DNA mesurée par incorporation de la thymidine ^3H ; pour ces deux paramètres, on observe, en effet, une diminution d'environ 70 % après 96 h. de dénervation, puis un plateau jusqu'à 168 h. Cependant, l'épiderme semble moins affecté que les cellules mésodermiques puisque la diminution de l'indice mitotique n'est que de 60 % après 96 heures de dénervation.

Auteurs et année	Matériel	Stade	Durée de dénervation	Indice mitotique	
				D	Te
TASSAVA et coll. (1974)	<i>Ambystoma mexicanum</i>	Dédifferen- ciation	- 7 jours	0 %	1 %
MESHER et TASSAVA (1975)	<i>Notophthalmus viridescens</i>	Dédifferen- ciation	- 14 jours	0 %	0,37 %
MADEN (1978)	<i>Ambystoma mexicanum</i>	Dédifferen- ciation	- 4 jours - 6 jours	* 3 % * 2,6 %	* 12 % * 12 %
TASSAVA et Mc CULLOUGH (1978)	<i>Ambystoma mexicanum</i>	Cône précoce	- 0 jours - 8 jours	* 2 % * 0 %	* 2 % * 4 %

Tableau 9 : Résumé des travaux relatifs à la mesure de l'indice mitotique des cellules mésodermiques de blastèmes dénervés (D) et innervés (Te).
Astérisques : valeur estimée d'après une représentation graphique.

Nos résultats confirment et complètent ceux obtenus par d'autres auteurs (tableau 9) qui avaient constaté une diminution significative de l'indice mitotique des cellules mésodermiques après dénervation.

In vitro, nous avons observé une diminution parallèle de l'indice mitotique des cellules mésodermiques des blastèmes non-ganglionnés et de leur synthèse de DNA, cette diminution se situerait à environ 40 % après 96 heures de culture. Par contre, l'épiderme n'apparaît pas affecté par l'absence de ganglion en ce qui concerne l'indice mitotique et ce, bien que la synthèse de DNA diminue de façon significative de 30 % dans les mêmes conditions.

GLOBUS et VETHAMANY-GLOBUS (1977) ont observé une chute de 70 % de cet indice après 96 h. de culture dans un milieu contenant 0,144 unité d'insuline par ml ; toutefois ces auteurs n'ont pas précisé l'évolution de l'indice mitotique de l'épiderme dans ces conditions.

Ainsi, la chute de la synthèse de DNA après dénervation mesurée par l'incorporation de la thymidine ^3H se traduit bien par une chute de l'indice mitotique.

III - DISCUSSION GENERALE

L'ensemble des résultats obtenus montrent que l'absence de tissu nerveux provoque tant *in vivo* qu'*in vitro*, une diminution significative de la prolifération cellulaire des blastèmes que celle-ci soit évaluée par les modifications des capacités de synthèse de DNA que par l'évolution de l'indice mitotique au cours du temps de post-dénervation. Cependant, l'étude détaillée du comportement de chacun des deux composants cellulaires du blastème a permis de constater que la dénervation retentit préférentiellement sur les éléments mésodermiques de celui-ci, l'épiderme étant moins affecté par la dénervation.

Le mésoderme apparaît, en effet, très sensible à la dénervation puisque celle-ci provoque une diminution de la synthèse de DNA et de l'indice mitotique de l'ordre de 70 % *in vivo* après 4 jours de dénervation alors qu'elle n'atteint que 60 % pour l'épiderme dans les mêmes conditions. On observe d'ailleurs le même phénomène *in vitro* bien que la diminution soit moins importante

en raison vraisemblablement de la présence de facteurs de croissance (insuline) dans le milieu. La diminution de synthèse de DNA et d'indice mitotique atteint, en effet, 50 % environ pour le mésoderme alors que la diminution de synthèse de DNA de l'épiderme n'atteint que 30 % et seulement après 4 jours de culture, l'indice mitotique de ce tissu n'étant pas affecté par la dénervation en raison vraisemblablement de la faible diminution du taux de synthèse de DNA.

Le comportement des cellules mésodermiques et de l'épiderme des blastèmes dénervés (diminution parallèle de la synthèse de DNA et de l'indice mitotique) doit être interprété en terme de cinétique cellulaire. La chute de la prolifération cellulaire après dénervation peut résulter, en effet, soit d'un ralentissement du cycle cellulaire (c'est à dire un allongement d'une ou de plusieurs de ses phases) soit d'un arrêt du cycle. Le ralentissement ou le blocage des cellules dans une phase du cycle devraient conduire à une accumulation de celles-ci dans la phase ralentie ou bloquée ; afin de vérifier ce point, nous avons entrepris une étude cytophotométrique de la teneur en DNA des cellules de blastème dénervé, technique qui permet d'évaluer la proportion de cellules dont la teneur en DNA correspond à des cellules ayant synthétisé ou non cette molécule.

CHAPITRE II

INFLUENCE DE LA DÉNERVATION SUR L'ÉVOLUTION DES CELLULES DE RÉGÉNÉRATION DANS LE CYCLE CELLULAIRE. RÉSULTATS CYTOPHOTOMÉTRIQUES.

Les résultats du chapitre précédent montrent clairement que la dénervation provoque une diminution significative de la prolifération cellulaire des blastèmes de régénération. Afin de vérifier si ce comportement particulier des cellules après dénervation correspond à un ralentissement ou à un blocage de celles-ci dans une phase du cycle, nous avons, dans un premier temps évalué la proportion de cellules dans les phases correspondant à une teneur en DNA de 4C d'une part et de 2C d'autre part par cytophotométrie. Dans cette approche, nous avons limité notre étude aux cellules mésodermiques de blastèmes dénervés évoluant *in vivo* en raison de la plus grande sensibilité de ces cellules à la dénervation aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.

I - RESULTATS.

Les mesures, conduites sur cellules squashées, colorées par le Feulgen et analysées au cytophotomètre Leitz MPV₁ ont été effectuées à partir de blastèmes ayant évolué en l'absence de nerfs pendant 24 h., 48 h., 72 h., 96 h. et 168 h. et des blastèmes innervés correspondants.

Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes de fréquence (fig. 13, 14, 15, 16, 17). Sur ces derniers, nous avons estimé la valeur moyenne (2C) de la quantité de DNA des cellules mésodermiques au repos, puis calculé les valeurs correspondant à une synthèse partielle de DNA (3C) et une synthèse complète (4C).

Pour chaque temps de dénervation, nous avons présenté quatre histogrammes, deux pour les blastèmes témoins et deux autres correspondant aux deux blastèmes dénervés.

Comme il est difficile de déterminer avec précision le début de la synthèse de DNA, nous avons considéré que les cellules sont en synthèse à partir du moment où leur contenu en DNA est au moins égal à 3C.

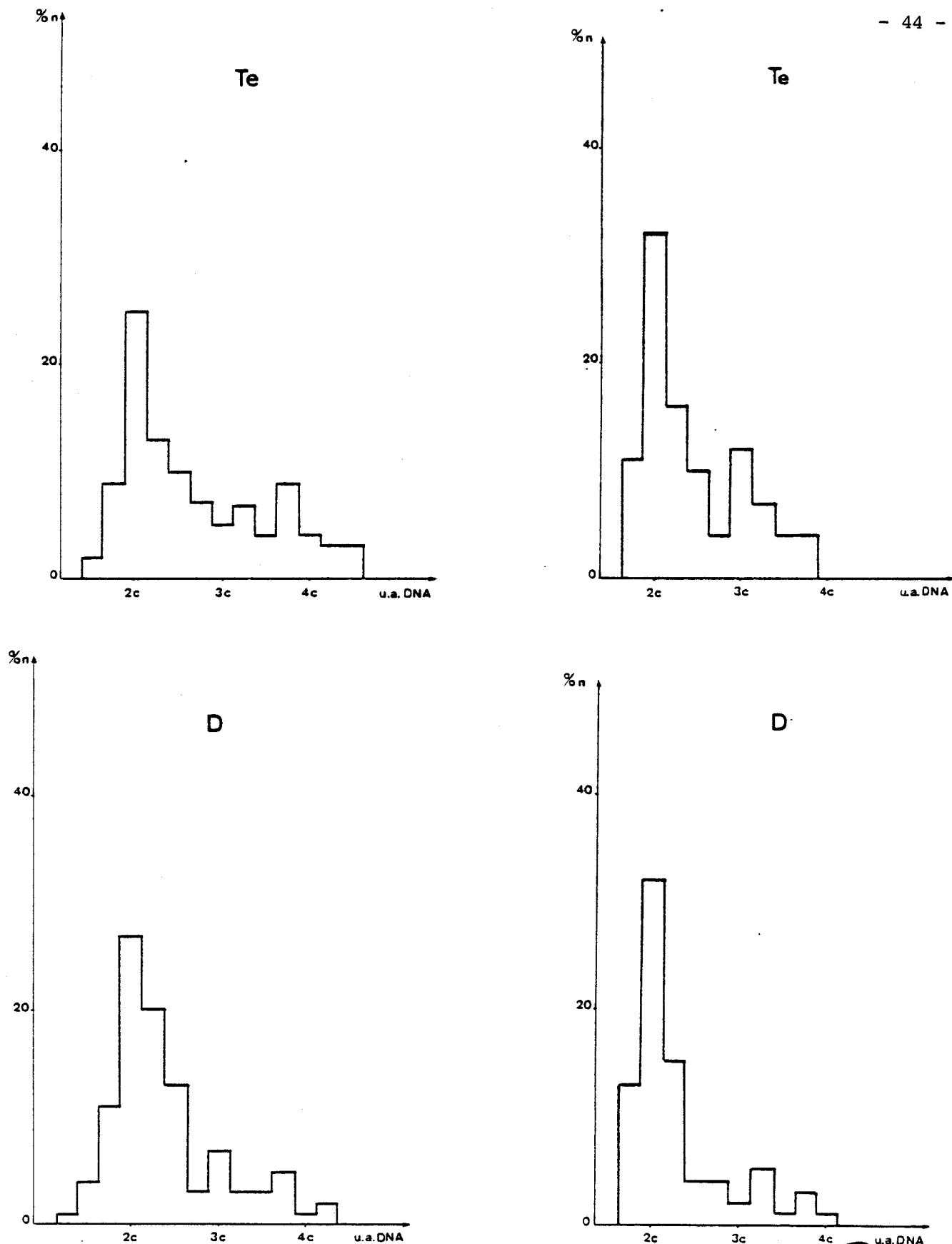


Figure 13 : Teneur en DNA nucléaire des cellules mésodermiques de blastèmes témoins (Te) et dénervés (D) après 24 h. de dénervation. En ordonnée pourcentage de noyaux, en abscisse teneur en DNA exprimée en unités arbitraires.

BUS
LILLE

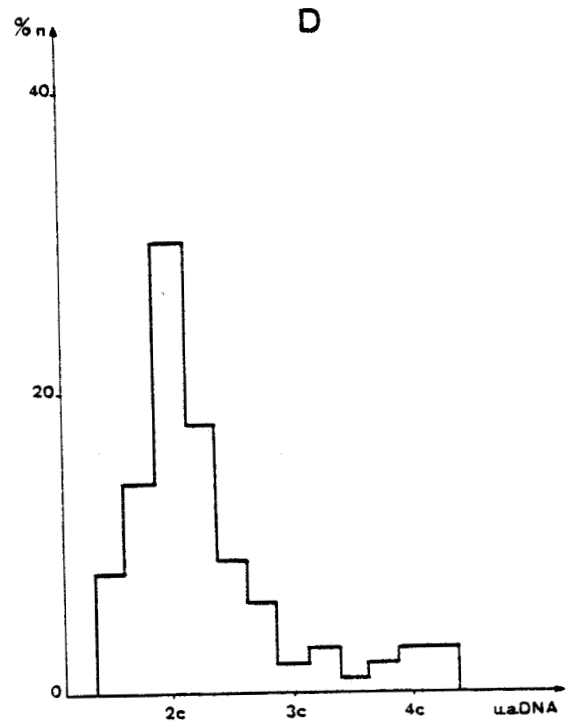
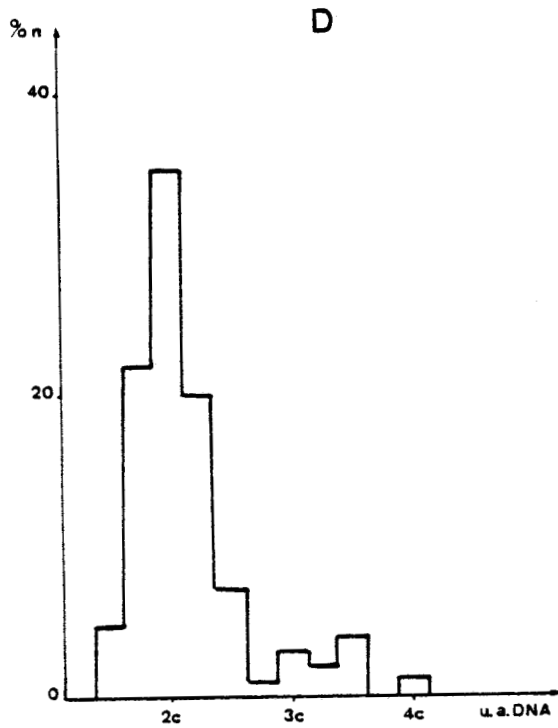
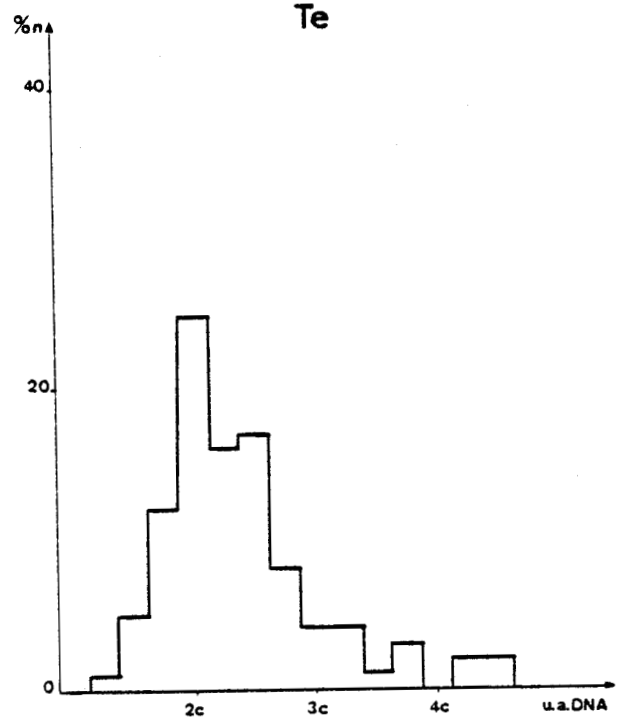
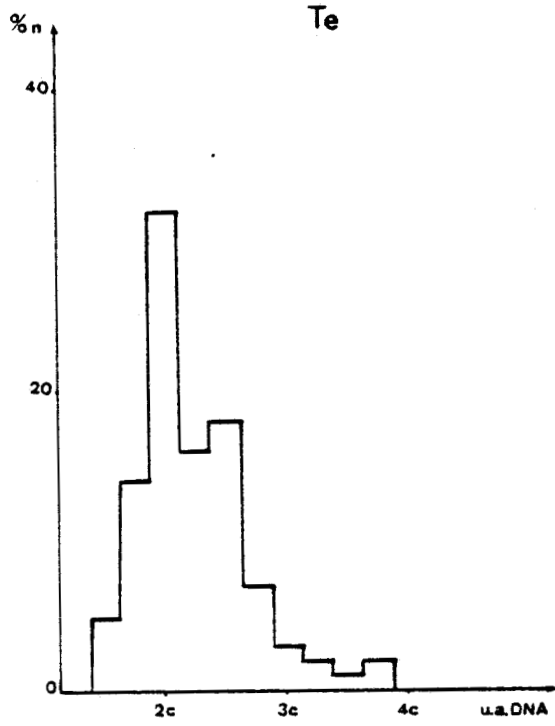


Figure 14 : Teneur en DNA nucléaire des cellules mésodermiques de blastèmes témoins (Te) et dénervés (D) après 48 h. de dénervation. En ordonnée pourcentage de noyaux, en abscisse teneur en DNA exprimée en unités arbitraires.

MS
1111

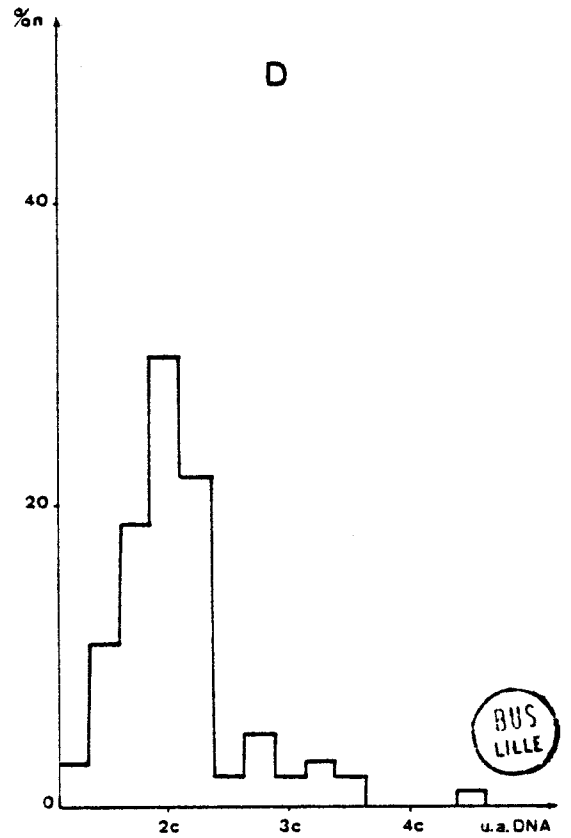
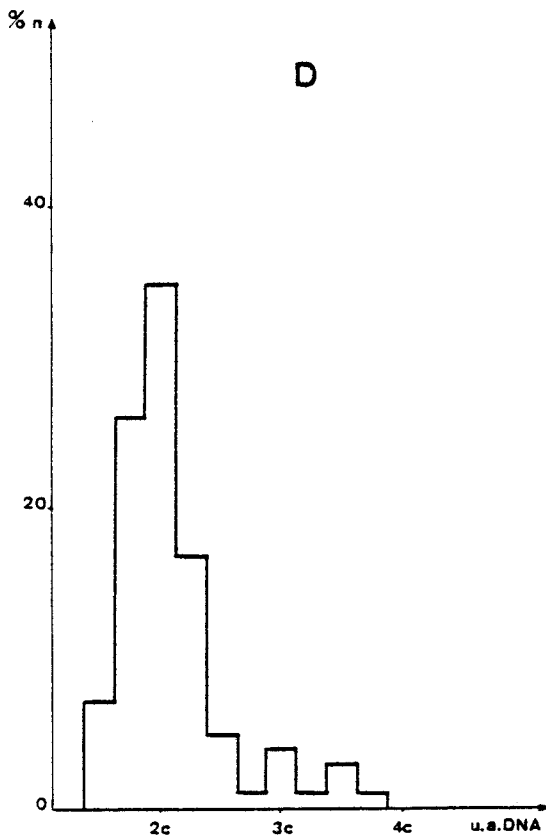
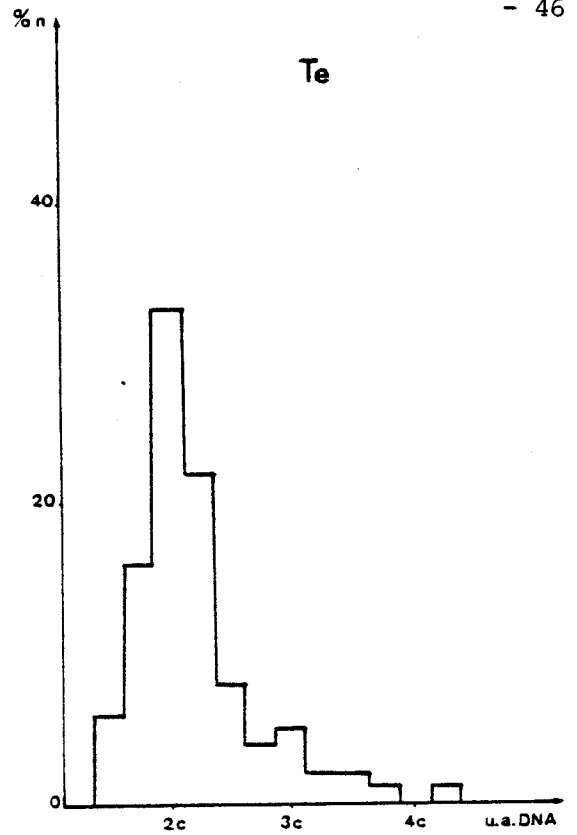
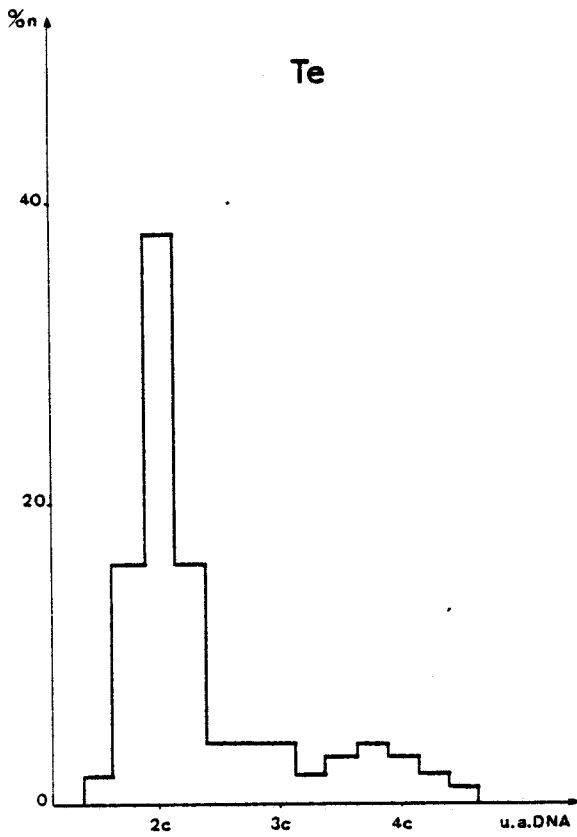
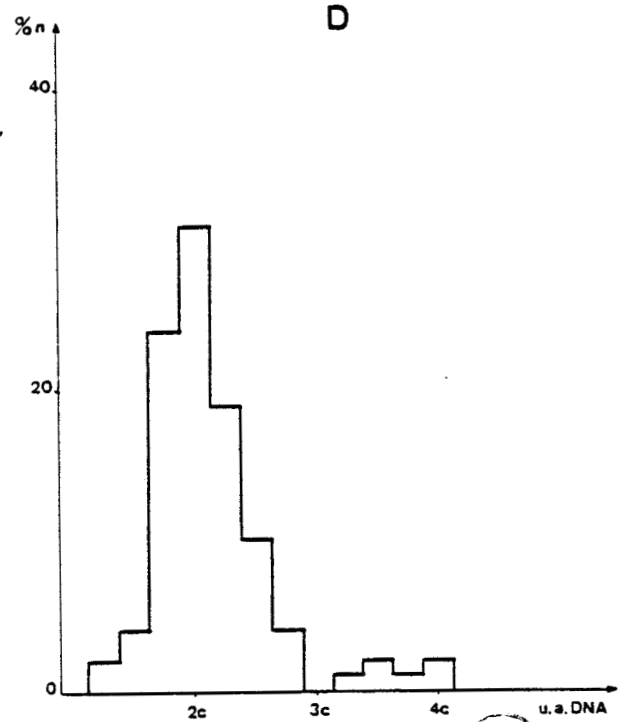
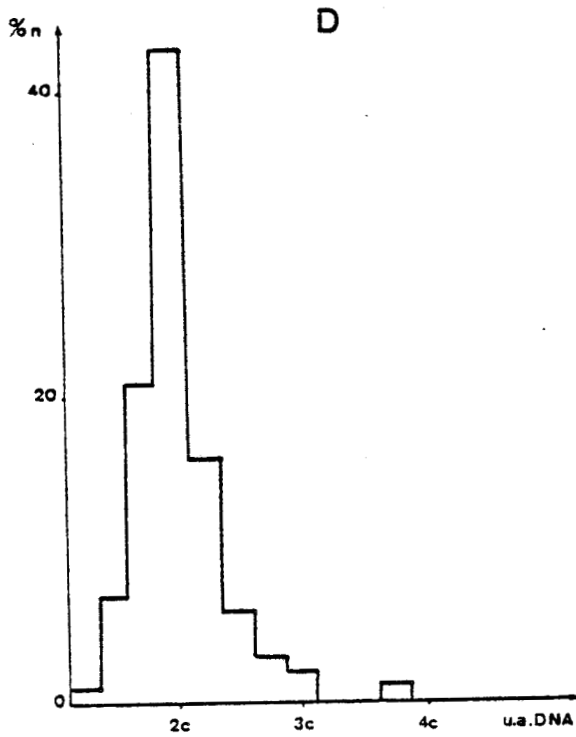
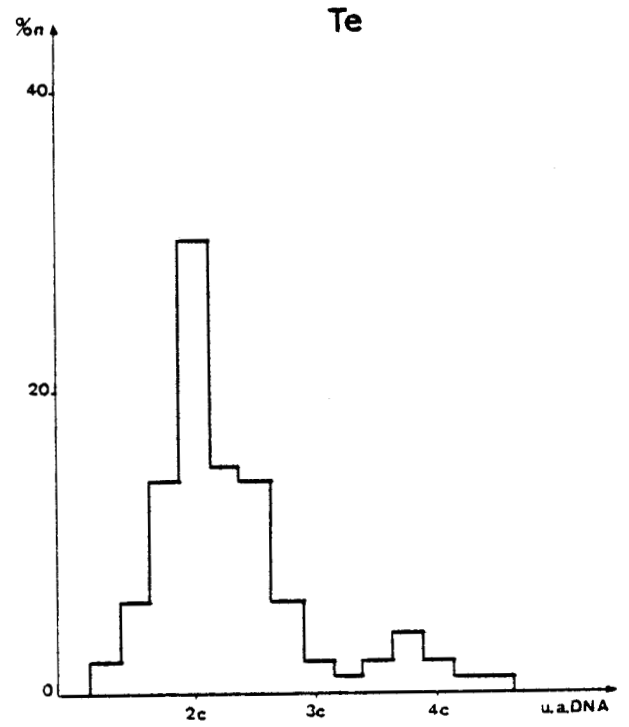
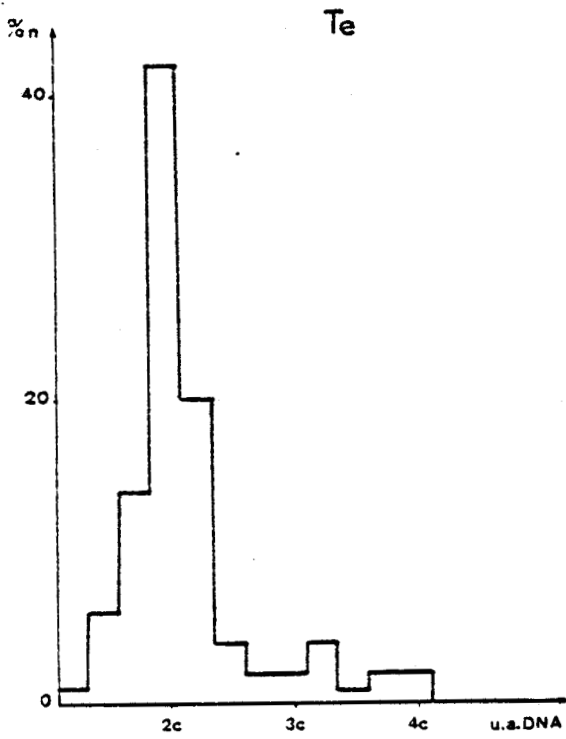


Figure 15 : Teneur en DNA nucléaire des cellules mésodermiques de blastèmes témoins (Te) et dénervés (D) après 72 h. de dénervation. En ordonnée pourcentage de noyaux, en abscisse teneur en DNA exprimée en unités arbitraires.



INS
LILLE

Figure 16 : Teneur en DNA nucléaire des cellules mésodermiques de blastèmes témoins (Te) et dénervés (D) après 96 h. de dénervation. En ordonnée pourcentage de noyaux, en abscisse teneur en DNA exprimée en unités arbitraires.

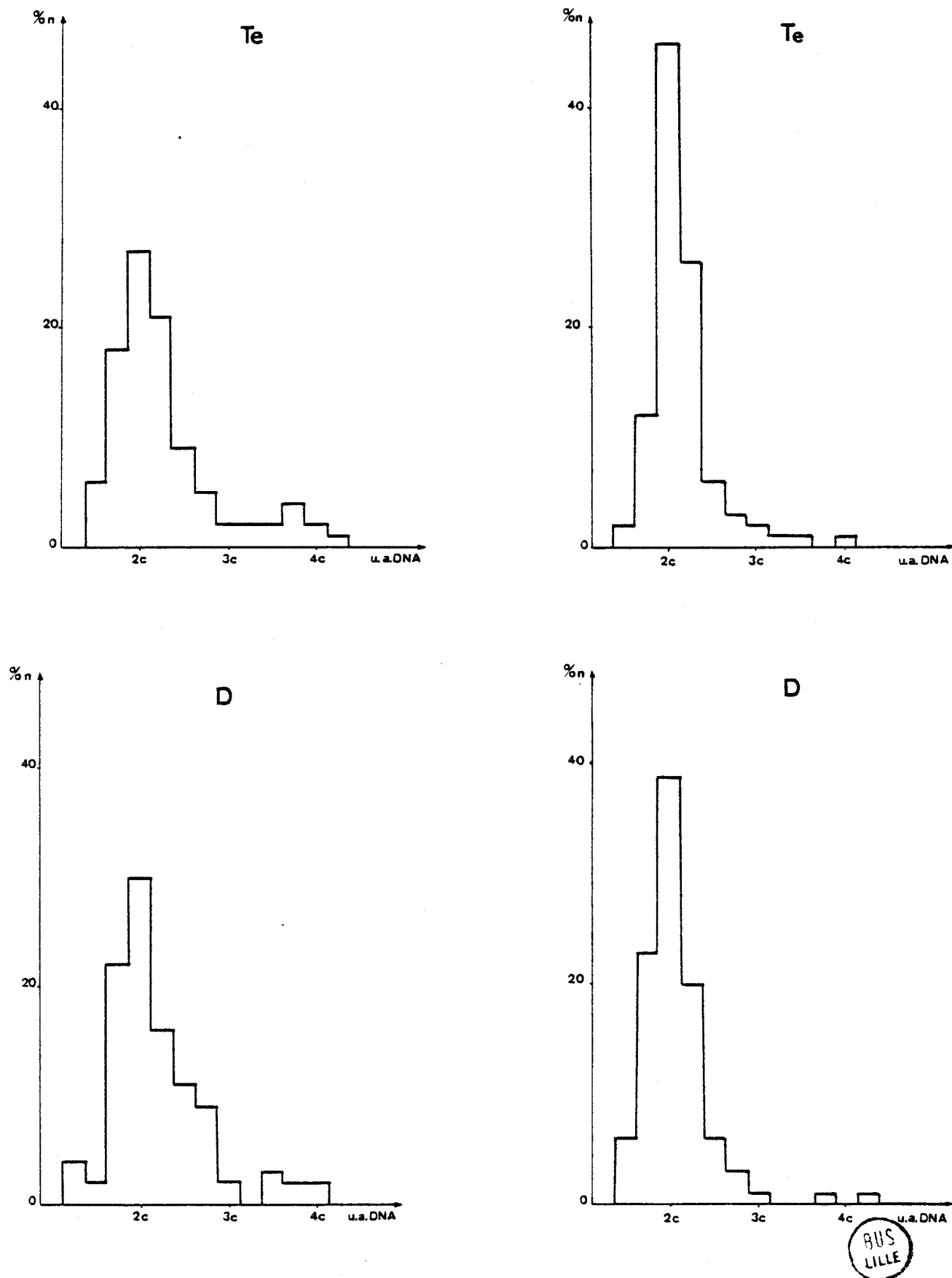


Figure 17 : Teneur en DNA nucléaire des cellules mésodermiques de blastèmes témoins (Te) et dénervés (D) après 168 h. de dénervation. En ordonnée pourcentage de noyaux, en abscisse teneur en DNA exprimée en unités arbitraires.

BUS
LILLE

Les résultats obtenus montrent que le pourcentage de cellules ayant une teneur en DNA comprise entre 3C et 4C diminue régulièrement à la fois dans les blastèmes dénervés et témoins mais qu'il est toujours inférieur chez les dénervés (10 % à 24 h. chez les dénervés contre 30 % chez les témoins, 3 % à 4 jours chez les dénervés contre 10 % chez les témoins. Le rapport des pourcentages correspondants (pourcentage de cellules 3C/4C de blastèmes dénervés sur le pourcentage de cellules 3C/4C de blastèmes innervés) (fig. 20) diminue, en fait, rapidement jusqu'à 96 heures de post-dénervation pour se stabiliser à partir de cette période à une valeur d'environ 10 %.

De façon inverse, le pourcentage de cellules ayant une teneur en DNA égale à 2C augmente au cours du temps, cette augmentation étant plus forte chez les dénervés (fig. 19), le rapport des pourcentages correspondants pour chaque temps de post-dénervation augmentant jusqu'à 72 h. environ après la dénervation, époque à partir de laquelle il se maintient à une valeur de 60 % environ (fig. 20).



II - DISCUSSION.

La diminution du pourcentage de cellules 3C/4C et l'augmentation corrélative du pourcentage de cellules 2C correspond, pour les blastèmes innervés, aux processus de différenciation qui commence à se manifester à partir du stade cône avancé pour se traduire par l'apparition du stade palette entre 4 et 7 jours après le stade cône moyen utilisé dans nos expériences.

Dans les blastèmes dénervés, l'évolution du pourcentage de cellules 3C/4C et 2C se fait dans le même sens que pour les blastèmes témoins mais est plus accentuée. En particulier, la diminution importante du pourcentage de cellules 3C/4C est conforme au résultats que nous avons obtenus par incorporation de thymidine ³H et mesure de l'indice mitotique. Nos résultats sont, par contre, en contradiction totale avec ceux de TASSAVA et coll. (1974) et CARLONE et FORET (1979) qui admettent que la dénervation bloque les cellules en G₂ ; TASSAVA et coll. (1983) ont d'ailleurs récemment rejeté leur propre hypothèse après avoir mesuré les durées de S et G₂ + 1/2 M par la méthode de QUASTLER

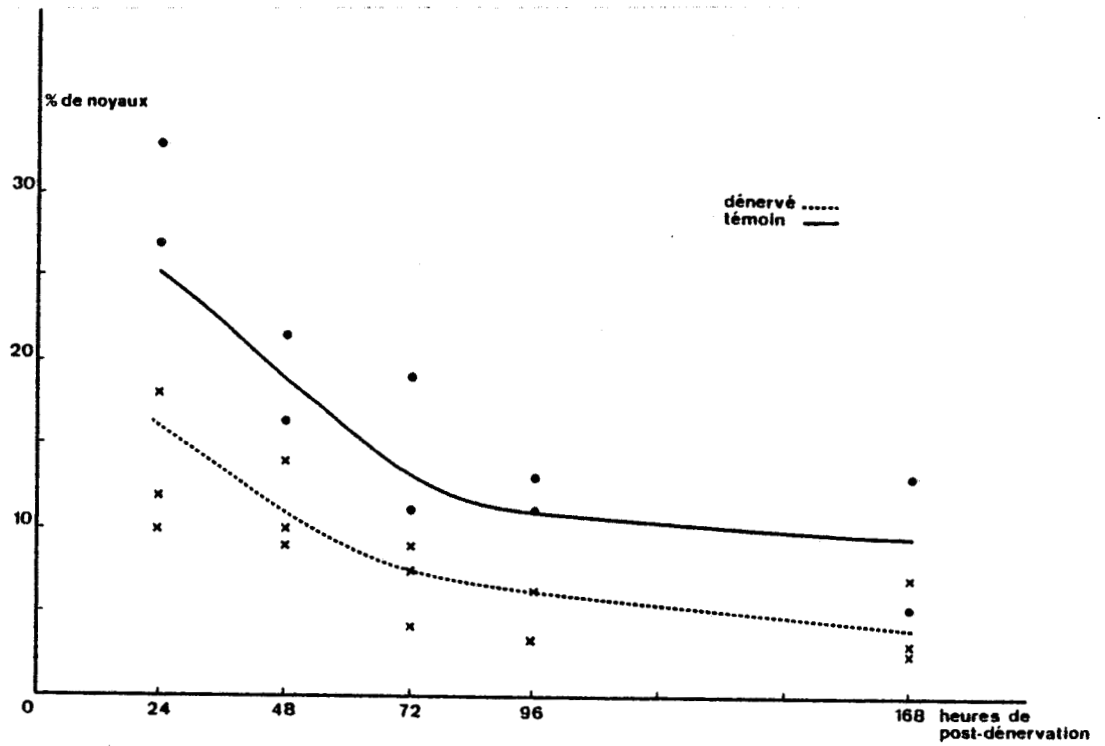


Figure 18 : Représentation graphique du pourcentage de noyaux dont la teneur en DNA est de 3C/4C dans les blastèmes dénervés (—) et témoins (—) en fonction du temps de post-dénervation.

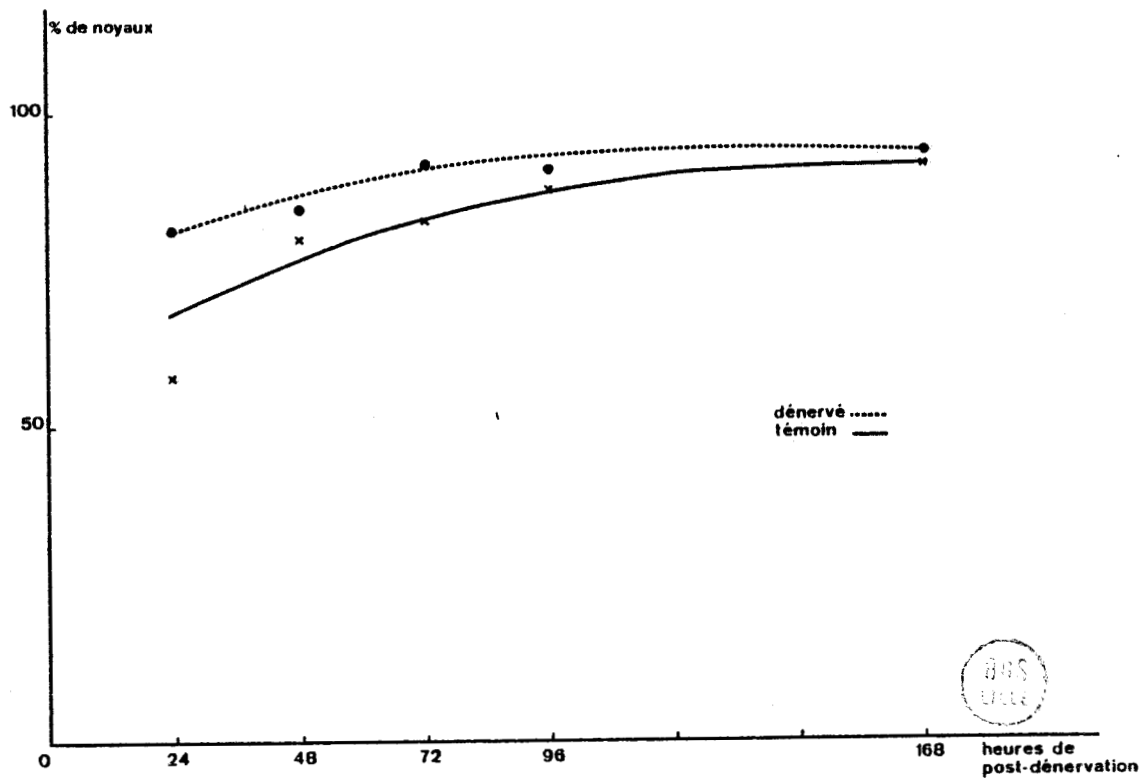


Figure 19 : Représentation graphique du rapport des pourcentage de noyaux dont la teneur en DNA est de 2C dans les blastèmes dénervés (—) et témoins (—) en fonction du temps de post-dénervation.



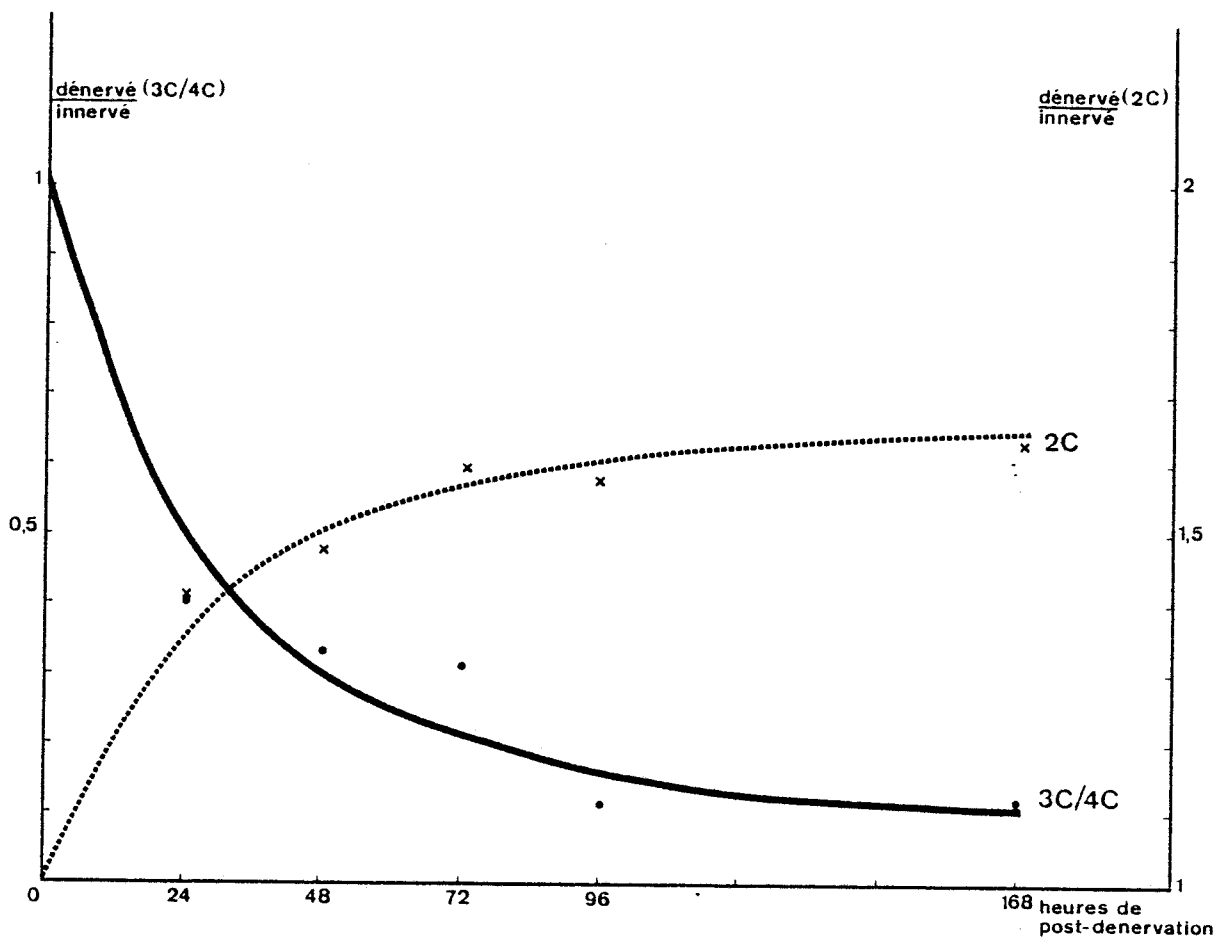


Figure 20 : Représentation graphique du rapport des pourcentage de noyaux dont la teneur en DNA est de 3C/4C et 2C dans les blastèmes dénervés par rapport aux témoins en fonction du temps de post dénervation.



et SHERMAN dans des blastèmes dénervés partiellement. Compte-tenu de l'évolution du pourcentage de cellules après dénervation, nos résultats nous conduisent à considérer que la dénervation provoque ou accentue l'accumulation des cellules de régénération dans une phase du cycle correspondant à une teneur en DNA égale à 2C. Nos résultats sont en accord avec l'hypothèse émise par MADEN (1978) selon laquelle le facteur neurotrophique contrôle soit la proportion des cellules dans la phase G₁ soit la vitesse de progression des cellules à travers cette phase. Plus récemment d'ailleurs, LOYD et CONNELLY (1981) ont observé aussi par microdensitométrie à l'aide d'un analyseur d'images (Quantimet 720) que les cellules de régénération mésodermiques s'accumulent dans une phase correspondant à une teneur en DNA égale à 2C (qualifiée arbitrairement de G₁) et ce, quand la dénervation est réalisée pendant la période d'indépendance nerveuse ; par contre ces auteurs n'ont pas observé d'accumulation de cellules dans cette phase lorsque la dénervation est effectuée pendant la période de dépendance nerveuse. LOYD et CONNELLY estime d'ailleurs que l'accumulation des cellules en 2C rendrait compte de la redifférenciation précoce des blastèmes dénervés pendant la phase d'indépendance nerveuse ; une telle situation n'est guère surprenante puisqu'elle concerne aussi l'évolution des blastèmes non dénervés (témoins) que nous avons utilisés pour nos mesures densitométriques ; ces blastèmes se différenciant normalement présentent évidemment une augmentation significative du pourcentage de cellules 2C au cours de la différenciation. Les blastèmes étudiés par LOYD et CONNELLY après dénervation au cours de la phase d'indépendance nerveuse correspondent en fait, pratiquement à nos blastèmes témoins puisque ces blastèmes s'engagent aussi dans la différenciation. Par contre, le fait que ces auteurs n'aient pas observé d'accumulation de cellules en 2C après dénervation pendant la phase de dépendance nerveuse (ce qui représente notre situation expérimentale) est contraire à nos résultats et pose un problème de fond : comment expliquer l'arrêt de la régénération pour des blastèmes (dénervés) dont le profil densitométrique des noyaux est identique à celui des blastèmes non dénervés, qui eux régénèrent normalement ? ...

L'augmentation après dénervation, du pourcentage de cellules mésodermiques dont la teneur en DNA est égale à 2C peut résulter de l'un ou des processus suivants :

- . ou la durée de la phase G₁ est allongée,
- . ou les cellules sortent du cycle en G₁.

Afin de répondre à ce problème, nous avons effectué une étude autoradiographique des blastèmes après marquage continu de thymidine ³H.

CHAPITRE III

INFLUENCE DE LA DÉNERVATION SUR L'ÉVOLUTION DES
CELLULES DE RÉGÉNÉRATION DANS LE CYCLE CELLULAIRE.
RÉSULTATS AUTORADIOGRAPHIQUES

Nous venons de montrer par cytophotométrie que les cellules mésodermiques de blastèmes dénervés s'accroissent dans une phase du cycle correspondant à une teneur en DNA égale à $2C$; Comme ce comportement peut résulter soit d'une sortie de cycle, soit d'un allongement de la phase G_1 de ces cellules, nous avons soumis les blastèmes à un marquage continu, par incubation prolongée en présence de thymidine 3H , technique qui permet de repérer les cellules hors cycle (n'incorporant pas le précurseur). Ce procédé a été utilisé sur des blastèmes parvenus au stade cône, innervés ou dénervés pendant 4 jours à la fois *in vivo* et *in vitro*. Dans ces conditions, le blastème est mis en présence (par injection *in vivo*, ou addition au milieu *in vitro*) de thymidine tritiée (renouvelée toutes les 6 h. *in vivo* et toutes les 24 h. *in vitro*) pendant 48 h. ou 96 h., ces durées correspondent à environ 1 à 2 fois la durée du cycle cellulaire des cellules de blastème de membre innervé (Tableau 10) et permettent donc à toutes les cellules en cycle de traverser la phase S en présence de thymidine 3H .

Toutes les mesures de l'indice de marquage ont été effectuées sur l'extrémité apicale des blastèmes (soit sur une longueur de 200 μm).

Matériel (Tissu ou organe)	Tempé- rature °C.	G ₁ +1/2M	S	G ₂ +1/2M	Total	Références
<u>Triton</u>						
- blastème du membre	20	4,5	34-41	3	45	GRILLO (1971)
<u>Axolotl</u>						
- blastème d'avant bras	20	10	38	5	53	WALLACE et MADEN (1976)
- blastème d'avant bras	20	11,5	30	6,5	48	MADEN (1976)
- blastème de bras	20	13	28	7	48	MADEN (1976)
- blastème de bras	21,5	2,4	32	5,6	40	Mc CULLOUGH et TASSAVA (1976)
- blastème de bras dénervé	21,5	16,6	30,5	6,4	53,5	TASSAVA et Mc CULLOUGH (1978)

Tableau 10 : *Durée en heures des phases du cycle cellulaire chez le Triton adulte N. viridescens et l'Axolotl au stade larvaire A. mexicanum. (d'après WALLACE, 1981).*



I - ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE *IN VIVO*

A - MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

Nous avons mesuré les indices de marquage des cellules épidermiques et mésodermiques de la partie distale (sur une longueur de 200 μm) des blastèmes innervés et dénervés (Pl. III, fig. a, b, c, d). Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 21 et 22 et les tableaux 11 et 12.

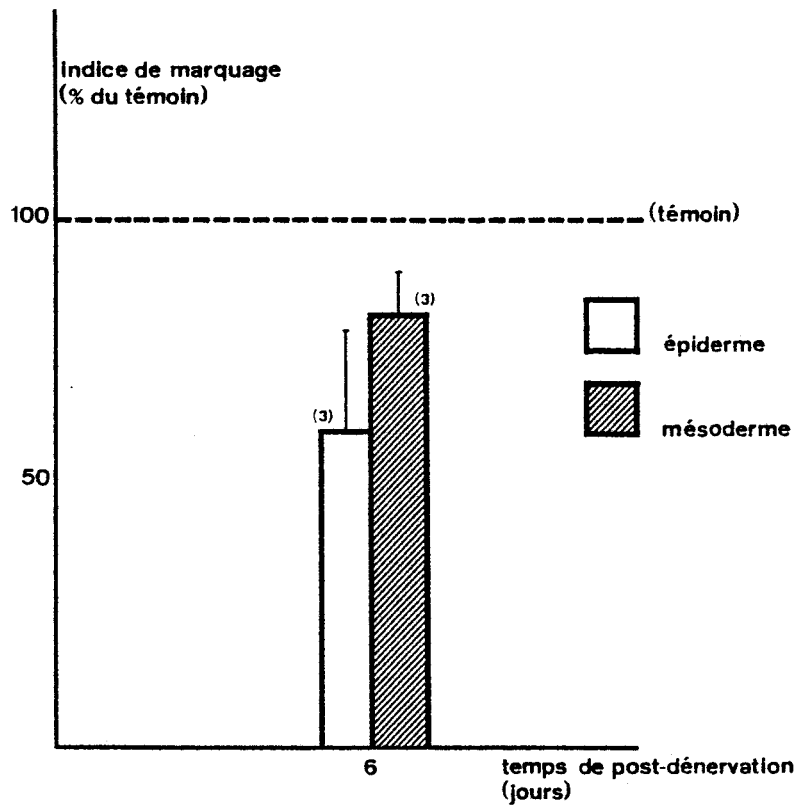


Figure 21 : Pourcentage des indices de marquage après 48 h. de marquage continu de l'épiderme et du mésoderme des blastèmes dénervés pendant 6 jours. Entre parenthèses: nombre de blastèmes utilisés.



	Epiderme	Mésoderme
Dénervés	(3) 14,99 ± 4,84	(3) 80,22 ± 2,42
Innervés	(3) 25,02 4,20	(3) 94,40 3,66
D/Te.	× 0,60	× 0,85

Tableau 11 : Indices de marquage après 48 h. de marquage continu de l'épiderme et du mésoderme des blastèmes innervés (Te) et dénervés (D) (6 jours de dénervation). Entre parenthèses : nombre de blastèmes utilisés.

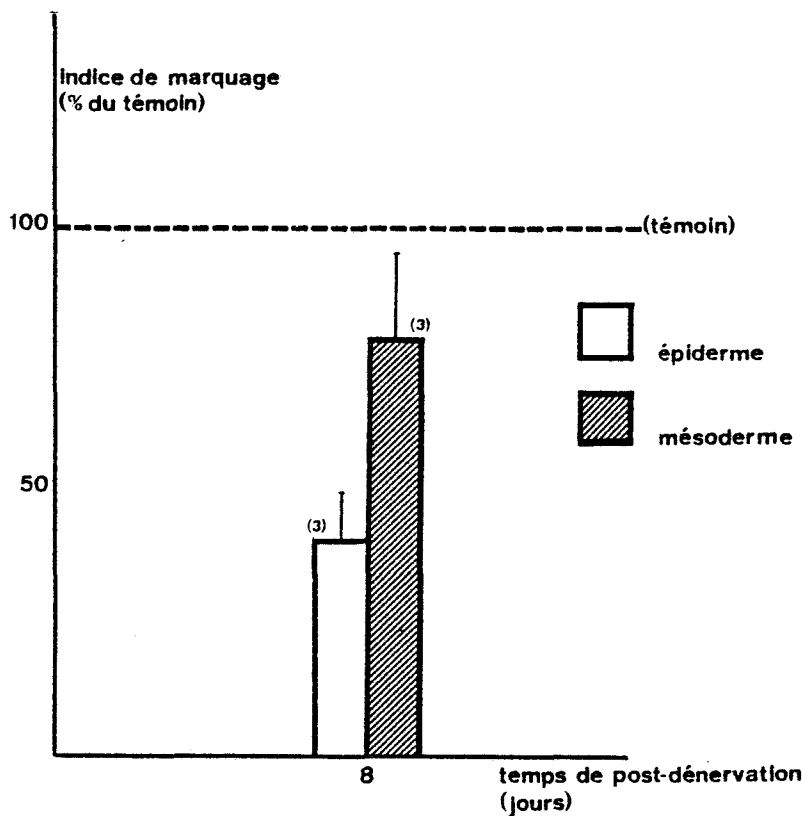


Figure 22 : Pourcentage des indices de marquage après 96 h. de marquage continu de l'épiderme et du mésoderme des blastèmes dénervés pendant 8 jours. Entre parenthèses : nombre de blastèmes utilisés.



	Epiderme	Mésoderme
Dénervés	(3) 21,87 ± 4,11	(3) 72,59 ± 14,79
Innervés	(3) 53,26 4,15	(3) 91,59 4,22
D/Te.	0,41	0,79

Tableau 12 : *Indices de marquage après 96 h. de marquage continu de l'épiderme et du mésoderme des blastèmes innervés (Te) et dénervés (D) (8 jours de dénervation). Entre parenthèses, nombre de blastèmes utilisés.*

Les résultats obtenus permettent de déterminer le pourcentage de cellules qui ont traversé la phase S du cycle (indice de marquage) pendant la période de disponibilité de thymidine ³H (durée de marquage.).

Pour un marquage continu de 48 h., ils montrent que l'indice de marquage de l'épiderme passe de 25 % pour les blastèmes innervés à 15 % pour les dénervés soit une diminution de 40 % ; l'indice de marquage du mésoderme ne chute par contre que de 15 % (94 % chez les innervés pour 80 % chez les dénervés).

Après 96 h. de marquage continu, on observe pour l'épiderme un doublement des indices de marquage tant pour l'innervé (53 %) que pour le dénervé (22 %) soit une diminution de cet indice de 59 % après dénervation. Par contre, les indices de marquage du mésoderme sont pratiquement identiques à ceux obtenus après 48 h. de marquage continu.

B - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Selon BRYANT et coll. (1971), les blastèmes de régénération de membres contiennent, outre les cellules d'origine sanguine (hématies, cellules phagocytaires), trois types cellulaires que ces auteurs différencient par l'ultrastructure cytoplasmique : des cellules communes ("common cells") caractérisées par un réticulum endoplasmique rugueux bien développé, des cellules

pâles ("pale cells") à cytoplasme peu dense aux électrons et réticulum endoplasmique dilaté, et des cellules vacuolaires ("vacuolar cells") à nombreuses vacuoles claires. Après dénervation, ces auteurs ont constaté une augmentation significative des cellules pâles et vacuolaires. Afin de savoir si l'un ou l'autre de ces types cellulaires correspond à des cellules hors cycle (c'est à dire n'incorporant pas la thymidine ^3H après un marquage continu de longue durée (96 h.), nous avons effectué une étude autoradiographique à haute résolution sur des blastèmes dénervés depuis 8 jours. Dans ces blastèmes, nous avons aussi observé les trois types cellulaires décrits par BRYANT et coll. et nous avons pu constater que toutes incorporent la thymidine ^3H (Pl. IV, fig. a, b, c, d et e).

C - DISCUSSION

Compte-tenu de la durée importante de la phase S (Tableau 10) et du temps de disponibilité de thymidine ^3H après injection (4 h. d'après CHIBON et BRUGAL, 1973), la technique que nous avons utilisée (injection toutes les 6 h.) permet à toutes les cellules du blastème de disposer du précurseur pendant la durée de l'expérience.

Dans ces conditions, nos résultats montrent que le mésoderme des blastèmes dénervés présente 15 à 20 % de cellules de plus que les témoins n'incorporant pas le précurseur (15 % après 6 jours de dénervation et 48 h. de marquage continu, 20 % après 8 jours de dénervation et 96 h. de marquage continu - différence non significative). Il importe d'interpréter ce résultat en tenant compte de ceux des chapitres précédents ; nous avons, en effet, constaté que la dénervation entraîne une diminution de la synthèse de DNA et de l'indice mitotique de 75 %, une chute de l'indice de marquage après marquage bref de 56 % et une accumulation des cellules dans une phase du cycle correspondant à une teneur en DNA égale à 2C. Comme par rapport à l'innervé, 80 à 85 % des cellules traversent encore le cycle après dénervation, on doit considérer, compte-tenu de la durée du cycle des cellules mésodermiques de blastèmes innervés (de l'ordre de 40 à 50 h.), que ces cellules présentent un allongement de la phase G_1 ; les 15 à 20 % de cellules n'ayant pas incorporé de thymidine doivent, par contre, être considérées comme des

cellules ayant quitté le cycle avant le début de l'expérience (ou ayant une phase G₁ particulièrement longue c'est à dire supérieure au temps de marquage utilisé - 96 h.). Il semble donc que la majorité des cellules mésodermiques des blastèmes dénervés restent dans le cycle mais avec une phase G₁ allongée. Nos observations ultrastructurales sont d'ailleurs en accord avec ce résultat puisque tous les types cellulaires que nous avons observé incorporent la thymidine H.

Dans l'épiderme, la situation est un peu différente en raison du doublement des indices de marquage entre 48 et 96 h. de marquage continu. Toutefois, comme pour le mésoderme, le pourcentage de cellules épidermiques n'incorporant pas la thymidine augmente après dénervation ; cette augmentation est cependant supérieure à celle observée pour le mésoderme puisque après 48 h. de marquage continu 40 % des cellules n'incorporent pas le précurseur (60 % après 96 h. de marquage continu). Comme la durée du cycle des cellules épidermiques n'est pas connue et compte-tenu de la faible valeur de l'indice de marquage d'une part après marquage bref (13 % pour l'innervé, 4 % pour le dénervé) et d'autre part après marquage continu (25 % pour l'innervé, 15 % pour le dénervé après 48 h. de marquage continu), il est difficile d'interpréter ces résultats. Néanmoins, comme pour le mésoderme, on peut penser que les cellules épidermiques encore engagées dans le cycle (60 % de l'innervé après 48 h. de marquage continu, 40 % après 96 h.) ont une phase G₁ allongée étant donné la diminution, après dénervation, de l'ordre de 70 %, de la synthèse de DNA, de l'indice mitotique et de l'indice de marquage bref.

II - ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE IN VITRO.

A - RESULTATS.

Les impératifs liés aux conditions de culture ont limité notre étude à un marquage continu de 48 h. uniquement (Pl. III, fig. e, f, g, h). Les résultats sont indiqués dans la figure 23 et le tableau 13.

	Epiderme	Mésoderme
D	(3) 23,41 ± 6,66	(3) 67,36 ± 19,86
Te.	(3) 24,22 ± 5,64	(3) 75,49 ± 8,48
D/Te.	0,96	0,89

Tableau 13 : Indices de marquage après 48 h. de marquage continu de l'épiderme et du mésoderme des blastèmes ganglionnés (Te) et non ganglionnés (D) après 4 jours de culture.

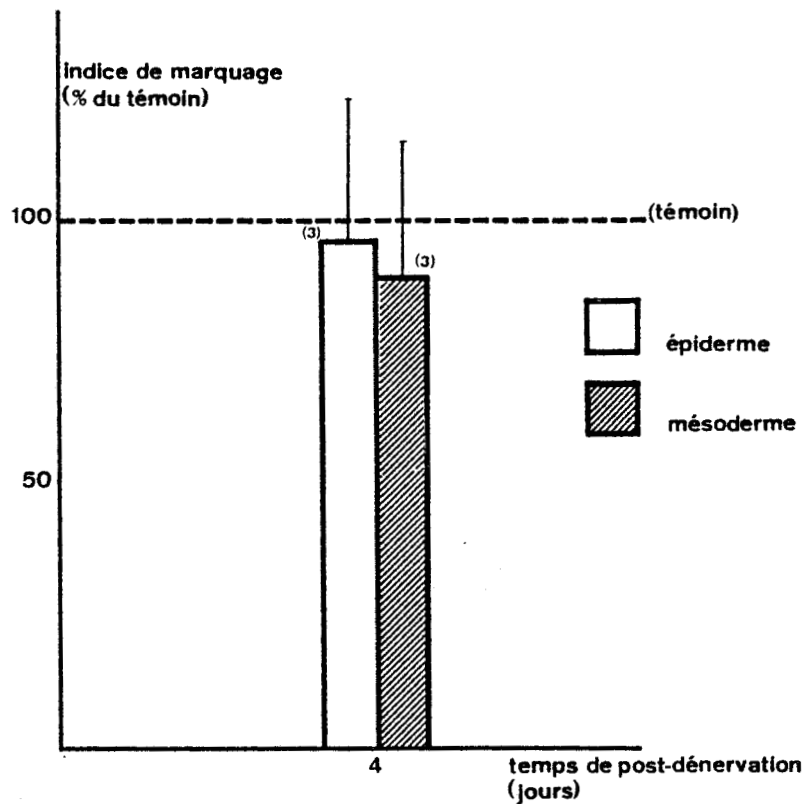


Figure 23 : Pourcentage des indices de marquage après 48 h. de marquage continu de l'épiderme et du mésoderme des blastèmes cultivés en l'absence de ganglions nerveux après 4 jours de culture. Entre parenthèses: nombre de blastèmes utilisés.

Les résultats obtenus montrent que les deux tissus du blastème épiderme et mésoderme, présentent une diminution de leur indice de marquage après dénervation ; toutefois, la différence entre ces indices n'est pas significative.

B - DISCUSSION.

Bien que dans nos conditions expérimentales, on ne décèle pas de différence significative des indices de marquage continu des tissus de blastèmes ganglionnés ou non, nos résultats permettent de considérer qu'*in vitro*, la dénervation (blastème non ganglionné) entraîne un allongement de la phase G₁ des cellules épidermiques et mésodermiques ; en effet, le fait qu'il n'existe pas ou peu de différence des indices de marquage continu entre des blastèmes ganglionnés et des blastèmes cultivés seuls, alors que la prolifération de ces blastèmes diminue en condition aneurogénique (Chapitre I) plaide en cette faveur. Si cette situation correspond à celle observée *in vivo*, il n'en est pas de même en ce qui concerne l'intervention de la dénervation sur la mise hors cycle des cellules de régénération ; contrairement à ce qui se passe *in vivo*, le pourcentage de cellules hors cycle n'apparaît pas modifié *in vitro* en l'absence de facteur nerveux.

III - CONCLUSION.

Les résultats obtenus après marquage continu *in vivo* et *in vitro* nous permettent de considérer que la dénervation entraîne un allongement de la phase G₁ des cellules de régénération épidermiques et mésodermiques. D'autre part, ils mettent en évidence le fait que des blastèmes dénervés présentent un pourcentage de cellules hors cycle supérieur à celui des blastèmes innervés. Cependant, la méthode utilisée ne permet pas de saisir l'évolution de ce pourcentage en fonction du temps de dénervation, car seules les cellules hors cycle au tout début de l'incubation en présence de thymidine ³H peuvent être comptabilisées ; en effet, les cellules qui sortiront du cycle au cours de la période de disponibilité du précurseur seront marquées et donc comptées comme des cellules en cycle.

Il importe donc d'analyser les proportions des cellules en G_1 et hor cycle à différent moments après la dénervation afin de préciser leur évolution. Nous avons eu recours pour cela à un système d'analyse microphotométrique à balayage automatique qui permet de reconnaître les cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.

CHAPITRE IV

ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DU CYCLE DES CELLULES DE
RÉGÉNÉRATION APRÈS DÉNERVATION PAR ANALYSE D'IMAGES
MICROSCOPIQUES (SAMBA 200)

I - INTRODUCTION.

La connaissance de la cinétique cellulaire représente une information de première importance chaque fois que l'on s'intéresse aux particularités fonctionnelles d'un tissu. Deux méthodes cytochimiques quantitatives ont été mises en oeuvre pour l'étude des cycles cellulaires, l'analyse en cytophotométrie d'absorption ou d'émission et l'analyse en cytophotométrie de flux de cellules en suspension. Lors de l'application de ces méthodes à l'étude du cycle cellulaire, seul le contenu en DNA de noyaux est généralement pris en compte. Ces méthodes conduisent alors à l'établissement d'histogrammes relatifs à la distribution des noyaux cellulaires en fonction de leur contenu en DNA. Dans le cas d'une population asynchrone, on obtient deux modes de distribution de DNA; le premier mode représente les cellules à faible taux de DNA (G_0 , G_1), le second mode représente les cellules à taux élevé en DNA (G_2 , M), les valeurs intermédiaires correspondent aux cellules en S. Ces deux modes correspondent à des distributions gaussiennes parfaites.

La distinction entre d'une part les cellules en début de S et les cellules en G_0 , G_1 et d'autre part entre les cellules en fin S et G_2 est arbitraire (DIAMOND et coll., 1981) ; en plus, la distribution entre G_0 et G_1 est impossible malgré le grand nombre de méthodes qui ont été proposées pour une interprétation correcte de tels histogrammes (ROTIROTI et OKADA, 1975 ; KENDALL et coll., 1977 ; JOHNSTON et coll., 1978).

D'autre part, il a été démontré par un certain nombre d'auteurs (SAWICKI et coll., 1974 ; BRUGAL, 1976 ; NICOLINI et coll., 1977 et GIROUD, 1982) que l'analyse d'images microscopiques qui donne une représentation de la quantité de DNA nucléaire mais aussi la répartition et la texture de la chromatine, est un moyen très efficace pour l'identification des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Nous avons utilisé cette méthode à l'aide du SAMBA 200 (Thomson TITN) à la fois sur les cellules épidermiques (Fig. 24) et mésodermiques (Fig. 25) de blastèmes de régénération innervés et dénervés depuis 48 h. et 96 h. ; en raison du manque de disponibilité de

l'appareil, seule l'étude *in vivo* a été réalisée. Les cellules ont été classées selon la méthode de MOUSTAFA et BRUGAL (1983).

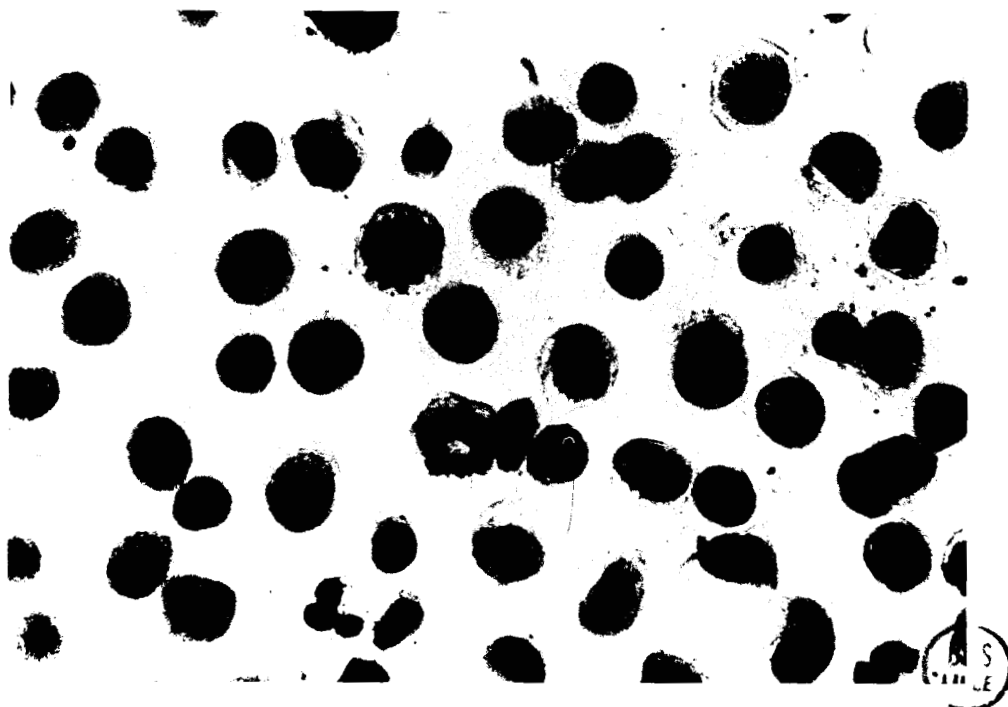


Figure 24 : Squash de cellules épidermiques de blastème innervé.



Figure 25 : Squash de cellules mésodermiques de blastème innervé.

II - RESULTATS

La densité optique intégrée (D.O.I.) étant la variable continue (TERRENOIRE et TOUNISSOUX, 1979), dans un premier temps, les résultats sont présentés sous la forme d'histogramme de fréquence de D.O.I. (Fig. 26, 27, 28 29). Les cellules sont ensuite classées en fonction des autres paramètres selon la méthode de MOUSTAFA et BRUGAL (1983) ; les paramètres les plus discriminants sont dans l'ordre :

- La densité optique intégrée (D.O.I.)
- La surface du noyau
- La variance de la densité optique (V.D.O.)
- La distribution des niveaux de gris (écart type des coefficients de la matrice de coocurrence
- La densité optique moyenne (D.O.M)

Après avoir éliminé de l'analyse les cellules sanguines (hématies et granulocytes) les cellules pycnotiques et les cellules accolées, il apparaît que les cellules du blastème (épidermiques d'une part, mésodermiques d'autre part) se répartissent en 5 classes. La validité de cette classification est testée par l'analyse discriminante à l'aide d'une matrice de confusion (Tableaux 14 et 15) qui permet d'établir un tableau des cellules bien ou mal reclassées dans leur groupe d'appartenance : on constate que 90 à 100 % des cellules sont bien reclassées, le faible taux de confusion concernent les cellules qui se trouvent entre deux phases adjacentes.

Les 5 classes obtenues correspondent aux différentes phases du cycle (G_0 , G_1 , S, G_2 , M). La répartition des cellules dans chacune de ces phases est indiquée dans les tableaux 16 et 17 et 20 pour l'épiderme et 18, 19 et 21 pour le mésoderme.

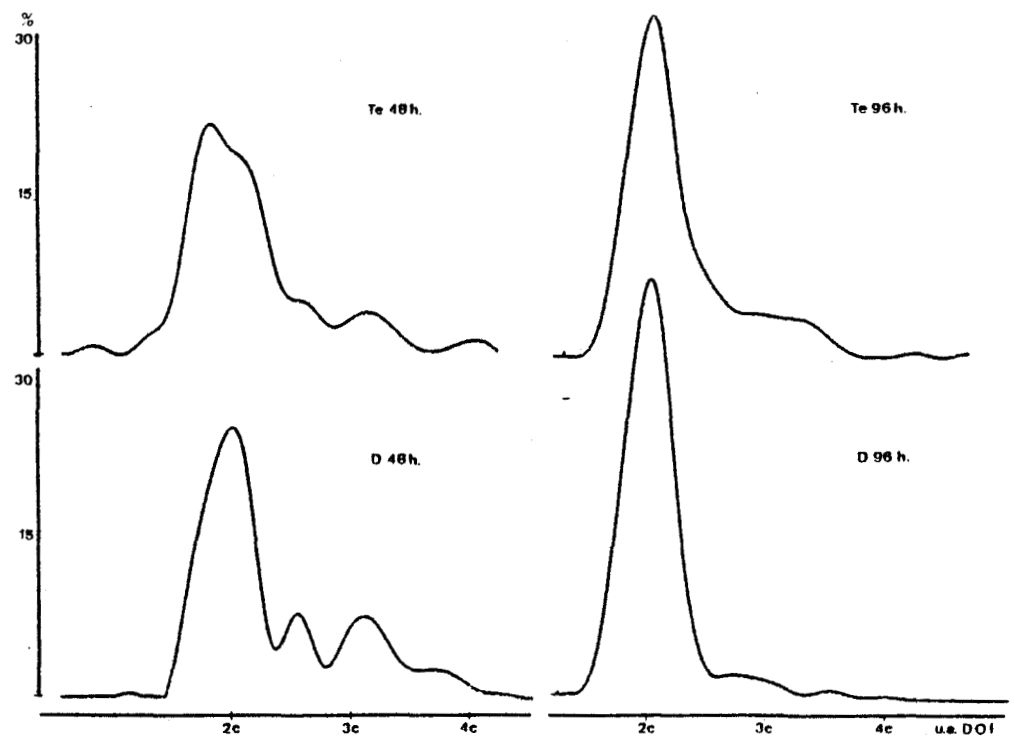


Figure 26 : Histogrammes de fréquence de la distribution du DNA des cellules épidermiques après 48 h. et 96 h. de dénervation (Te : témoin, D : dénervé). En ordonnée, pourcentage de cellules ; en abscisse : quantité de DNA en unités arbitraires.

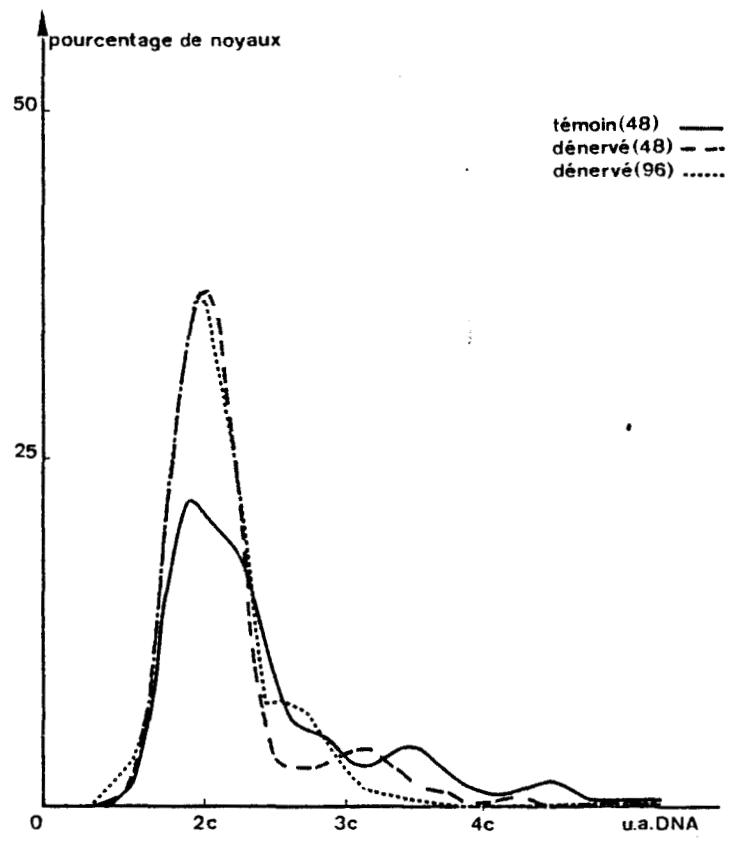


Figure 27 : Même légende que la figure 26. Les histogrammes sont superposés.

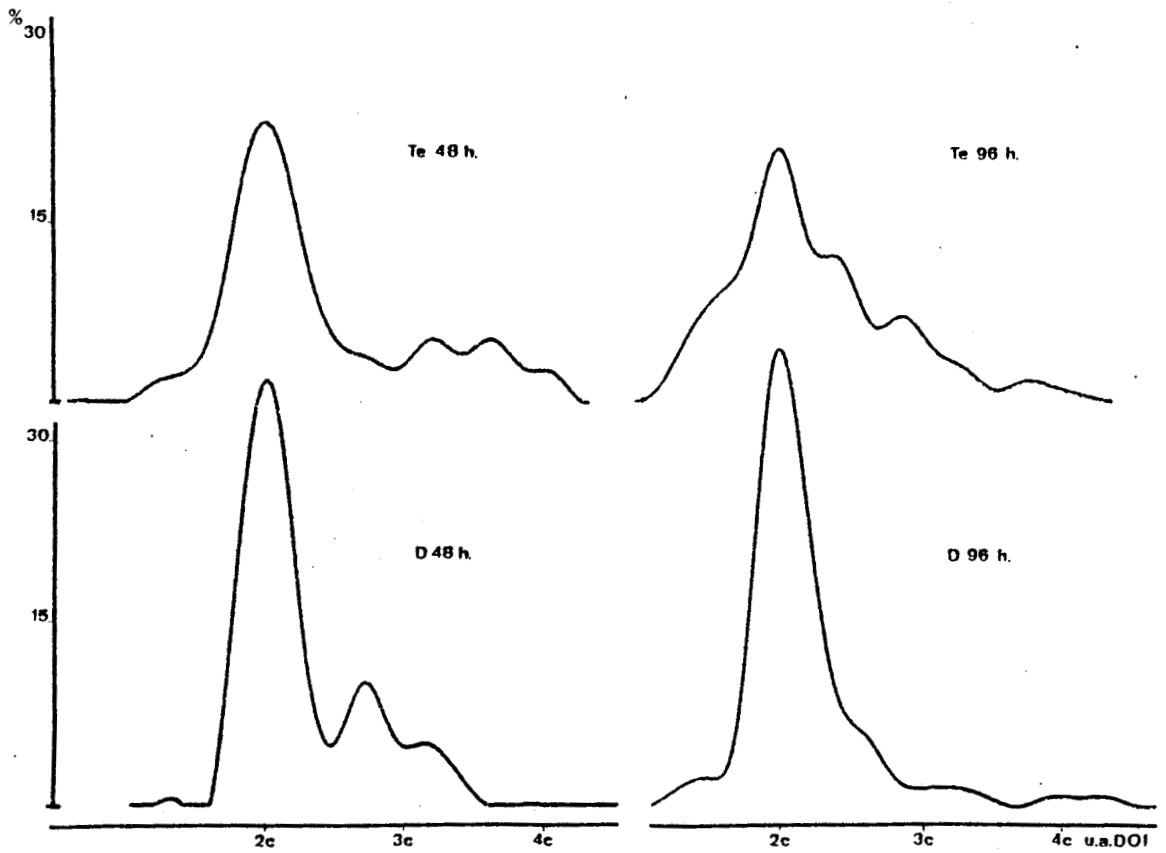


Figure 28 : Histogrammes de fréquence de la distribution du DNA des cellules mésodermiques après 48 h. et 96 h. de dénervation (Te : témoin, D : dénervé). En ordonnée, pourcentage de cellules ; en abscisse : quantité de DNA en unités arbitraires.

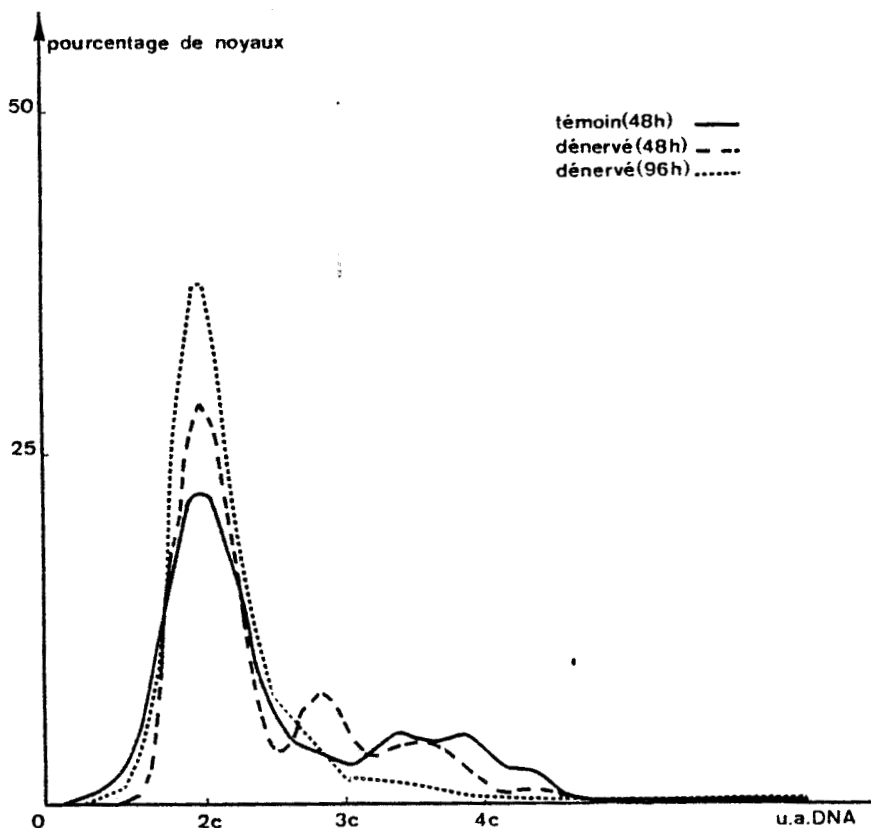


Figure 29 : Même légende que la figure 28. Les histogrammes sont superposés.

II \ I	G ₀	G ₁	S	G ₂	M	Total cellules
G ₀	75	5	0	0	0	80
G ₁	6	81	0	0	0	87
S	0	4	41	1	0	46
G ₂	0	0	0	8	0	8
M	0	0	0	0	6	6
Total cellules	81	90	41	9	6	227

BUS
LILLE

M. : Mésoderme

II \ I	G ₀	G ₁	S	G ₂	M	total cellules
G ₀	79	9	0	0	0	88
G ₁	4	40	0	0	0	44
S	0	2	85	1	0	88
G ₂	0	0	1	23	2	26
M	0	0	0	0	3	3
total cellules	83	51	86	24	5	249

BUS
LILLE

Tableaux 14 et 15 : Exemple de matrices de confusion obtenues entre la méthode de reconnaissance automatique non supervisée (I) des phases du cycle cellulaire et l'analyse discriminante (II). Le nombre de cellules bien classées dans les mêmes phases par les deux méthodes est situé sur les matrices diagonales, alors que les autres cellules situées de part et d'autre correspondent aux cellules mal classées. Dans ces exemples le taux de confusion est 93 % pour les cellules épidermiques (E) et 92,3 pour les cellules mésodermiques (M).

	G ₀	G ₁	S	G ₂	M	Total cellules
D (3)	41,56±8,93	34,86±4,90	19,15±1,57	2,21±0,60	2,20±1,85	676
		59,72±0,76	32,95±2,35	3,75±0,47	3,58±2,64	381
Te. (3)	33,87±8,03	29,75±3,20	25,27±3,05	4,64±2,15	6,44±0,46	806
		45,12±2,87	38,29±3,10	6,77±2,80	9,82±0,91	532

Tableau 16 : Proportion de cellules épidermiques de blastèmes innervés (Te) et dénervés (D) depuis 48 h., dans les différentes phases du cycle cellulaire ; les pourcentages sont établis pour chaque échantillon (Te et D) par rapport à l'ensemble de la population cellulaire (1ère ligne) et par rapport aux cellules en cycle (2ème ligne) ; entre parenthèse : nombre de blastèmes utilisés.

	G ₀	G ₁	S	G ₂	M	Total cellules
D (3)	43,35±9,26	51,51±10,11	3,88±1,86	1,29±0,19	0	1562
		90,63± 3,90	7,09±3,78	2,28±0,13	0	879
Te. (3)	54,43±10,54	31 ± 3,25	10,60±4,32	3,54±2,87	1,35±0,08	1402
		69,10±11,07	22,34±4,64	6,85±5,35	2,58±0,06	651

Tableau 17 : Proportion de cellules épidermiques de blastèmes innervés (Te) et dénervés (D) depuis 96 h., dans les différentes phases du cycle cellulaire ; les pourcentages sont établis pour chaque échantillon (Te et D) par rapport à l'ensemble de la population cellulaire (1ère ligne) et par rapport aux cellules en cycle (2ème ligne) ; entre parenthèse : nombre de blastèmes utilisés.

	G ₀	G ₁	S	G ₂	M	Total cellules
D (3)	42,60±28,81	26,81 ± 9,54	18,46±14,56	10,01 ± 6,81	2,11±1,75	956
		51,35±14,39	29,46±12,73	16,07 ± 6,10	3,13±2,12	524
Te. (3)	34,66±11,84	31,66±14,30	20,60 ± 6,15	9,58 ± 2,89	3,49±0,48	997
		47,28±13,60	32,80±12,49	14,48 ± 2,66	5,43±0,97	635

Tableau 18 : Proportion de cellules mésodermiques de blastèmes innervés (Te) et dénervés (D) depuis 48 h., dans les différentes phases du cycle cellulaire ; les pourcentages sont établis pour chaque échantillon (Te et D) par rapport à l'ensemble de la population cellulaire (1ère ligne) et par rapport aux cellules en cycle (2ème ligne) ; entre parenthèse : nombre de blastèmes utilisés.

	G ₀	G ₁	S	G ₂	M	Total cellules
D (3)	49,67±11,95	35,86±16,75	11,12±2,48	3,23±0,83	0	737
		70,74±13,46	24,15±9	7,67±0,67	0	348
Te. (3)	37,93 ± 4,76	22,97 ± 0,19	26,35±2,81	10,72±3,58	2 ± 0,41	1152
		37,12 ± 3,01	42,42±3,17	17,06±4,91	3,40±0,90	710

Tableau 19 : Proportion de cellules mésodermiques de blastèmes innervés (Te) et dénervés (D) depuis 96 h., dans les différentes phases du cycle cellulaire ; les pourcentages sont établis pour chaque échantillon (Te et D) par rapport à l'ensemble de la population cellulaire (1ère ligne) et par rapport aux cellules en cycle (2ème ligne) ; entre parenthèse : nombre de blastèmes utilisés.

A - EPIDERME. (Tableaux 16, 17 et 20 et Fig. 30)

Après 48 h. de dénervation seuls les pourcentages de cellules en mitose et en phase G_1 sont modifiés de façon significative ; on observe une chute de l'indice mitotique de l'ordre de 60 % et une augmentation de l'ordre de 20 % du pourcentage de cellules en G_1 . Après 96 h. de dénervation, pratiquement toutes les classes de cellules sont affectées significativement. Le pourcentage de cellules hors-cycle (G_0) diminue de 20 % alors que le pourcentage de cellules en G_1 augmente de 66 % (Fig. 30 et tableau 20). Les pourcentages de cellules en S, G_2 et M diminuent respectivement de 73 %, 74 % et 100 %, soit par rapport aux cellules en cycle une diminution des pourcentages de - 68 % pour S, - 67 % pour G_2 et - 100 % pour M ; le pourcentage de cellules en G_1 augmente au détriment de toutes les phases du cycle (+ 31 % par rapport aux cellules en cycle).

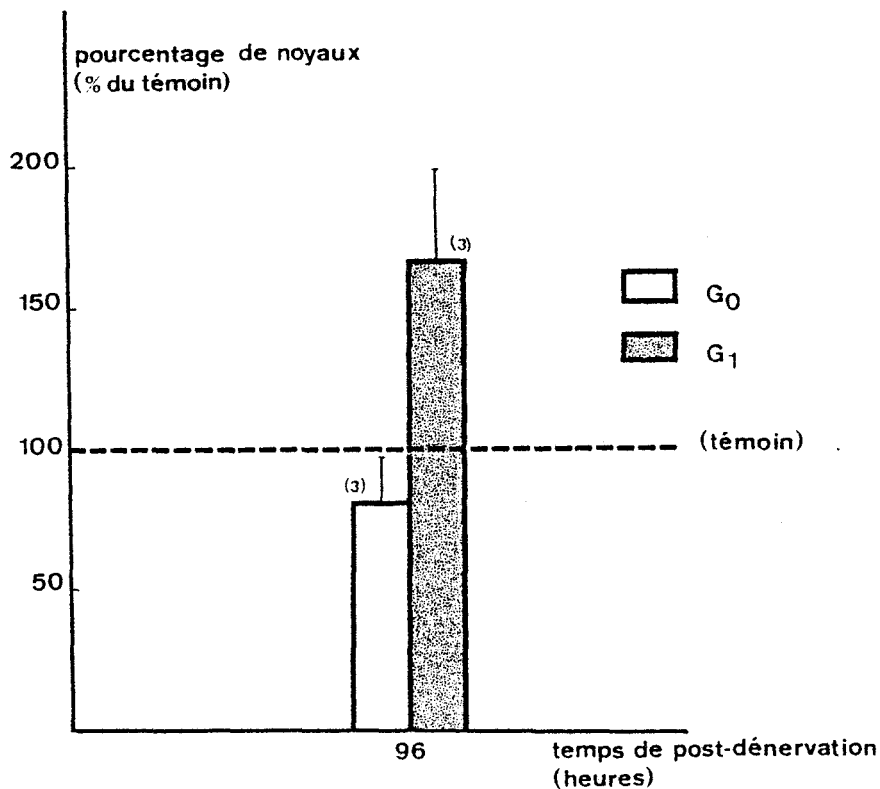


Figure 30 : Pourcentage de cellules épidermiques dans les phases G_0 et G_1 des blastèmes dénervés par rapport aux témoins, après 96 h. de post-dénervation. Entre parenthèses : nombre de blastèmes utilisés.

T	Epiderme	
	G ₀	G ₁
D (3)	* 43,35 ± 9,26	* 51,51 ± 10,11
Te. (3)	* 54,43 ± 10,54	* 31 ± 3,25
D/Te.	0,79	1,66

Tableau 20 : Pourcentage des cellules épidermiques dans les phases G₀ et G₁ des blastèmes innervés (Te) et dénervés (D) après 96 h. de post-dénervation (T). Entre parenthèses : nombre de blastèmes utilisés. Astérisques : différence significative avec un risque inférieur ou égal à 5 %.

B - MESODERME (Tableaux 18, 19 et 21 et fig. 31)

Les résultats obtenus montrent que l'effet de la dénervation sur l'évolution des cellules de régénération mésodermiques ne se manifeste significativement après 48 h. de dénervation que sur le pourcentage de cellules en mitose qui diminue d'environ 40 %, valeur proche d'ailleurs de celle obtenue précédemment (chapitre I). Par contre, après 96 h. de dénervation, toutes les classes de cellules apparaissent significativement affectées, on observe une augmentation d'environ 30 % du nombre de cellules hors cycle et du nombre de cellules en G₁ de l'ordre de 56 % (Fig. 31 et tableau 21). Les pourcentages de cellules en S, G₂ et M diminuent respectivement de 58 %, 70 % et 100 %. Lorsqu'on considère les cellules en cycle, on constate une augmentation de l'ordre de 90 % des cellules en G₁ au détriment de toutes les autres phases, (- 75 % pour S, - 72 % pour G₂, - 100 % pour M)

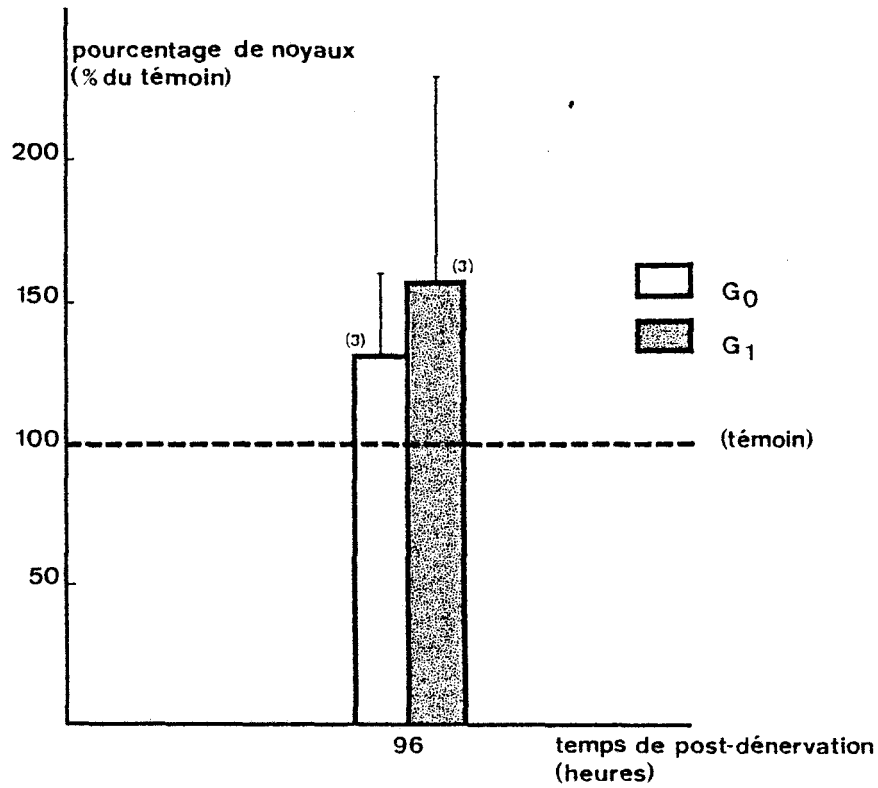


Figure 31 : Pourcentage de cellules mésodermiques dans les phases G₀ et G₁ des blastèmes dénervés par rapport aux témoins après 96^oh. de post-dénervation. Entre parenthèses : nombre de blastèmes utilisés.

T	Mésoderme	
	G ₀	G ₁
D (3)	* 49,67 ± 11,95	* 35,86 ± 16,75
Te. (3)	* 37,93 ± 4,76	* 22,97 ± 0,19
D/Te.	1,30	1,56



Tableau 21 : Pourcentage des cellules mésodermiques dans les phases G₀ et G₁ des blastèmes innervés (Te) et dénervés (D) après 96 h. de post-dénervation (T). Entre parenthèses : nombre de blastèmes utilisés. Astérisques : différence significative avec un risque inférieur ou égal à 5 %.

III - DISCUSSION

Nous considérons d'abord l'évolution des pourcentages de cellules dans les phases S, G₂, et M puis celle relative aux phases G₁ et G₀.

A - EVOLUTION DU POURCENTAGE DE CELLULES DANS LES PHASES S, G₂ ET M APRES DENERVATION (Tableau 22).

Les résultats obtenus par analyse d'images montrent que les pourcentages de cellules dans les phases S, G₂ et M diminuent significativement dans les deux tissus du blastème de régénération après dénervation et confirment donc ceux obtenus dans le premier chapitre.

Pour l'épiderme, nous avons constaté après 96 h. de dénervation une diminution de 71 % de l'indice de marquage bref, résultat comparable à la diminution du pourcentage de cellules en S (73 %) observé après analyse d'images. Par contre, la diminution de l'indice mitotique apparaît plus importante par analyse d'images (100 %) que par la méthode classique de décompte des mitoses sur coupes (61 %) ; toutefois, cette différence ne peut être considérée comme significative compte-tenu du nombre de cellules décomptées dans chacune des deux méthodes (1000 pour l'analyse d'images, 10000 pour la méthode classique) en égard à la faible valeur de cet indice (de l'ordre de 0,30 % après 96 h. de dénervation).

Pour le mésoderme, nous avons observé les mêmes corrélations entre les résultats de l'analyse d'images et ceux obtenus précédemment. Ainsi la diminution de l'indice de marquage bref et le pourcentage des cellules en S sont de l'ordre de 55 % dans les deux cas ; comme pour l'épiderme, nous avons aussi observé une distortion entre la diminution de l'indice mitotique mesuré par microscopie 73% et par analyse d'images (100%) vraisemblablement pour les mêmes raisons que celles citées ci-dessus.

B - EVOLUTION DU POURCENTAGE DE CELLULES DANS LES PHASES G_1 et G_0 APRES DENERVATION (Tableau 22).

La cytophotométrie (chapitre II) avait montré, après dénervation une accumulation de cellules mésodermiques dans la phase du cycle dont la teneur en DNA est égale à $2C (G_0 + G_1)$; ce résultat est confirmé par l'analyse d'images qui montre une augmentation du pourcentage de cellules correspondant aux phases $(G_0 + G_1)$ de l'ordre de 40 % après 96 h. de dénervation (86 % chez les dénervés, 61 % chez les témoins). Une évolution semblable, bien que moins importante existe aussi dans l'épiderme, tissu dans lequel on observe une augmentation du pourcentage de cellules $(G_0 + G_1)$ de l'ordre de 10 % (94 % chez les dénervés, 85 % chez les témoins).

	Epiderme		Mésoderme	
	Méthodes Classiques	Analyse d'images	Méthodes Classiques	Analyse d'images
S	- 71	- 73 (- 68)	- 54	- 58 (- 75)
G_2	-	- 74 (- 67)	-	- 70 (- 72)
M	- 61	- 100 (-100)	- 73	- 100 (- 100)
$(G_0 + G_1)$	-	+ 10	+ 60	+ 40
$(G_1 + G_{01})$	-	+ 66 (+ 31)	-	+ 56 (+ 90)
$(G_0 + G_{01})^*$	+ 40	-	+ 15	-
G_0	-	- 20	-	+ 30

Tableau 22 : Evolution du pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire après 96 h. de dénervation d'après les méthodes classiques (chapitre I, II et III) et l'analyse d'images (chapitre IV). Les pourcentages sont indiqués par rapport à l'ensemble des cellules. Entre parenthèses : pourcentage par rapport aux cellules en cycle. Les tirets indiquent que les mesures ne sont pas réalisables (sauf pour $(G_0 + G_1)$ de l'épiderme). Astérisque : pourcentages obtenus après 144 h. de dénervation.

Cependant, l'analyse d'images permet de préciser cette évolution puisqu'elle rend possible la distinction entre les phases G_0 et G_1 . Nous avons donc pu constater une augmentation du pourcentage de cellules en G_1 à la fois pour le mésoderme (+ 56 %) et l'épiderme (+ 66 %) ; ces résultats démontrent donc que la dénervation provoque un allongement de la phase G_1 et valident ainsi l'interprétation que nous avons proposée après marquage continu (chapitre III). D'autre part, l'analyse d'images confirme l'augmentation du pourcentage de cellules hors cycle que nous avons constaté après marquage continu pour le mésoderme (+ 15 % par cette méthode, + 30 % de G_0 par l'analyse d'images) ; par contre, les résultats obtenus par ces deux méthodes pour l'épiderme sont contradictoires puisque le marquage continu indiquait une augmentation du pourcentage de cellules hors cycle par marquage continu de l'ordre de 40 % alors que l'analyse d'images montre une diminution de l'ordre de 20 % du pourcentage de G_0 .

L'ensemble de ces résultats montrent deux faits essentiels, l'augmentation du pourcentage de cellules en G_1 au détriment des autres phases du cycle et dans une moindre mesure une augmentation du pourcentage de cellules en G_0 . Toutefois, l'augmentation du pourcentage de cellules en G_1 de l'épiderme (+ 31 %) apparaît moins importante que celle concernant le mésoderme (+ 90 %). Il convient sur ce point de signaler que l'épiderme contient, dans des conditions normales d'innervation, jusqu'à 70 % de cellules en G_1 dont une partie d'ailleurs doit se trouver en G_{01} puisque l'analyse d'images ne différencie pas G_1 de G_{01} (il rassemble ces deux classes en une seule, qualifiée de G_1 dans notre exposé) ; comme dans les mêmes conditions le mésoderme ne contient au plus que 47 % de cellules en G_1 on conçoit aisément que l'effet de la dénervation, sous la forme d'un allongement de G_1 , semblera affecter préférentiellement ce tissu.

L'allongement de la phase G_1 peut être le prélude à la différenciation cellulaire compte-tenu du caractère progressif du cycle cellulaire (Fig. 32) (BISCONTE, 1979) ; en effet, les phénomènes nucléaires qui se produisent au cours du cycle cellulaire peuvent être résumés de la façon suivante : au terme d'une mitose deux noyaux diploïdes s'individualisent et entre en phase G_1 . Au début de la phase G_1 , la chromatine se décondense progressivement (BRUGAL et CHASSERY, 1977 ; GIROUD, 1982) jusqu'au moment où la cellule choisit

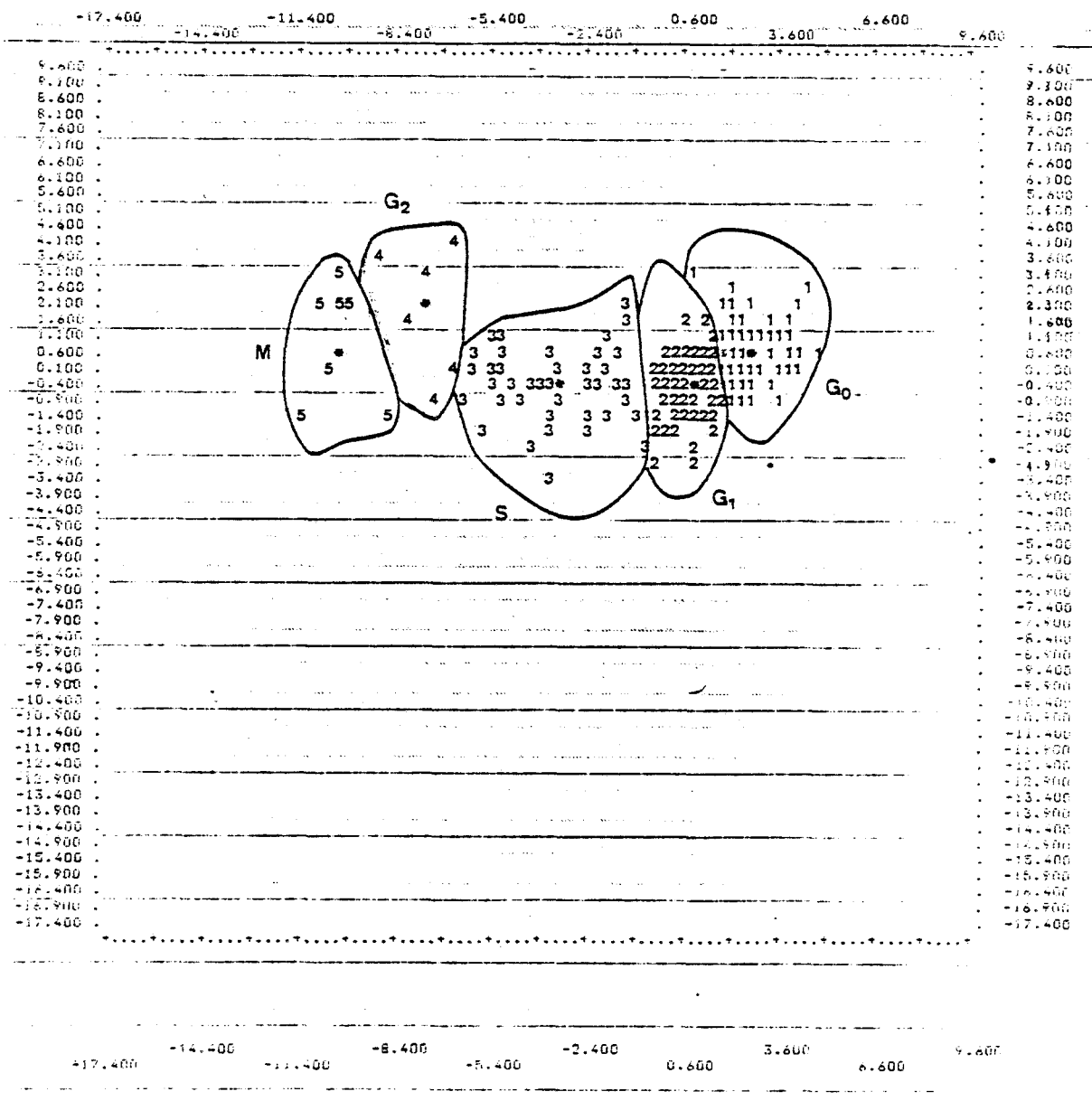


Figure 32 : Représentation canonique sur le plan factoriel des points correspondants aux cellules dans les 5 phases du cycle cellulaire. Les différentes phases présentent une disposition les unes par rapport aux autres qui reflète remarquablement le caractère progressif du cycle cellulaire.



de rester dans le cycle ou d'en sortir.

Lorsque la cellule choisit de demeurer dans le cycle, elle poursuit sa phase G_1 ; on observe alors une augmentation de la condensation de la chromatine (NICOLINI et coll., 1977). A la fin de la phase G_1 , la synthèse de DNA commence ; la cellule entre en phase S, la chromatine se décondense et se disperse à l'intérieur du noyau pendant que se déroule la duplication de DNA (PEDERSON et ROBBINS, 1972). Cette homogénéisation du contenu nucléaire se poursuit jusqu'au moment où l'état tétraploïde étant atteint, la chromatine se condense à nouveau (NICOLINI et coll., 1977) ; les cellules entrent en phase G_2 qui prend fin avec la prophase de la mitose inclusivement.

Par la suite, les chromosomes s'individualisent et le cycle cellulaires s'achève par une télophase, conduisant ainsi à deux cellules diploïdes en phase G_1 .

Lorsque la cellule choisit de sortir du cycle, on considère qu'elle entre dans la phase G_0 (PATT et QUASTLER, 1963) ; la chromatine continue alors à se décondenser (BRUGAL et CHASSERY, 1977). C'est, en effet, pendant la phase G_0 que sont synthétisées les protéines structurales et fonctionnelles spécifiques de chaque type cellulaire (différenciation).

L'allongement de G_1 doit être considéré comme distinct de la sortie de cycle (SMETS, 1973 ; BASERGA, 1973 ; YANISHEVSKY et STEIN, 1981) même si on peut le considérer comme le prélude de cette dernière ; il constitue le principal effet de la dénervation : à ce titre le facteur nerveux apparaît comme un facteur de régulation du cycle cellulaire (MADEN, 1979 ; ROTHSTEIN, 1982).

L'effet de la dénervation sur la sortie de cycle, si elle est incontestable, au moins pour le mésoderme, n'en est pas moins limitée (augmentation de 15 à 30 % pour ce tissu après 96 h. de dénervation. tableau 22). Pour l'épiderme la situation apparaît plus complexe (tableau 22) ; en effet, nous avons constaté après 96 h. de dénervation une augmentation de 40 % des cellules hors cycle par la méthode du marquage continu, méthode qui permet de décompter sans distinction les cellules en G_1 et en G_{01} ; par contre, l'analyse d'images indique une diminution de 15 % des seules G_0 après 96 h. de dénervation. Sans doute ce dernier résultat s'explique par l'augmentation importante du pourcentage de cellules en G_0 du témoin auquel on se réfère (33 % à 48 h., 54 % à 96 h.) alors que pour le mésoderme les pourcentages de cellules en G_0 du

témoin varient peu dans les mêmes conditions (41 % à 48 %, 43 % à 96 h.). Cette évolution rapide de l'épiderme du témoin ne permet donc pas d'apprécier avec précision l'effet de la dénervation sur la sortie de cycle des cellules épidermiques .

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'ensemble des résultats obtenus à la fois par les méthodes classiques d'analyse du cycle et par l'analyse des images nucléaires montrent que l'arrêt de la régénération après dénervation au stade cône résulte essentiellement d'un allongement de la phase G_1 et dans une moindre mesure d'une accélération de la sortie de cycle des cellules de régénération.

Ces résultats infirment donc l'hypothèse de TASSAVA (1974, 1975 et 1978) relative à un blocage des cellules en G_2 et corroborent tout en la complétant celle de MADEN (1978, 1979) ; d'autre part, ils montrent que les deux tissus du blastème subissent la dénervation de la même façon bien qu'à un degré moindre pour l'épiderme ; enfin ils mettent en évidence le fait que la culture *in vitro* de blastème associé ou non à des ganglions nerveux constituent un système efficace d'étude du rôle du système nerveux dans la régénération.

Il conviendra désormais par l'étude de l'influence de la dénervation sur une durée supérieure à 4 jours de préciser les relations entre l'allongement de la phase G_1 et la sortie du cycle ; enfin, il importera de préciser la destinée des cellules hors cycle tant chez les témoins (différenciation) que chez les dénervés (différenciation et/ou résorption).

RÉSUMÉ

L'influence de la dénervation sur l'évolution des cellules régénératrices de blastèmes de membres dénervés a été étudiée chez l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltlii* M. à la fois *in vivo* et *in vitro* et sur les deux tissus composant le blastème, l'épiderme et le mésoderme.

Dans un premier temps, nous avons montré par la mesure de la synthèse de DNA (par scintigraphie et autoradiographie après marquage bref), de l'indice mitotique (par microscopie), du pourcentage de cellules dont la teneur en DNA est égale à 2C ou comprise entre 3C et 4C (par cytophotométrie d'absorption) qu'après dénervation les cellules de régénération ne sont pas bloquées en G₂, mais qu'elles s'accumulent dans une phase du cycle cellulaire correspondant à une teneur en DNA de 2C.

Dans un deuxième temps, nous avons montré par autoradiographie après marquage continu que l'augmentation après dénervation du pourcentage de cellules ayant une teneur en DNA égale à 2C résulte essentiellement d'un allongement de la phase G₁ et dans une moindre mesure d'une accélération de la sortie de cycle (G₀) de ces cellules. Parallèlement, nous avons montré par autoradiographie à haute résolution que toutes les catégories de cellules du blastème décrites précédemment sont capables d'incorporer le précurseur.

Dans un troisième et dernier temps, nous avons déterminé le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle G₀, G₁, S, G₂, M) grâce à un analyseur d'images microscopiques (SAMBA 200 Thomson-TITN) et ce, après différents temps de dénervation. Les résultats obtenus par cette nouvelle technique confirment les résultats précédents tout en les précisant.

L'ensemble des résultats obtenus démontrent donc que chez le Pleurodèle, la dénervation du membre en cours de régénération arrête celle-ci en modifiant le cycle des cellules régénératrices par allongement de la phase G₁ et dans une moindre mesure, accélération de la sortie de cycle (G₀) de ces cellules.

SUMMARY

The influence of denervation on the cells of the regeneration blastema of the Urodele Amphibian *Pleurodeles waltlii* M. has been studied both *in vivo* and *in vitro* and on both epidermal and mesodermal cells.

Firstly, by measurements of DNA synthesis using liquid scintillation counting and autoradiographic labelling indices, by calculations of mitotic index, and by measurements of nuclear content (2C and 3C/4C) using absorption spectrophotometry, we have shown that following denervation, blastemal cells are not blocked in G₂ but accumulate in a phase of the cell cycle corresponding to a DNA content of 2C.

Secondly, we have shown by continuous label autoradiography that the increase in the percentage of cells containing a 2C DNA content following denervation results from a lengthening of the G₁ phase and, to a lesser degree, from an acceleration of the rate at which cells leave the cell cycle. High resolution autoradiography has revealed that all previously described blastemal cell types are capable of incorporating precursor.

Finally, we have used the SAMBA 200 image analyser (Thomson TITN) to determine the percentage of cells in the different phases of the cell cycle (G₀, G₁, S, G₂, and M) at different times following denervation. The results obtained with this new technique confirm the above results in a more precise fashion.

On the whole, our results show that in *Pleurodeles*, the denervation of a regenerating limb stops regeneration by modifying the cell cycle of the blastemal cells in two ways : by increasing the length of G₁ and, to a lesser extent, by accelerating the rate at which cells exit the cell cycle.

BIBLIOGRAPHIE

- BASERGA, R. (1976) - "Multiplication and division in Mammalian". Dekker.
New-York.
- BISCONTE, J.C. (1979) - Kinetic analysis of cellular populations by means of the quantitative radioautography. *Intern. Rev. Cytol.*, 57, 75-126.
- BRUGAL, G. (1976) - Etude de la prolifération cellulaire et de sa régulation chez l'embryon âgé et la jeune larve du triton *Pleurodeles waltlii* Michah. Conception et réalisation d'un système automatique d'analyse microphotométrique des populations cellulaires. *Thèse d'Etat*, Grenoble Univ.
- BRUGAL, G. et CHASSERY, J.M. (1977) - Un nouveau système d'analyse densitométrique et morphologique des préparations microscopiques. *Histochem.*, 52, 241-258.
- BRUGAL, G. ; GARBAY, C. ; GIROUD, F. et ADELH, D. (1979) - A double scanning microphotometer for image analysis : hardware, software and biomedical applications. *J. Histochem. Cytochem.*, 27, 144-152.
- BRYANT, S.V. ; FYFE, D. et SINGER, M. (1971) - The effects of denervation on the ultrastructure of young limb regenerates in the newt. *Triturus*. *Develop. Biol.*, 24, 577-595.
- BUTLER, E.G. et SCHOTTE, O.E. (1949) - Effects of delayed denervation on regenerative activity in limb of urodele larvae. *J. Exp. Zool.*, 112, 361-392.
- CARLONE, R.L. et FORET, J.E. (1979) - Stimulation of mitosis in cultured limb blastemata of the newt, *Notophthalmus viridescens*. *J. Exp. Zool.*, 210, 245-252.
- CHASSERY, J.M. (1980) - Texture analysis of biological images using a computerized scanning microphotometer SAMBA. *3rd Intern. conf. Automat. Diagn. Cytol. and cell image anal.* Munich.
- CHIBON, P. et BRUGAL, G. (1973) - Durée de disponibilité de la thymidine exogène chez la larve et le jeune du Triton *Pleurodeles waltlii* Michah. *Annales d'Embryologie et Morphogenèse*. 6, 81-92.
- CLIFFORD, F.B. ; KENNETH, C.J. et THOMAS, W.J. (1979) - Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal. Biochem.* 92, 497-500.
- DIAMOND, L.W., DENNIS, D.W., RAPPAPORT, H. (1981) - The relationship between lymphocyte nuclear morphology and cell cycle stage in lymphoid neoplasia. *A. J. Hematol.*, 11, 165-173.

- DRESDEN, M.H. (1969) - Denervation effects on newt limb regeneration : DNA, RNA and protein synthesis. *Develop. Biol.* 19, 311-320.
- DURIE, G.M. ; VAUGHT, L. ; CHEN, Y.P. ; OLSON, G.P. ; SALMON, S.E. ; BARTELS, P.H. (1978) - Discrimination between human T and B Lymphocytes and monocytes by computer analysis of digitized data from scanning microphotometry. I. Chromatin distribution pattern. *Blood*, 51, 579-589.
- EMPTOZ, H. ; TERRENOIRE, M. ; TOUNISSOUX, D. (1978) - Indetermination measure for a sequential identification process. *Proc. 4th. Intern. Conf. pattern recogn.* 262-264.
- FEULGEN, R. et ROSSENBECK, H. (1924) - Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure von Typers der Thymonucleinsäure und die Dachauf Beruhende elektive Färbung von Zellkernen in Mikroskopischem Präparaten. *Z. Physiol. Chem.*, 135, 203-248.
- GERAUDIE, J. et SINGER, M. (1978) - Nerve dependent macromolecular synthesis in the epidermis and blastema of the adult newt regenerate. *J. Exp. Zool.*, 203, 455-460.
- GIROUD, F. (1982) - Cell nucleus pattern analysis : Geometric and densitometric featuring. Automatic cell phase identification. *Biol. Cell*, 44, 177-188.
- GLOBUS, M. et VETHAMANY-GLOBUS, S. (1977) - Transfilter mitogenic effect of dorsal root ganglia on cultured regeneration blastemata in the newt, *Notaphthalmus viridescens*. *J. Exp. Zool.*, 56, 316-328.
- GRILLO, R.S. (1971) - Changes in mitotic activity during limb regeneration in *Triturus*. *Oncology*, 25, 347-355.
- HOWARD, A. et PELC, S.R. (1953) - Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity (Supplement)*, 6, 261-273.
- JABAILY, J. et SINGER, M. (1977) - Neurotrophic stimulation of DNA synthesis in the regenerating forelimb of the newt, *Triturus*. *J. Exp. Zool.* 199, 251-256.
- JOHNSTON, D.A. ; WHITE, R.A. et BARLOGIE, B. (1978) - Automatic processing and interpretation of DNA distributions : comparison of several techniques. *Comp. Biom. Res.*, 11, 393-404.

- KENDALL, F.M. ; WU, C.T. ; GIARETTI, W. et NICOLINI, C.A. (1977) - Multiparameter geometric and densitometric analyses of the G₀-G₁ transition of VY 138 cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 25, 724-729.
- LASSALLE, B. (1983) - DNA synthesis and cellular proliferation in cultured newt blastemas. *Limb Development and Regeneration*. Part. A, 547-555.
- LOWRY, O.H. ; ROSEBROUGH, N.J. ; FARR, A.L. et RANDALL, R.J. (1951) - Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
- LOYD, R.M. et CONNELLY, T.G. (1981) - Microdensitometric analysis of denervation effects on newt limb blastema cells. *Experientia*, 37, 967-969.
- MADEN, M. (1976) - Blastemal kinetics and pattern formation during amphibian limb regeneration. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 36, 561-574.
- MADEN, M. (1978) - Neurotrophic control of the cell cycle during amphibian limb regeneration. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 48, 169-175.
- MADEN, M. (1979) - Neurotrophic and X-ray blocks in the blastemal cell cycle. *Embryol. Morphol.* 50, 169-173.
- MARKWELL, M.A.K. ; HASS, S.M. ; BIEBER, L. et TOLBERT, N.E. (1978) - A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membranes and lipoprotein samples. *An. Biochem.* 87, 206-210.
- Mc CULLOUGH, W.D. et TASSAVA, R.A. (1976) - Determination of the blastema cell cycle in regenerating limbs of the larval axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *The Ohio J. of Science*, 76, 63-65.
- MENDELSON, M.L. (1958) - The two-wavelength method of microspectrophotometry. II. A set of tables to facilitate the calculations. *J. Biophysic and Biochem. Cytol.*, 4, 415-424.
- MESCHER, A.L. et TASSAVA, R.A. (1975) - Denervation effects on DNA replication and mitosis during the initiation of limb regeneration in adult newts. *Develop. Biol.*, 44, 187-197.
- MOUSTAFA, Y. et BRUGAL, G. (1983) - Image analysis of cell proliferation and differentiation in the thymus of the newt *Pleurodeles waltlii* Michah by SAMBA 200 cell image processor. *Sous presse*.

- NICOLINI, C.A. ; KENDALL, F. ; GIARETTI, W. (1977) - Objective identification of cell cycle phases and subphases by automated image analysis. *J. Biophys.* 19, 163-176.
- PATAU, K. (1952) - Absorption microspectrophotometry of irregular shaped objects. *Chromosoma.* 5, 341-362.
- PATT, H.M. et QUASTLER, H. (1963) - Radiations effects on cell renewal and related systems. *Physiol. Rev.* 43, 357-396.
- PEDERSON, T. et ROBBINS, E. (1972) - Chromatin structure and the cell division cycle actinomycin binding in synchronized Hela cells. *J. Cell Biol.*, 55, 322-327.
- PRESSMAN, N.J. (1976) - Markovian analysis of cervical cell images. *J. Histochem. Cytochem.* 24, 138-144.
- QUASTLER, H. et SHERMAN, F.G. (1959) - Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exptl. Cell Res.* 17, 420-438.
- REYNOLDS, E.S. (1963) - The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-212.
- ROTHSTEIN, H. (1982) - Regulation of the cell cycle by somatomedins. *Intern. Rev. Cytol.* 78, 127-232.
- ROTIROTI, J.L. et OKADA, S.A. (1973) - Mathematical model of the cell cycle of L 5178 Y. *Cell Tissue Kinet.*, 6, 111-124.
- RZEHA, K. et SINGER, M. (1966) - Limb regeneration and nerve fiber number in *Rana sylvatica* and *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.*, 162, 15-22.
- SAWICKI, W. ; ROWINSKI, J. et SWENSON, R. (1974) - Change of chromatin morphology during the cell cycle detected by means of automated image analysis. *J. Cell Physiol.*, 84, 423-428.
- SCHOTTE, O.E. (1926) - Système nerveux et régénération chez le Triton, action globale des nerfs. *Rev. Suisse Zool.* 33, 1-211.
- SCHOTTE, O.E. et BUTLER, E.G. (1941) - Morphological effects of denervation and amputation of limbs in Urodele larvae. *J. Exp. Zool.* 87, 279-321.
- SINGER, M. (1952) - The influence of the nerve in regeneration of the amphibian extremity. *Q. Rev. Biol.* 27, 169-200.

- SINGER, M. (1974) - Neurotrophic control of limb regeneration in the newt. In Daniel B. Drachman (ed.), *Trophic functions of the neuron. Ann. N. Y. Acad. Sci.* 228, 308-322.
- SINGER, M. (1978) - On the nature of the neurotrophic phenomenon in urodele limb regeneration. *Amer. Zool.* 18, 829-841.
- SINGER, M. et CRAVEN L. (1948) - The growth and morphogenesis of the regenerating forelimb of adult *Triturus* following denervation at various stages of development. *J. Exp. Zool.* 108, 279-308.
- SINGER, M. et CASTON, J.D. (1972) - Neurotrophic dependance of macromolecular synthesis in the early limb regenerate of the newt, *Triturus*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 28, 1-11.
- SMETS, L.A. (1973) - Activation of nuclear chromatin and the release from contact-inhibition of 3 T 3 cells. *Exp. Cell Res.*, 79, 239.
- TERRENOIRE, M. et TOUNISSOUX, D. (1979) - Processus non arborescent pour la reconnaissance d'une variable continue. *2ème congrès AFCET-IRIA Reconnaissance des formes et intelligence artificielle*. Toulouse, T₂, 410-417.
- TASSAVA, R.A. ; BENNETT, L.L. et ZITNICK, G.D. (1974) - DNA synthesis without mitosis in amputated denervated forelimbs of larval Axolotls. *J. Exp. Zool.*, 190, 111-116.
- TASSAVA, R.A. et MESCHER, A.L. (1975) - The roles of injury, nerves and the wound epidermis during the initiation of amphibian limb regeneration. *Differentiation* 4, 23-24.
- TASSAVA, R.A. ; Mc CULLOUGH, W.D. (1978) - Neural control of cell cycle events in regenerating Salamander limbs. *Amer. Zool.*, 18, 843-854.
- TASSAVA, R.A. ; TREELE, D.P. ; OLSEN, C.P. (1983) - Effects of partial denervation on the newt blastema cell cycle. *Limb Development and regeneration*. Part. A, 537-545.
- TODD, T.J. (1823) - On the process of reproduction of the members of the aquatic salamander. *Quart. J. Sci.*, 16, 84-96.

- VETHAMANY-GLOBUS, S. ; GLOBUS, M. et TOMLINSON, B. (1978) - Neural and hormonal stimulation of DNA and protein synthesis in cultured regeneration blastemata, in the newt, *Notophthalmus viridescens*. *Develop. Biol.*, 65, 183-192.
- WALLACE, H. (1981) - Vertebrate limb regeneration. Ed. John Wiley and sons Ltd.
- WALLACE, H. et MADEN M. (1976) - The cell cycle during amphibian limb regeneration. *J. Cell. Sci.* 20, 539-547.
- WEISS, P. (1925) - Unabhängigkeit der extremitätenregeneration vom skelet (bei *Triton cristatus*). *Arch. F. mikroskop Anat. U. Entwicklungsmech.* 104, 359.
- YANISHEYSKY, R.M. et STEIN, G.H. (1981) - Regulation of the cell cycle in Eukaryotic cells. *Intern. Rev. Cytol.* 69, 223-260.

Planche I : Stades de la régénération du membre antérieur de Pleurodeles waltlii.

Les blastèmes de régénération sont formés de deux tissus, le mésoderme et l'épiderme qui le recouvre ; la limite entre le régénérat et la souche est soulignée par les barres obliques.

Figure a : Stade cône précoce, coupe longitudinale. Ce stade est caractérisé par une accumulation des cellules mésodermiques sous un épiderme épais. Nos expériences de dénervation sont effectuées sur ce stade (X 150).

Figure b : Stade cône moyen, coupe longitudinale. (X 150).

Figure c : Stade cône avancé, coupe longitudinale. La taille du régénérat a augmenté. (X 150).

Figure d : Stade palette, coupe longitudinale. Le régénérat s'aplatit dorso-ventralement ; les cellules qui vont donner naissance au squelette sont mises en place. Ce stade précède la formation des doigts. (X 150).



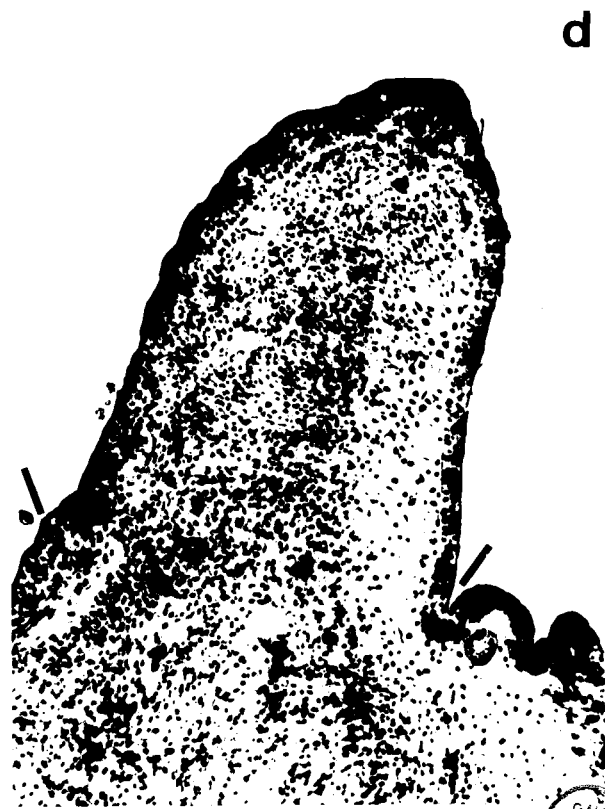
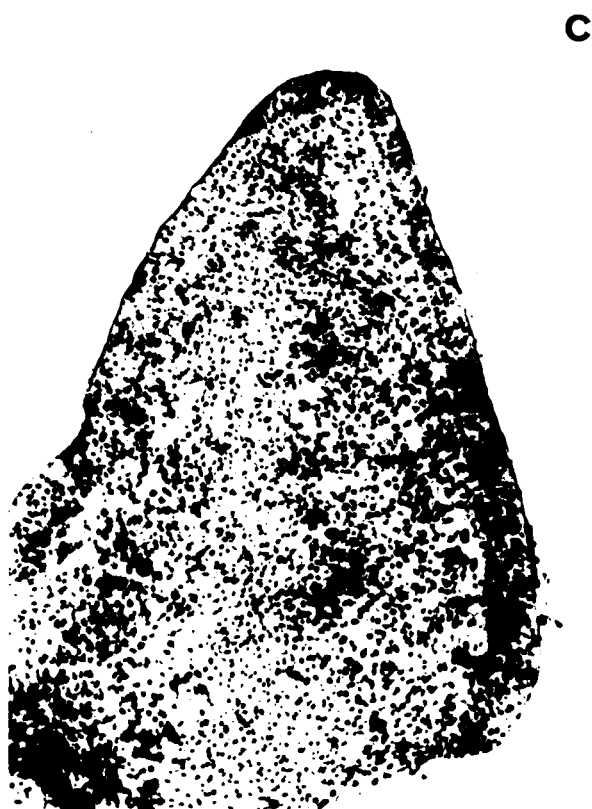


Planche II : Autoradiographie après marquage bref par la thymidine ^3H in vivo.

Figure a : Blastème innervé au stade cône, après marquage bref (coupe longitudinale). (X 300).

Figure b : Blastème dénervé au stade cône, après marquage bref (coupe longitudinale). (X 300).

Figure c : Agrandissement de la figure a. Les flèches indiquent les cellules marquées. (X 1200).

Figure b : Agrandissement de la figure b. Les flèches indiquent les cellules marquées. (X 1200).

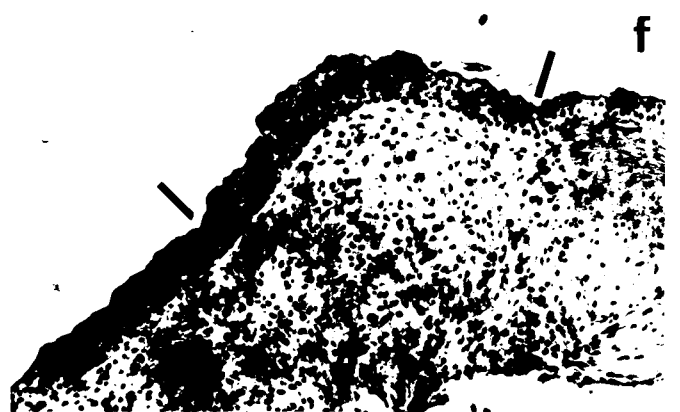
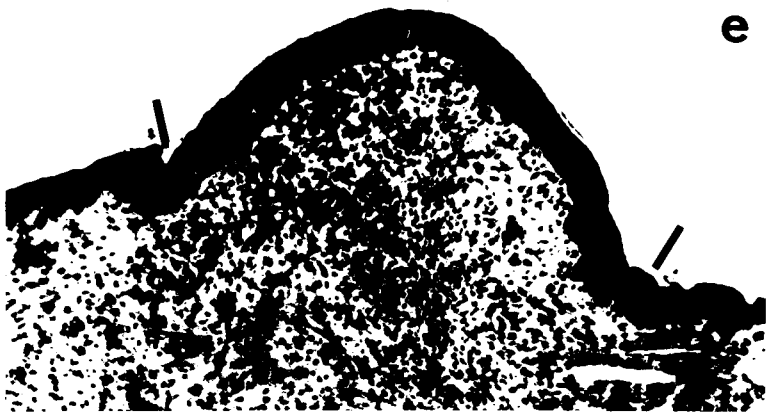
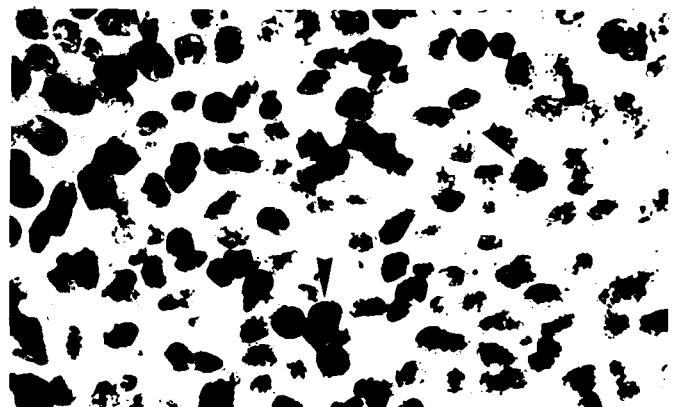
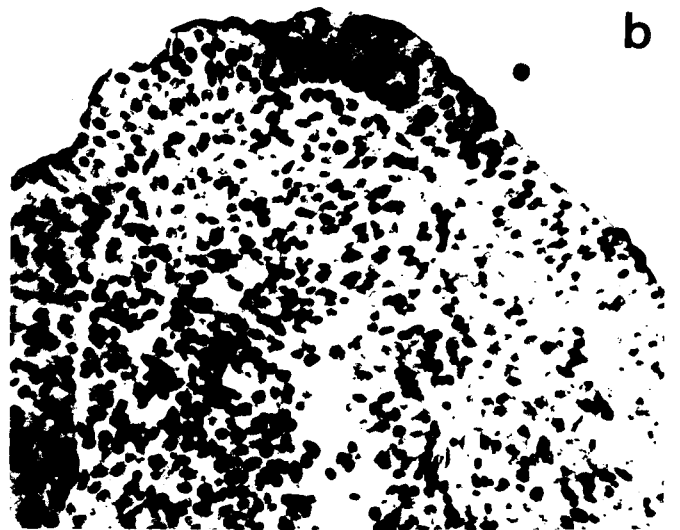
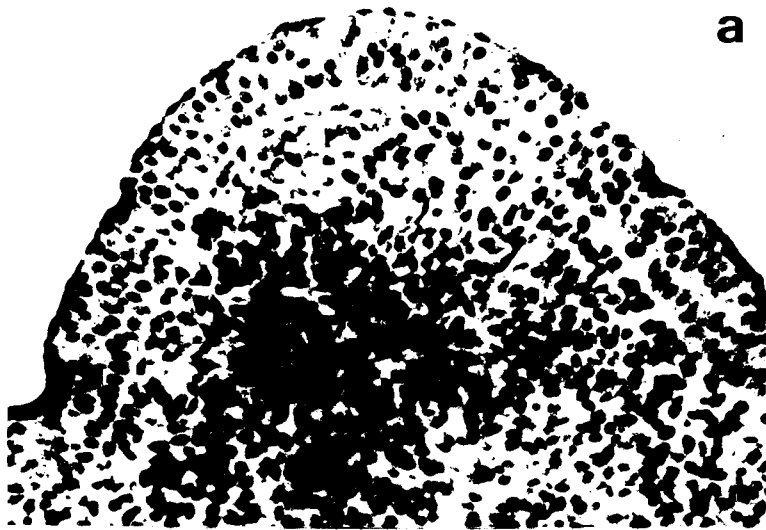
Blastème au stade cône en présence ou en absence de tissus nerveux.

Figure e : Blastème innervé au stade cône (coupe longitudinale) in vivo. Les barres obliques marquent les limites entre la souche et le régénérat. (X 150).

Figure f : Blastème dénervé au stade cône pendant 4 jours, in vivo. Les barres obliques indiquent les limites entre la souche et le régénérat. Remarquer la diminution de taille de ce régénérat en l'absence de tissu nerveux. (Coupe longitudinale). (X 150).

Figure g : Blastème au stade cône explanté et cultivé in vitro (pendant 4 jours) en présence d'un ganglion nerveux (gl). (Coupe longitudinale). (X 150).

Figure h : Blastème au stade cône explanté et cultivé seul pendant 4 jours (Coupe longitudinale). (X 150).



HUS
LILLE

Planche III : Autoradiographie après marquage continu par la thymidine ^3H .

In vivo.

Figure a : Blastème innervé parvenu au stade palette, après un marquage continu de 4 jours. Le marquage a été effectué alors que le blastème était encore au stade cône. (Coupe longitudinale). (X 150).

Figure b : Blastème dénervé au stade cône depuis 8 jours, après un marquage pendant les 4 derniers jours. (Coupe longitudinale). (X 300).

Figure c : Agrandissement de la figure a. Remarquer que la presque totalité des cellules ont incorporé le précurseur radioactif. (Coupe longitudinale). (X 750).

Figure d : Agrandissement de la figure b. Remarquer que la presque totalité des cellules ont incorporé le précurseur radioactif. (Coupe longitudinale). (X 1200).

In vitro.

Figure e : Blastème explanté au stade cône et cultivé in vitro en présence d'un ganglion nerveux pendant 4 jours. Un marquage continu a été effectué pendant les 2 derniers jours de culture. (Coupe longitudinal) ; F : filtre, gl : ganglion nerveux. (X 150)

Figure f : Blastème au stade cône cultivé seul in vitro pendant 4 jours après un marquage continu de 2 jours. (Coupe longitudinale). (X 150).

Figure g : Agrandissement de la figure e. La presque totalité des cellules épidermiques (E) et mésodermiques (M) sont marquées. (X 1200).

Figure h : Agrandissement de la figure f., de nombreuses cellules épidermiques (E) et mésodermiques (M) sont marquées. (X 1200).



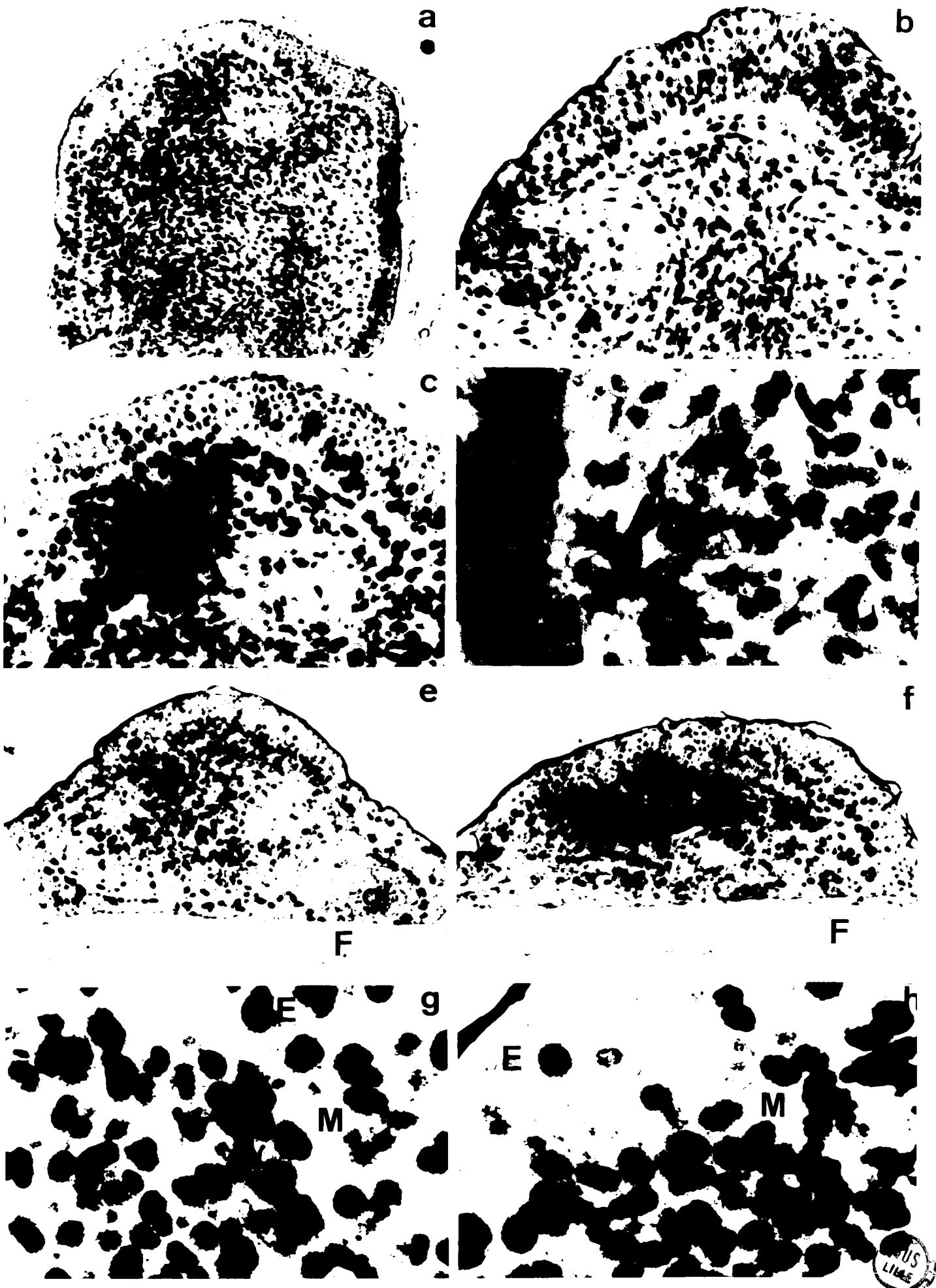


Planche IV : Autoradiographie après marquage continu par la thymidine ^3H in vivo.

Coupes semi-fines

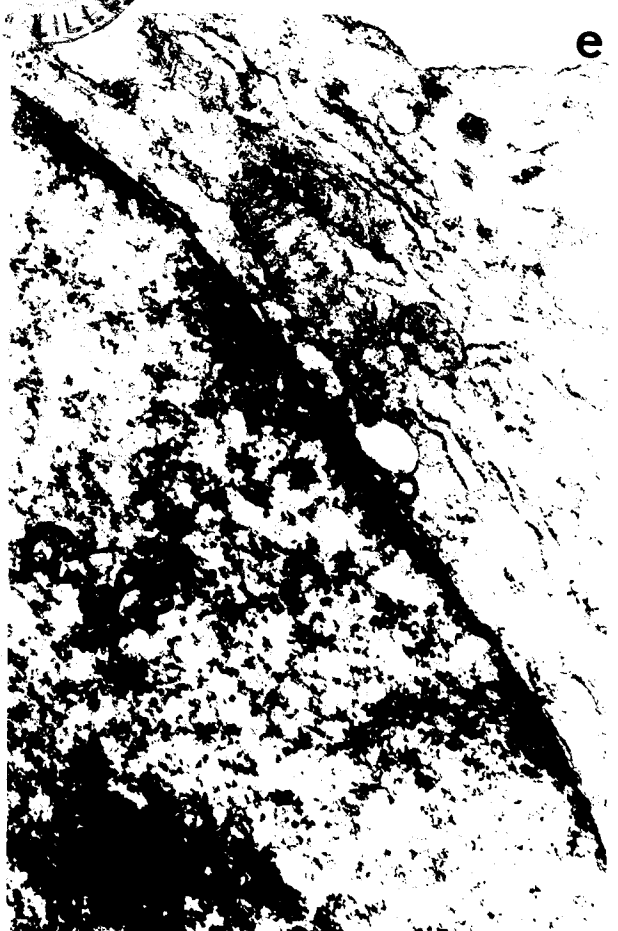
Figure a : Blastème innervé au stade cône, après un marquage continu de 4 jours les cellules épidermiques (E) et mésodermiques (M) sont marquées (Coupe longitudinale). (X 3000).

Figure b : Blastème dénervé au stade cône depuis 8 jours, après un marquage pendant les 4 derniers jours. Remarquez le marquage des cellules mésodermiques pâles (1 flèche) et communes (2 flèches) et l'absence de marquage sur certaines cellules ayant les mêmes caractéristiques. (X 3000).

Haute résolution

Figure c : Cellule mésodermique commune non marquée d'un blastème dénervé pendant 8 jours après un marquage pendant les 4 derniers jours (X 15000).

Figure d et c : Cellules mésodermiques communes marquées d'un blastème dénervé pendant 8 jours, après un marquage pendant les 4 derniers jours (X 30000).



OUDKHIR Mustapha

**INFLUENCE DE LA DÉNERVATION SUR
L'ÉVOLUTION DES CELLULES RÉGÉNÉRATRICES
DU MEMBRE D'UN AMPHIBIEN URODÈLE,
PLEURODELES WALTLII MICHAH**

THÈSE, 3^e Cycle Biologie et Physiologie animale,
LILLE 1983, N° 1065

Cadre de classement :

Mots-clefs : Régénération, dénerivation, Amphibia,
cycle cellulaire, analyse image.

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

L'influence de la dénerivation sur l'évolution des cellules régénératrices de blastèmes de membres dénervés a été étudiée chez l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltlii* M. à la fois *in vivo* et *in vitro* et sur les deux tissus composant le blastème, l'épiderme et le mésoderme. Nous avons mesuré à différents temps de dénerivation la synthèse de DNA (par scintigraphie et autoradiographie après marquage bref), l'indice mitotique (par microscopie), le pourcentage de cellules dont la teneur en DNA est égale à 2C, comprise entre 3C et 4C (par cytophotométrie d'absorption), le pourcentage de cellules hors cycle (G_0) (par autoradiographie après marquage continu) et enfin le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle (G_0 , G_1 , S, G_2 , M) (par analyseur d'images microscopiques Samba 200 Thomson TITN).

L'ensemble des résultats obtenus montre que l'arrêt de la régénération après dénerivation résulte d'une modification du cycle des cellules régénératrices par allongement de la phase G_1 et dans une moindre mesure d'une accélération de la sortie de cycle (G_0) de ces cellules.

JURY

Président : Monsieur A. CAPURON
Rapporteur : Monsieur B. BOILLY
Examineurs : Monsieur P. CHIBON
Madame M. COLLYN D'HOOGHE
Monsieur E. LHEUREUX