

50376  
1986  
207

N° d'ordre 53

50376  
1986  
207

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE  
FLANDRES ARTOIS

**THÈSE DE DOCTORAT  
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**

Présentée par :

**Bernard BAUDUIN**



**INFLUENCE NEUROTROPE  
DES BLASTEMES DE REGENERATION  
DE MEMBRE ANTERIEUR  
SUR LA MOELLE EPINIERE DU TRITON  
*PLEURODELES WALTLII*  
ETUDE *IN VITRO***



Soutenu le 22 Octobre 1986 devant la commission d'examen

Président :	M <sup>me</sup> A.M. DUPRAT
Rapporteurs :	MM R. SAXOD - C. HENDERSON
Directeur de travail :	M. B. LASSALLE
Examineur :	M. B. BOILLY



DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. 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, COR-  
DONNIER, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN,  
GLACET, GONTIER, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG,  
LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU,  
ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

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

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

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE

M. J. CORTOIS:

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
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. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences Economiques
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. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

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. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CAYATTE Jean-Louis	Sciences économiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiology
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean-Jacques	Biologie
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences économiques
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
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. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographique
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GREGORY Pierre	I.P.A.
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. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne

M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
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. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.P.A.)
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKÉ Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MONTEL Marc	Physique du solide
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PASZKOWSKI Stéphan	Analyse numérique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislav	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROBINET Jean-Claude	E.U.D.I.L.
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
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. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
Mme ZINN Justin Nicole	Algèbre

## **Avant propos**

*Ce travail a été réalisé au laboratoire de morphogénèse animale de Lille (CNRS U.A.. 685) sous la direction de B. Lassalle.*

*Que Monsieur le Dr B. Lassalle trouve ici le témoignage de ma gratitude pour la confiance qu'il m'a témoigné en acceptant d'être mon directeur de recherche Sa haute compétence scientifique, son enthousiasme pour les techniques nouvelles ,sa constante disponibilité et ses capacités humaines exceptionnelles furent une aide précieuse et une stimulation dans la réalisation de ce travail.*

*Je remercie vivement Messieurs les professeurs B. Boilly et R. Saxod de leurs accueils et de leurs conseils qu'ils m'ont donnés durant mon passage dans leurs laboratoires ainsi que le Dr G. Tramu ( INSERM 156 de Lille ) pour l' aide qu'il nous a apportée dans la réalisation du travail d'immunocytochimie, le Dr F. Bernet (laboratoire de physiologie animale de Lille) pour l'utilisation, dans son laboratoire, de l'HPLC et le Dr J.C. Jeanny (INSERM 118 de Paris) pour nous avoir procuré des boîtes de Pétri couvertes de Laminine.*

*Je remercie également Mmes Auger et Lyoen, Melles Bessau et Rousseau ainsi que M. Chuin pour l'aide technique qu'ils nous ont apportée dans la réalisation de ce travail.*

## **SOMMAIRE**

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	p. 1
<b>METHODOLOGIE</b> .....	p. 8
<b>CHAPITRE I</b> .....	p. 10
<b>Techniques</b> .....	p. 10
1°) Obtention des explants .....	p. 10
2°) Stérilisation des explant .....	p. 11
3°) Milieu et conditions de culture .....	p. 11
4°) Expression des résultats .....	p. 13
5°) Microscopie photonique .....	p. 13
<b>Résultats</b> .....	p. 14
Moelle épinière cultivée seule .....	p. 14
Rôle du blastème sur la moelle épinière .....	p. 14
Influence de la masse blastémale .....	p. 18
Influence des différentes parties du blastème .....	p. 20
Influence de tissus témoins .....	p. 22
Influence de la prolifération cellulaire sur la croissance des fibres nerveuses .....	p. 24

<b>Discussion</b> .....	p. 26
<b>CHAPITRE II</b> .....	p. 31
<b>Introduction</b> .....	p. 31
<b>Méthodologie et Techniques</b> .....	p. 31
A) <u>Methodologie</u> .....	p.32
B) <u>Techniques</u> .....	p. 32
1°) <b>Mesure de la synthèse d'ADN et de protéines</b> .....	p. 32
a) Mesure de la radioactivité .....	p. 32
b) Dosage de l'ADN .....	p. 33
c) Dosage des protéines .....	p. 33
2°) <b>Activité des transmetteurs aminergiques</b> .....	p. 33
a) Dosage des catécholamines .....	p. 33
b) Détection des enzymes aminergiques par immunocytochimie .....	p. 36
3°) <b>Dosage de l'activité cholinergique</b> .....	p. 37
a) Dosage de l'activité de l'Acetyl choline transférase ...	p. 37
b) Dosage de l'activité des Acetylcholine Estérases .....	p. 39
<b>Résultats</b> .....	p. 40
<b>Synthèse de protéines</b> .....	p. 40
<b>Synthèse d'ADN</b> .....	p. 42
<b>Activité des transmetteurs aminergiques</b> .....	p. 43
a) Dosage des neurotransmetteurs .....	p. 45
b) Détection des enzymes synthétisant les monoamines .....	p. 47
<b>Activation des enzymes cholinergiques</b> .....	p. 48
<b>Discussion</b> .....	p. 50

<b>CHAPITRE III</b> .....	p.. 59
<b>Introduction</b> .....	p. 59
<b>Techniques</b> .....	p. 60
1°) Préparation du milieu conditionné .....	p. 60
2°) Préparation de l'extrait de blastème .....	p. 60
3°) Traitement enzymatique .....	p. 61
4°) Détermination du poids moléculaire .....	p. 61
a) Stérilisation des boudins à dialyse .....	p. 61
b) Dialyse du milieu conditionné .....	p. 62
<b>Résultats</b> .....	p.62
<b>Influence du milieu conditionné</b> .....	p. 62
<b>Dilution du milieu conditionné</b> .....	p. 65
<b>Effet d'un extrait de blastème</b> .....	p. 68
<b>Mode d'action du facteur neurotrope</b> .....	p. 70
1°) Effet du milieu conditionné et de la boîte conditionnée .....	p. 70
2°) Rôle du substrat .....	p. 74
<b>Nature de la substance neurotrope</b> .....	p. 77
1°) Action enzymatique .....	p. 77
2°) Thermolabilité .....	p. 79
<b>Poids moléculaire du BNTF</b> .....	p. 81
<b>Discussion</b> .....	p. 84

**CONCLUSION GENERALE** ..... p. 90

**BIBLIOGRAPHIE** ..... p. 94

## CHAPITRE I

Les Amphibiens sont les seuls Vertébrés capables de reformer la partie manquante d'un membre ayant subi une amputation. Bien que les processus de la régénération traumatique soient les mêmes dans tous les ordres d'Amphibiens, il existe cependant une différence fondamentale entre ceux-ci. En effet, les capacités régénératrices persistent toute la vie chez les Urodèles alors qu'elles disparaissent progressivement au moment de la métamorphose chez les Anoures. La régénération d'un membre se déroule en plusieurs étapes. Dès que le membre est amputé, les tissus mésodermiques exposés au milieu externe sont protégés par un caillot sanguin. Puis l'extrémité du moignon est rapidement recouverte par la migration distale de l'épiderme. En moins d'un jour chez la larve et en quelques jours chez l'adulte, la blessure est couverte par un épiderme cicatriciel transparent formé d'une seule assise de cellules. Durant cette migration, des divisions cellulaires ont lieu mais en quantité limitée. Ces divisions permettront le début de l'épaississement du nouvel épiderme apical qui sera achevé par la migration distale de cellules épidermiques provenant de la souche.

Au moment de l'amputation, des cellules mésodermiques sont localement endommagées ce qui déclenche une réaction inflammatoire au niveau du moignon. Des phagocytes s'accumulent au sommet de la souche afin d'éliminer les débris cellulaires. Ces phagocytes vont également attaquer la matrice du tissu squelettique et du tissu conjonctif. Cette désagrégation est accompagnée de la formation de liquides qui s'accumulent à l'extrémité de la souche formant un oedème à l'apex du moignon. L'érosion de la matrice libère des cellules parfaitement vivantes à l'origine des processus régénératifs.

Dès que les cellules mésodermiques s'échappent des tissus de la souche, elles perdent rapidement leurs caractéristiques et se dédifférencient. Ces cellules dédifférenciées dérivées de quelques uns ou même de tous les tissus mésenchymateux situés au niveau du site d'amputation s'accumulent à l'apex du membre, sous l'épiderme cicatriciel. Morphologiquement toutes semblables, les cellules mésenchymateuses forment un massif cellulaire appelé blastème à partir

duquel tous les tissus du régénérat seront reconstitués. La prolifération intensive des cellules blastémales se traduit sur le plan morphologique par la formation d'un petit dôme dépigmenté à l'extrémité du membre amputé. Le maintien de l'activité mitotique aboutit à la formation d'un blastème en forme de cône. Les premiers signes de la morphogenèse apparaissent lorsque ce cône s'aplatit dorso-ventralement et prend l'apparence d'une palette. La succession de ces différents aspects morphologiques du régénérat ont permis de définir les différents stades de la régénération du membre d'Amphibien (Fig.1).

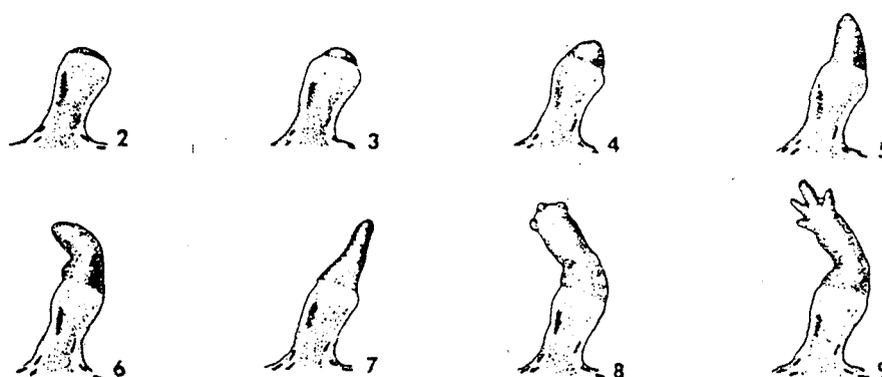


Figure 1 : Morphologie externe des régénérats en croissance, après l' amputation du membre antérieur, chez *Triturus viridescens* (selon Singer 1973).

Stade 2 : formation du blastème ; stade 3 : bourgeon précoce ;

stade 4 : bourgeon moyen; stade 5 : bourgeon conique ; stade 6 et 7 : palette ;

stade 8 : apparition des doigts; stade 9 : régénération fonctionnelle totale

Des condensations de cellules mésenchymateuses blastémales apparaissent progressivement entre les stades cône et palette. Ces condensations forment des nodules cartilagineux qui s'ossifient en fin de régénération. Finalement, la nécrose d'amas cellulaires distaux conduit à la différenciation des doigts. La morphogenèse du membre s'achève par la formation de masses musculaires et l'établissement de connections neuro-musculaires. La croissance du membre néo-formé s'arrête lorsque la taille de celui-ci est similaire à celle du membre avant amputation (Revue dans Wallace, 1981).

Les fibres nerveuses faisant synapses avec les muscles nouvellement formés ont pour origine les nerfs sectionnés lors de l'amputation. Suite à cette opération, les nerfs subissent une dégénérescence rétrograde qui se manifeste par la dégradation de la myéline. Puis les fibres nerveuses cicatrisent et migrent à l'intérieur du blastème donnant des prolongements amyéliniques. La migration nerveuse commence dès l'apparition de l'amas de cellules mésenchymateuses dédifférenciées et conduit à la formation d'un réseau de fibres établissant des contacts avec les cellules mésenchymateuses et épidermiques du régénérat. Une partie des fibres nerveuses néo-formées subira ensuite une myélinisation à la fin du stade cône (Revue dans Schmidt, 1968).

Depuis les travaux de Todd (1823), les nerfs furent suspectés d'être indispensables à la régénération du membre de Triton. La vérification de cette hypothèse s'est traduite par la réalisation d'un certain nombre de travaux qui montrèrent que la régénération se déroule en deux phases, une phase dite dépendante du système nerveux qui s'étend du moment de l'amputation au stade cône, et une phase indépendante du système nerveux qui apparaît dès le stade palette (Schotté, 1926). Si une dénervation est effectuée avant le stade palette, la régénération est bloquée et le blastème, s'il est déjà formé, régresse. Chez les larves qu'elles soient d'Anoures ou d'Urodèles, la régression intéresse même la totalité du membre. Si par contre, la dénervation est pratiquée au stade palette ou au-delà, la régénération se poursuit mais la croissance est alors fortement

ralentie et conduit à la formation d'un membre miniature.

D'autres travaux (Locatelli, 1925, Schotté, 1926) semblaient indiquer que seuls les nerfs sensitifs étaient indispensables à la régénération, les nerfs sympathiques ou moteurs étant sans influence. Cependant, une étude qualitative et quantitative approfondie de l'innervation du membre de Triton par Singer et son école à partir de 1942 permit de mieux préciser le rôle dévolu au système nerveux au cours des processus régénératifs.

Le membre des Amphibiens est innervé par les nerfs spinaux 3, 4 et 5, chacun de ces nerfs étant composé de fibres sensorielles et motrices. Un recensement de ces deux types de neurones a permis de déterminer que le nombre de fibres nerveuses sensorielles était globalement 4 fois supérieur à celui des fibres motrices (Singer, 1946). Des dénervations partielles du membre ont en outre montré l'existence d'une corrélation entre le nombre de fibres présentes au niveau d'amputation et la fréquence de la régénération des Urodèles. Si la quantité de nerfs au plan de section est supérieure à 50% du potentiel normal de l'innervation, la régénération a toujours lieu. Par contre, elle n'apparaît jamais si la quantité de nerf est inférieure à 30%. Entre ces deux valeurs extrêmes, tout accroissement du taux nerveux implique un accroissement de la fréquence de la régénération. Comme l'innervation motrice ne représente que 22% de l'innervation totale du membre (Singer, 1946), elle ne peut supporter à elle seule la régénération.

La résection des 3 ganglions spinaux brachiaux qui entraîne la suppression définitive des fibres sensorielles et la section concomitante des 3 racines ventrales motrices des nerfs rachidiens provoquent l'augmentation artificielle du nombre de fibres motrices par régénération de celles-ci sur leur ancien trajet mais aussi, après formation de collatérales, sur les trajets libérés par les fibres sensorielles dégénérées. Dans de telles conditions, les fibres motrices à elles seules permettent la régénération du membre amputé. La nature du tissu nerveux n'est donc d'aucune importance, seule intervient la quantité d'innervation.

Chez les Anoures, un seuil d'innervation a également été défini (Van Stone, 1955), seuil en dessous duquel la régénération est impossible. En fait, ce seuil chez tous les Amphibiens correspond à la surface d'axoplasme présent au niveau de l'amputation par rapport à la section transversale du membre. Cette théorie rend compte du fait que chez les têtards d'Anoures, les capacités de régénération décroissent avec l'âge (Van Stone, 1955) alors que le nombre de fibres nerveuses augmente mais comme la taille du membre augmente également, la densité d'axoplasme par unité de surface diminue entraînant la perte du pouvoir régénérateur (Peadon et Singer, 1965). Des études en microscopie électronique réalisées chez les Urodèles (Egar et Singer, 1971) ont révélé que les nerfs brachiaux sont composés de fibres myélinisées mais également de fibres amyéliniques non décelables par les colorations argentiques de microscopie photonique. Bien que les coupes ultrafines aient révélées que le nombre de fibres non myélinisées soit équivalent à celui des fibres myélinisées, les fibres amyéliniques ne contribuent cependant que pour environ 3%, compte tenu de leur faible section, à la surface totale d'axoplasme. La notion de seuil préalablement établie sur les seules observations de microscopie photonique restait valable. En outre, elle a permis d'envisager la restauration de capacités régénératrices affaiblies grâce à une hyperinnervation du membre.

Chez la Grenouille, la déviation du nerf sciatique dans le bras a pour effet d'augmenter l'innervation d'environ 50%. Après amputation d'un membre ayant reçu cette surcharge nerveuse, les premières phases de la régénération se mettent en place mais sans pour autant conduire à la reconstitution harmonieuse du membre (Singer, 1954). Les mêmes résultats ont été obtenus chez le Xénope (Koniczna-Marczynska et Skowron-Cendrzak, 1958). Chez les Urodèles, il est possible de restaurer les capacités régénératrices d'un membre dénervé en implantant dans celui-ci au niveau d'amputation un ganglion spinal (Kamrin et Singer, 1959). Ces mêmes ganglions cultivés *in vitro* en présence d'un blastème de régénération de Triton sont aussi capables de maintenir les activités de

synthèse en ADN et en protéines des régénérats à un niveau identique à celui observé sur des blastèmes normalement innervés (Globus et Vethamany-Globus, 1977; Tomlinson *et al.*, 1981; Lassalle, 1983). Ces résultats obtenus sans qu'il y ait contact entre les deux tissus co-cultivés et les observations de certains travaux réalisés *in vivo* (Jabaily et Singer, 1977) suggèrent que le système nerveux contrôle la régénération par l'intermédiaire d'un facteur diffusible émis par les axones. *In vivo*, la section du plexus brachial isole les parties distales de l'axone des corps cellulaires et au niveau de l'amputation, les cellules de Schwann et le tissu associatif entourant les fibres restent présents. Or, la régénération ne se produit pas tant que la croissance des axones en régénération ne rétablisse l'innervation normale de la souche. La substance nerveuse transportée le long de l'axone toujours de façon centrifuge, par opposition à l'influx nerveux qui dans le cas des fibres sensorielles est centripète, serait libérée par les extrémités nerveuses au niveau du plan d'amputation (Lentz, 1969).

Des homogénats de tissus nerveux de Triton supposés contenir le facteur qui promeut la régénération ont été injectés au niveau du plan d'amputation. Ils permettent de restaurer les synthèses d'ADN et de protéines préalablement affaiblies d'un membre amputé et dénervé (Singer *et al.*, 1976 ; Jabaily et Singer, 1977). Le facteur chimique hypothétique contenu dans les extraits nerveux et qui stimule les activités synthétiques et prolifératrices des cellules du régénérat a été appelé par Singer, facteur neurotrophique ou NTF. Il serait de nature polypeptidique (Singer *et al.*, 1974) et dépourvu de spécificité d'action (Choo *et al.*, 1981 ; Lentz *et al.*, 1981). Cependant, quelles que soient les substances purifiées à partir d'extraits nerveux, aucune d'entre elles ne s'est avérée capable de mimer totalement l'effet du système nerveux. Des substances issues de tissus non nerveux peuvent également agir sur la régénération. C'est le cas du Nerve Growth Factor (NGF) qui injecté dans un membre dénervé et amputé d'Axolotl permet d'augmenter la vitesse de formation des premières phases de la

régénération (Weis et Weis, 1970). Le NGF est un facteur trophique issu des cellules cibles du tissu nerveux et ayant la capacité de promouvoir la croissance des neurites et d'attirer ceux-ci vers l'organe cible (Levi-Montalcini et Angeletti, 1968). Ses effets sont restreints aux systèmes nerveux sympathique et sensoriel des individus embryonnaires ou néonates (revue dans Thoenen et Barde, 1981 ; Vinores et Guroff, 1980). Les résultats de Weis et Weis peuvent être interprétés en considérant que les injections de NGF dans le membre amputé stimulent la croissance des fibres sensorielles et sympathiques qui, comme nous l'avons vu, sont de loin les plus importantes en nombre par rapport à la totalité des fibres nerveuses du membre. La colonisation accélérée du jeune blastème par les fibres nerveuses provoquant en retour une stimulation de la prolifération des cellules mésenchymateuses blastémales expliquerait l'augmentation de la vitesse d'apparition des premières phases de la régénération, phases totalement dépendantes de la présence de tissu nerveux.

Ce travail met l'accent sur un aspect de la régénération resté jusqu'à présent pratiquement totalement ignoré à savoir le rôle exercé par le régénérat sur la croissance des fibres nerveuses. Lorsque l'on sait que le déclenchement de la régénération est conditionné en grande partie par la présence d'une quantité minimale de fibres nerveuses au niveau du régénérat (Singer, 1952), la connaissance des mécanismes qui président à la régénération des fibres nerveuses et à la colonisation du blastème par ces fibres s'avère être de toute première importance. C'est pourquoi nous nous sommes attachés à l'étude de l'influence des cellules cibles c'est à dire des cellules du blastème de régénération sur la croissance des fibres nerveuses d'Amphibien Urodèle. Ce travail a été réalisé *in vitro* sur des co-cultures de moelle épinière et de régénérat de membre antérieur de Triton *Pleurodeles*. Ce sont les résultats de cette étude que nous rapportons dans ce mémoire.

## METHODOLOGIE

Notre travail a consisté à étudier la croissance des fibres nerveuses issues d'un fragment de moelle épinière cultivé *in vitro* en présence ou non d'un blastème de régénération prélevé au stade cône. Notre attention s'est portée sur la moelle épinière d'une part, en raison des réactions cellulaires qu'elle présente à la suite de l'amputation du membre (Tweedle, 1971), traduisant les profondes modifications métaboliques consécutives à la section des nerfs périphériques et d'autre part, en raison de la localisation exclusive dans ce tissu des motoneurones que l'on sait insensibles au NGF et dont le facteur de croissance n'est pas connu. Quant au choix du stade cône comme stade de régénération du membre, il résulte des multiples avantages que présente le blastème à cette phase de sa croissance. En effet, il est très facilement identifiable sur le plan morphologique ( voir Fig.1), il correspond à une phase d'intense prolifération cellulaire dépendante du système nerveux et enfin, il présente une taille suffisante pour être cultivé aisément *in vitro*.

Dans un premier temps, nous avons précisé les caractéristiques et les modalités de la production des fibres nerveuses par la moelle épinière en présence d'un blastème de régénération. Celui-ci étant composé d'un massif mésenchymateux et d'un épithélium pluristratifié (Fig.2), nous avons apprécié les effets de l'un et l'autre de ces tissus ainsi que le rôle dévolu à la prolifération cellulaire des cellules blastémales. Ce dernier aspect a été abordé en effectuant des cultures de moelle en présence de blastème dont la prolifération était soit très active, soit ralentie ou encore bloquée. Les effets du régénérat ont été comparés à ceux obtenus avec des tissus non blastémaux tel que la peau, le muscle, le foie ou l'extrémité de doigt.



Figure 2 : Coupe d' un blastème de régénération colorée au picro indigo carmin.  
M : mésenchyme ; E : épiderme

Dans un second temps, nous avons entrepris d'étudier l'influence des cellules cibles sur le métabolisme du tissu nerveux notamment sur les synthèses de protéines, d'ADN et de neurotransmetteurs. L'activité des enzymes des chaînes métaboliques des neurotransmetteurs a été appréciée soit biochimiquement (enzymes cholinergiques), soit immunocytochimiquement (enzymes catécholaminergiques).

Enfin dans un troisième temps, l'emploi de milieu conditionné par un blastème ou d'extrait de blastème nous a conduit à rechercher l'existence d'un facteur neurotrophe blastémal diffusible et d'en préciser quelques caractéristiques biochimiques.

## CHAPITRE I

### TECHNIQUES

#### 1 - Obtention des explants

Les animaux utilisés, *Pleurodeles waltlii* Michah., proviennent d'un élevage réalisé au laboratoire. Ils sont maintenus dans de l'eau courante à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  et sont nourris deux fois par semaine de foie de boeuf ou de vers de vase.

Après anesthésie par immersion dans une solution aqueuse contenant 0,1% de tricaine méthane sulfonate (MS222, Sandoz), des animaux métamorphosés ayant 7 à 8 cm de longueur sont amputés à travers le zeugopode des membres antérieurs, près du coude. Dix jours plus tard, les blastèmes ayant atteint le stade jeune cône sont excisés. Les deux composantes tissulaires de ces blastèmes, l'épiderme et le mésenchyme peuvent être séparés mécaniquement par pelage. Pour estimer le rôle de la prolifération cellulaire des cellules blastémales, des régénérats divers ont été utilisés ; les stades cône de jeunes animaux, à forte activité mitotique, les stades cône d'animaux âgés régénérant lentement ou les stades palette (stade de différenciation) de jeunes animaux à activité mitotique réduite et enfin les cônes de jeunes animaux ayant subi une irradiation X (4000 rads, Lheureux, 1983) pour bloquer la prolifération cellulaire.

Des tissus variés en provenance de diverses régions du corps ont servi de témoins. Les muscles ont été prélevés sur des animaux du même âge au niveau des phalanges des pattes antérieures. Ceci permet d'obtenir des explants

musculaires non lésés et de volume sensiblement comparable à celui du blastème. La peau est prélevée sur la face dorsale du bras puis coupée en petits fragments de volume similaire à celui des blastèmes. Le foie est également découpé afin d'obtenir des fragments équivalents au régénérat. L'extrémité des doigts est obtenue à partir des membres antérieurs.

La moelle épinière, débarrassée des ganglions spinaux, est prélevée sur toute la longueur de l'animal soit sur des larves de Pleurodèle (2 à 6 cm de longueur) soit sur des animaux métamorphosés de 12 à 13 cm de longueur.

## **2 - Stérilisation des explants**

Les explants sont stérilisés pendant 10 mn dans une solution saline (Ringer) contenant 500 U/ml de pénicilline (Eurobio), 500 U/ml de mycostatine (Eurobio) et 500 µg/ml de streptomycine (Eurobio). Afin de parfaire la stérilisation, les explants sont maintenus pendant 1 mn dans un bain de chloramine à 0,8% (Sigma) puis sont rincés dans la solution saline stérile.

## **3 - Milieu et conditions de culture**

Le milieu de culture à base de Leibovitz L15 (Eurobio) dilué afin d'ajuster la pression osmotique à 260 mOsm, contient 1% de glucose, 300 ng/ml de glutamine (Fluka), 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 0,14 U/ml d'insuline (Choay), 6,3 ng/ml de progestérone (Fluka), 4 ng/ml d'acide sélénieux (Fluka), 8,8 µg/ml de putrescine (Fluka), 5 µg/ml de transferrine (Collaborativ Research Inc.). Les cinq derniers éléments du milieu permettent de supprimer l'utilisation de sérum et de travailler dans des conditions chimiquement définies. Le pH du milieu est amené à 7,5 par addition de soude 1M. Dans certaines expériences, le facteur de croissance nerveux NGF (Laref) est ajouté au milieu à la concentration de 10 ng/ml.

La moelle épinière stérilisée est débarrassée de ses méninges puis coupée à l'aide d'une lame de rasoir, en tranches épaisses d'environ 0,5 mm. Chaque morceau est cultivé individuellement directement sur le fond d'une boîte de Pétri stérile en matière plastique de 35 mm de diamètre (Falcon Primaria) sauf indication contraire. Dans ce dernier cas, les explants sont déposés sur des boîtes de culture (Falcon) dont le fond est recouvert soit de collagène type VII (Sigma) à la concentration de 2 mg/ml, soit de poly L lysine (Sigma) à la concentration de 100 µg/ml, soit de laminine à 2mg/ml. La stérilisation de ces substrats se fait par exposition pendant 20 mn aux rayons ultraviolets type B, puis les boîtes sont rincées par la solution saline stérile.

Afin de faciliter l'attachement de la moelle épinière, celle-ci est cultivée pendant les 8 premières heures dans un film de milieu, puis la culture se poursuit en immersion. Le milieu est renouvelé par moitié toutes les 72 heures. Les explants non nerveux sont cultivés soit directement sur le fond de la boîte soit posés sur un filtre Millipore. Ces explants sont placés dans les conditions habituelles de culture à 1 mm du tissu nerveux (Fig.3). Les cultures et co-cultures sont maintenues à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  dans une atmosphère normale saturée d'humidité.

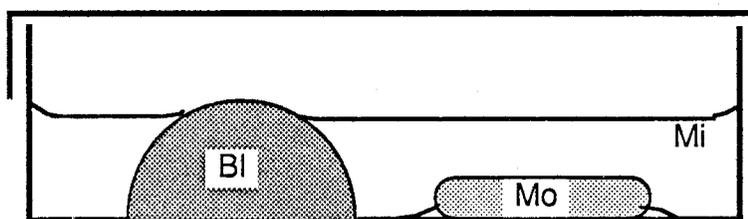


Figure 3 : Schéma représentant les conditions de culture d'un fragment de moelle épinière en présence d'un blastème de régénération de membre de Pleurodèle.

Bl : blastème ; Mo : moelle épinière ; Mi : milieu de culture

#### 4 - Expression des résultats

Le nombre et la longueur des fibres nerveuses issues de la moelle épinière explantée sont mesurés grâce à un oculaire réticulé placé sur un microscope inversé à contraste de phase (Diavert Leitz). Le nombre des fibres nerveuses est déterminé par le comptage des extrémités des prolongements nerveux abstraction faite des collatérales perpendiculaires qui peuvent s'en détacher. Les photographies sont prises soit sur le vivant soit sur des cultures fixées au formol neutre salé à 10% (FNS) pH 7,5 pendant 48 h puis traitées selon la méthode neurofibrillaire à l'urée nitrate d'argent d'Ungewitter (1951).

Les moyennes obtenues sont comparées et analysées à l'aide du test de Student. La signification des résultats est donnée au risque de 5%. Le nombre de cas pour chaque échantillon est indiqué dans les histogrammes.

#### 5 - Microscopie photonique

La moelle épinière cultivée et les blastèmes sont fixés respectivement au FNS et au Bouin Hollande sans acétate pendant 48 h. La moelle non cultivée est fixée par perfusion dans un mélange de paraformaldéhyde (2%) et de glutaraldéhyde (2%) dans un tampon cacodylate 0,1M pendant 1 h. Après rinçage et déshydratation, les pièces sont incluses dans de la paraffine. Des coupes sériées de 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont ensuite confectionnées et colorées au picro-indigo-carmin ou à l'urée nitrate d'argent.

## RESULTATS

### Moelle épinière cultivée seule

Six à huit heures après la mise en culture, les explants de moelle épinière provenant des animaux post-métamorphiques se fixent sur le fond de la boîte de culture. Dix-huit heures plus tard, des fibres nerveuses commencent à migrer sur leur support. Cette migration se poursuit pendant 48 h et à la fin de cette période, le nombre moyen de fibres nerveuses est d'environ 82 (Tableau 1). Ces prolongements nerveux présentent des longueurs sensiblement identiques soit  $251 \pm 10 \mu\text{m}$ . Leur durée de vie estimée en mesurant le temps écoulé entre l'apparition et le début de dégénérescence (vésiculation) des fibres nerveuses est en moyenne de 7,5 jours. Généralement, ces prolongement apparaissent rectilignes et n'émettent que de rares collatérales reliant les fibres entre elles (Planche 1 a). Des cellules gliales deviennent visibles sur le pourtour de l'explant après seulement 72 h de culture.

L'addition de NGF à la concentration de 10 ng/ml ne modifie pas les caractéristiques de la culture (Tableau 1).

Une moelle épinière provenant de larve de Pleurodèle mais non plus d'adultes émet un nombre de fibres nerveuses beaucoup plus important et leur enchevêtrement est tel que leur dénombrement est très difficilement réalisable.

### Rôle du blastème sur la moelle épinière

Lorsque la moelle épinière est cultivée en présence d'un blastème prélevé au stade cône placé à proximité (environ 1 mm), la densité des fibres nerveuses issues de l'explant augmente fortement par rapport à celle obtenue avec une moelle cultivée isolément (Tableau 1, Fig. 4, Planche 1 b,c,d,) et ceci même

lorsque le blastème a été cultivé préalablement seul pendant 24 h avant d'être placé à proximité de la moelle. Cette dernière condition permet d'éliminer les effets de la libération éventuelle de substances de blessure à partir du blastème excisé.

L'analyse de la migration des fibres permet de distinguer deux populations de prolongements nerveux en fonction de la vitesse d'allongement de ceux-ci. La première population qui représente 20% des fibres nerveuses est caractérisée par une vitesse de migration deux fois plus élevée que celle de la deuxième population.

La distance entre la moelle épinière et le blastème joue un rôle important sur l'aspect de la co-culture notamment sur l'orientation des fibres nerveuses par rapport au blastème. Lorsque la distance séparant les deux tissus est de 1 mm, on constate que dans 35% des cas les fibres nerveuses se dirigent préférentiellement vers le blastème (Planche 1 b) ; par contre, si cette distance est supérieure à 2 mm, les fibres sont toujours émises sur tout le pourtour de la moelle et adoptent une disposition radiaire par rapport à celle-ci.

La présence d'un blastème affecte également la longueur des fibres issues de la moelle : 80% des fibres ont ainsi une longueur 2,3 fois supérieure à celle des fibres issues d'une moelle cultivée seule (Tableau 1) 18% des fibres ont une longueur 4 fois plus importante et 2% des fibres, une longueur 8,3 fois plus importante.

A la fin de la période de culture, les fibres nerveuses forment un réseau dense. Des collatérales peuvent alors relier des fibres entre elles (Planche 1 c,d).

La présence du blastème permet en outre d'allonger la durée de vie des fibres nerveuses ; celle-ci est de 7,5 jours en moyenne pour les fibres issues d'une moelle cultivée seule, elle atteint 15,7 jours en présence d'un blastème.

L'adjonction différée d'un blastème à un explant de moelle cultivée préalablement seul pendant 48 ou 72 h est encore capable de provoquer la croissance des fibres nerveuses bien que dans des proportions moindres

(respectivement -50 et -70% par rapport à une moelle co-cultivée en permanence avec un blastème).

	Nombre de fibres	Stimulation	Longueur des fibres	Durée de vie ( en jours )
Culture témoin	82 ± 17	1	251 ± 10 µm	7,5 ± 0,25
Co-culture	551 ± 88	6,72 *	80% --> 578 µm 18% --> 1011µm 2 % --> 2100 µm	15,5 ± 0,25
Moelle + NGF	75,± 18	0,92	—	—
Moelle larvaire	332 ± 91	1	—	—
Moelle larvaire + blastème	381 ± 103	1,15	—	—

Tableau 1 : Stimulation de la croissance des neurites de la moelle épinière de Pleurodèle sous l'influence de blastèmes de régénération de membre et de NGF

Les tirets indiquent que la mesure n'a pas été réalisée

Des résultats tout à fait similaires à ceux qui viennent d'être décrits sont obtenus lorsque seulement un fragment de moelle est mis en culture et ceci quelle que soit la provenance de ce fragment, quart dorsal droit ou gauche, quart ventral droit ou gauche.

Quand la moelle épinière provient de larves, la présence du blastème à peu de distance de l'explant nerveux n'entraîne aucune augmentation du nombre et de la longueur des fibres nerveuses.

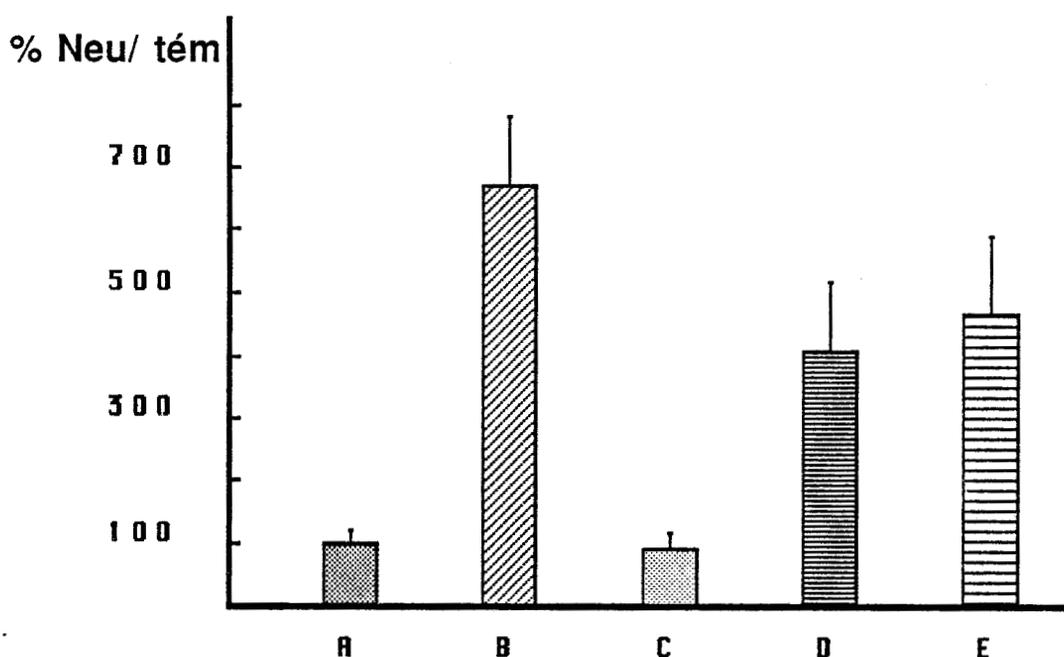


Figure 4 : Stimulation de la croissance des neurites de la moelle épinière adulte ou larvaire par un blastème ou le NGF par rapport au témoin (moelle cultivée seule) ramené arbitrairement à 100

Neu : nombre de neurites; tém : témoin; % Neu/tém : pourcentage de neurites par rapport au témoin

A : Moelle adulte cultivée seule (n=16)

B : Moelle adulte cultivée en présence d'un blastème (n=16)

C : Moelle adulte cultivée avec 10 ng/ml de NGF (n=16)

D : Moelle larvaire cultivée seule (n=10)

E : Moelle larvaire cultivée en présence d'un blastème (n=10)

Histologiquement, après 3 jours de culture, les moelles explantées présentent un aspect quelque peu modifié (Planche 2 c) par rapport à la structure de la moelle non cultivée (Planche 2 a). L'absence de méninges provoque en effet un aplatissement général de la tranche de moelle excisée modifiant l'architecture de la plupart des éléments spinaux. La surface apparaît accrue et les cellules ne sont plus agencées de manière aussi régulière autour du canal épendymaire qui reste lui parfaitement distinct. Quant aux motoneurones identifiables à leur position latéro-ventrale et à leur taille plus grande sur les coupes de moelle non cultivée (Planche 2 a, b), ils ne sont plus reconnaissables sur les coupes de moelle explantée. L'impossibilité de reconnaître ces cellules peut être due soit à la déformation de l'architecture tissulaire soit à la mort de ces cellules. En effet, la culture réalisée même en présence d'un blastème est suivie de la nécrose d'un certain nombre de cellules sans qu'il soit possible de préciser la nature de celles-ci (motoneurones, neurones d'association, cellules gliales), des cellules parfaitement vivantes côtoyant des cellules nécrotiques (Planche 2 d).

Les fibres nerveuses provenant de moelle cultivée en présence d'un blastème apparaissent nettement sur les coupes histologiques (Planche 3 c, d). Cependant, la nature des cellules qui donnent naissance à ces fibres ne peut être précisée, certaines fibres provenant de cellules proches du canal épendymaire (Planche 3 c) alors que d'autres naissent à partir de cellules en position périphérique (Planche 3 d).

### **Influence de la masse blastémale**

L'association d'une moelle épinière avec un nombre variable de blastèmes montre que le nombre de fibres nerveuses régénérées croît avec la masse de tissu blastémal mise en co-culture et atteint un plateau à partir d'une masse de tissu égale à 2 blastèmes (Tableau 2, Fig. 5).

	N ombre de fibres	Stimulation
Culture témoin	69,5 ± 24,3	1
Moelle + 1/ 2 blastème	181,3 ± 67,3	2,61 *
Moelle + 1 blastème	352,6 ± 91,2	5,1 *
Moelle + 2 blastèmes ou plus	382 ± 89,4	5,5 *

Tableau 2 : Stimulation de la croissance des neurites de la moelle épinière en fonction de la masse blastémale

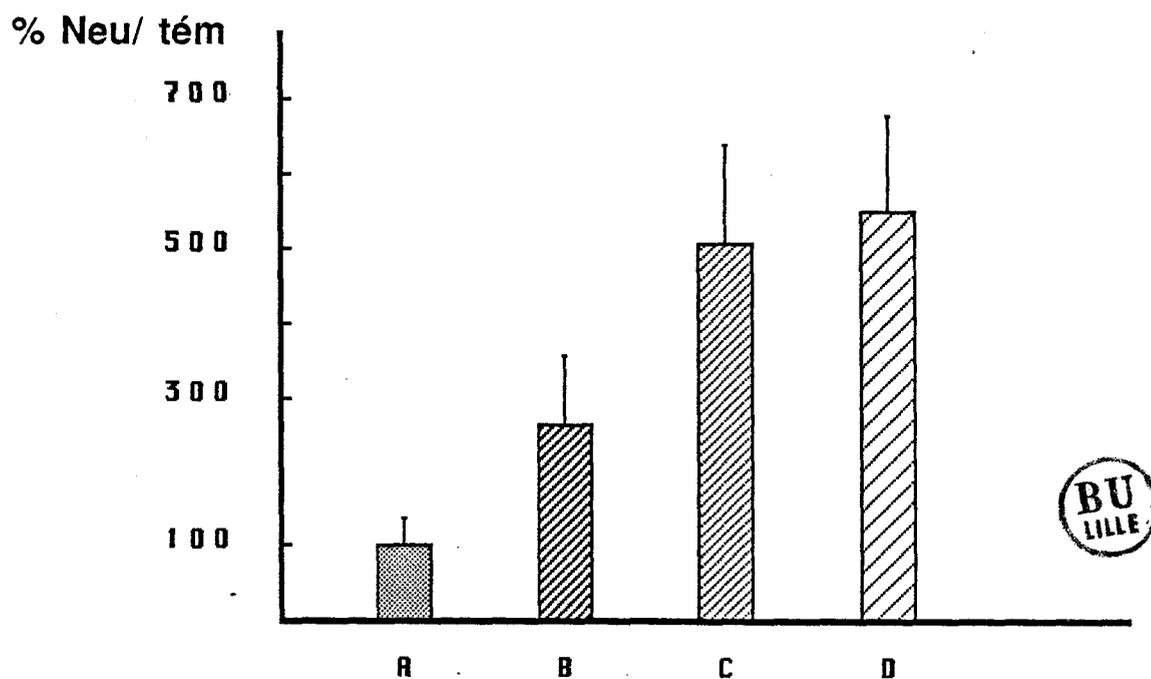


Figure 5 : Stimulation de la croissance des neurites de la moelle épinière fonction de la masse blastémale par rapport au témoin ramené arbitrairement à 100

A : Moelle cultivée seule ( n=10 )

B : Moelle cultivée en présence d'un 1/2 blastème ( n=8 )

C : Moelle cultivée en présence d'un blastème ( n=8 )

D : Moelle cultivée en présence de 2 blastèmes ou plus ( n=8 )

### **Influence des différentes parties du blastème**

Le blastème étant composé de deux tissus, le mésenchyme et l'épiderme, l'influence exercé par l'un et l'autre de ces tissus sur la croissance des fibres nerveuses a été étudiée. Le massif mésenchymateux isolé du blastème augmente significativement le nombre et la longueur des fibres nerveuses régénérées (Tableau 3, Fig. 6).

L'influence de l'épiderme a été appréhendé de deux façons en raison de la difficulté à maintenir dans de bonnes conditions de survie un épiderme isolé et cultivé. Dans un premier type d'expérience, l'épiderme provient de l'isolement mécanique de la cape épithéliale recouvrant le blastème excisé. Dans ces conditions, le tissu s'attache sur le fond de la boîte de culture mais les cellules ne se mutiplient pas. Dans un deuxième type d'expérience, l'épiderme est laissé en place sur le blastème, mais celui-ci est placé couché sur le fond de la boîte de culture de telle sorte que l'épiderme soit amené à enrober totalement le mésenchyme du blastème par le processus de la cicatrisation. Dans ces conditions, la survie du tissu épidermique est excellente, par contre les cellules mésenchymateuses dégènèrent. La structure et l'activité mitotique est identique à celle observée dans un épiderme de blastème non excisé. Quelle que soit la situation expérimentale, l'épiderme n'a aucune influence sur la croissance nerveuse (Tableau 3, Fig. 6) ; il inhibe même l'effet trophique du blastème dès qu'il enrobe totalement le mésenchyme.

	Nombre de fibres	Stimulation
Culture témoin	71,8 ± 34,9	1
Co-culture	378,5 ± 89,5	5,27 *
Moelle + mésenchyme	202,6 ± 40,4	2,82 *
Moelle + épiderme	70 ± 17,5	0,98

Tableau 3 :Influence des différentes parties du blastème (mésenchyme et épiderme) sur la croissance des neurites de la moelle épinière par rapport au blastème (co-culture) et à une culture témoin

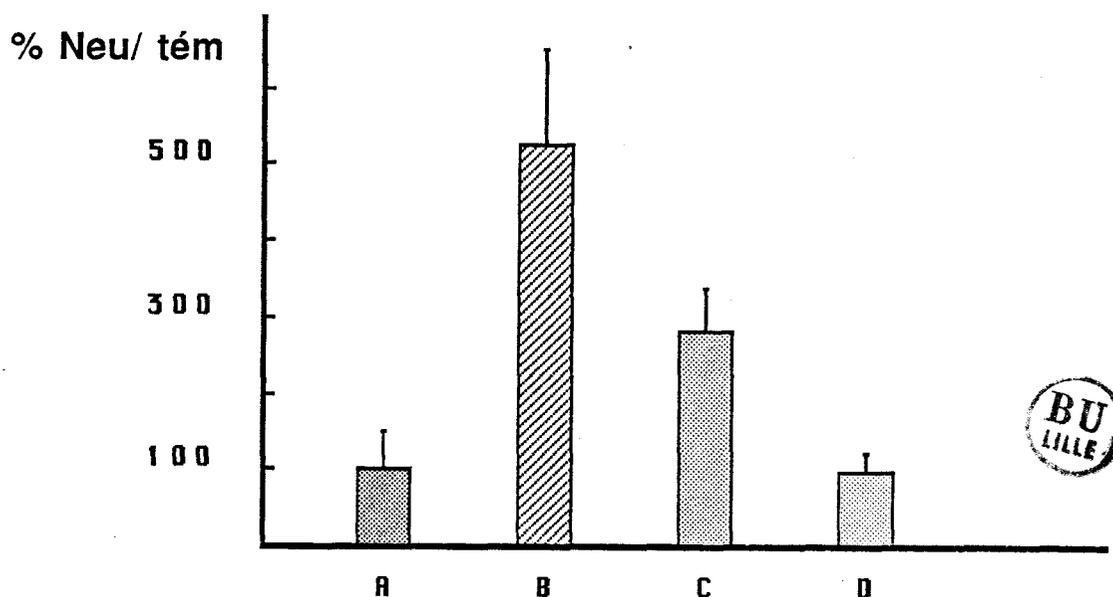


Figure 6 : Stimulation de la croissance des neurites de la moelle épinière par un blastème ou ses différentes parties par rapport au témoin ramené arbitrairement à 100 (%Neu/tém).

A : Moelle cultivée seule ( n=16 )

B : Moelle cultivée en présence d'un blastème ( n=16 )

C : Moelle cultivée en présence du mésenchyme blastémal ( n=11 )

D : Moelle cultivée en présence de l'épiderme blastémal ( n=16 )

### Influence de tissus témoins

Afin de comparer l'influence du blastème à celle de tissus divers sur la croissance des fibres nerveuses, des associations de moelle épinière ont été réalisées avec du muscle, de la peau ou des extrémités de doigt. Dans chaque cas, les explants non nerveux (blastème compris) sont placés à une distance de 1 mm de la moelle et les résultats sont obtenus après 72 h de culture.

La peau ou le muscle stimulent la croissance des fibres nerveuses par rapport à la culture témoin (moelle cultivée seule). Cependant, cette stimulation reste inférieure à celle obtenue avec un blastème (Tableau 4, Fig. 7). Par contre, la présence d'une extrémité de doigt ne stimule en aucun cas la croissance des fibres (Tableau 4, Fig. 7).

	Nombre de fibres	Stimulation
Culture témoin	87,7 ± 27,4	1
Co-culture	559,4 ± 103,5	6,3 *
Moelle + muscle	362 ± 81	4,1 *
Moelle + peau	282,5 ± 62,2	3,18 *
Moelle + foie	85,1 ± 34,9	0,97
Moelle + phalange	63,5 ± 22	0,71

Tableau 4 : Stimulation de la croissance des neurites de la moelle épinière par un blastème et des tissus témoins (muscle, peau, foie, phalange)



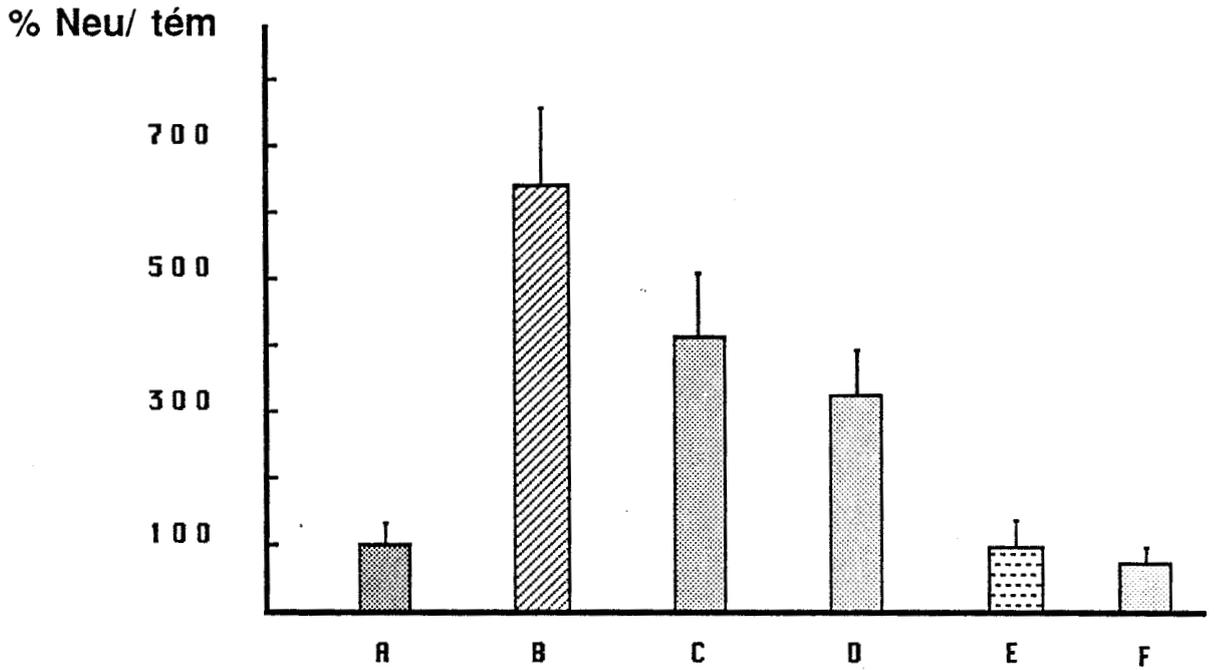


Figure 7 : Stimulation de la croissance des neurites de la moelle épinière par un blastème et des tissus témoins par rapport au témoin ramené arbitrairement à 100 (%Neu/tém).

A : moelle cultivée seule ( n=10 )

B : Moelle cultivée en présence d'un blastème ( n=10 )

C : Moelle cultivée en présence d'un muscle ( n=8 )

D : Moelle cultivée en présence de peau ( n=10 )

E : Moelle cultivée en présence de foie ( n=10 )

F : Moelle cultivée en présence d'une extrémité de doigt ( n=8 )



### **Influence de la prolifération cellulaire sur la croissance des fibres nerveuses.**

L'étude de l'effet de la prolifération cellulaire blastémale sur la croissance des fibres nerveuses a été abordée en comparant les résultats obtenus avec des blastèmes dont la prolifération est très différente.

Les blastèmes à prolifération intense sont représentés par les stades cône d'animaux jeunes (8 à 9 cm de longueur c'est à dire des animaux âgés d'un an).

Les blastèmes à prolifération ralentie sont représentés soit par les stades palette (phase de différenciation) de ces mêmes animaux, soit par les stades cône provenant d'animaux plus âgés ayant une vitesse de régénération réduite (16 à 17 cm de longueur, âgés d'environ 3 ans).

Les blastèmes à prolifération bloquée sont représentés par les stades cône d'animaux jeunes, le blocage de la prolifération étant obtenu par irradiation X.

Tous les régénérats stimulent la croissance des fibres nerveuses par rapport à la culture témoin. Mais cette stimulation est significativement plus importante lors de l'association de la moelle épinière avec un blastème stade cône provenant d'animaux jeunes par rapport à la stimulation obtenue en présence d'un blastème au stade palette, celle-ci étant elle même significativement plus forte que celle obtenue en présence d'un blastème dont la prolifération cellulaire est ralentie ou bloquée (Tableau 5, Fig. 8).

	Nombre de fibres	Stimulation
Culture témoin	88,8 ± 26,4	1
Co-culture	495,2 ± 99	5,6 *
Moelle + blastème stade cône irradié	247,8 ± 42,9	2,78 *
Moelle + blastème stade cône d'animaux de 16 à 17 cm	217 ± 33,2	2,44 *
Moelle + blastème stade palette	318 ± 37	3,58 *



Tableau 5 : Stimulation de la croissance des neurites de la moelle épinière en fonction du degré de prolifération du blastème

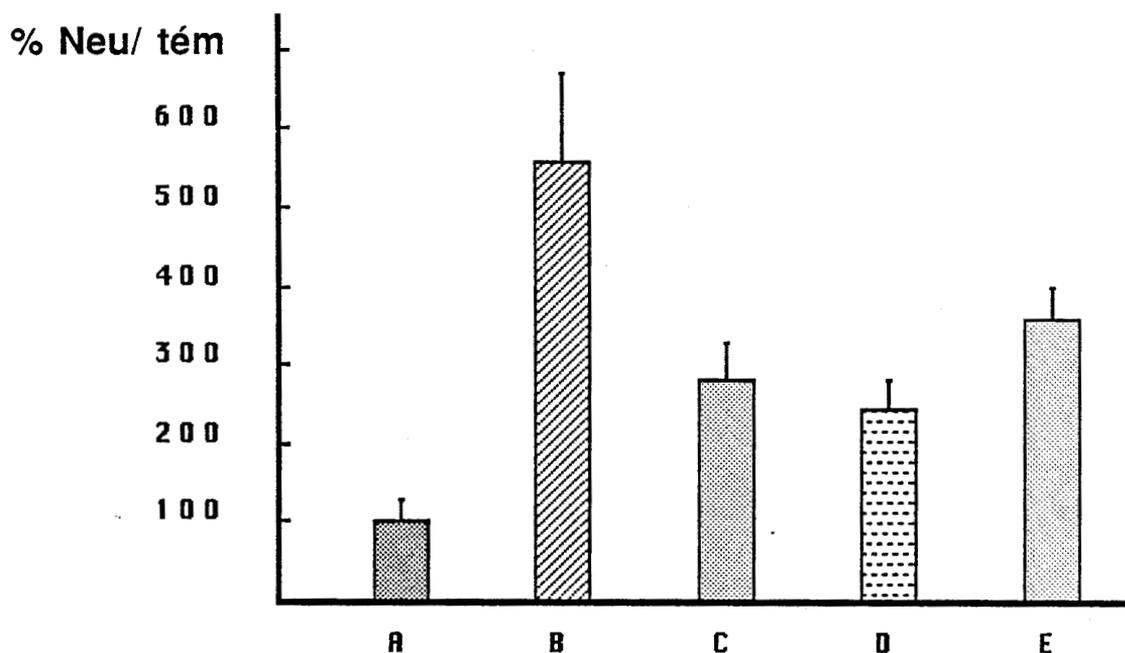


Figure 8 : Simulation de la croissance des neurites de la moelle épinière en fonction du degré de prolifération du blastème par rapport au témoin ramené arbitrairement à 100 (%Neu/tém)

A : Moelle cultivée seule ( n=10 )

B : Moelle cultivée en présence d'un cône d'animaux jeunes ( n=10 )

C : Moelle cultivée en présence d'un cône irradié d'animaux jeunes ( n=8 )

D : Moelle cultivée en présence d'un cône d'animaux âgés ( n=10 )

E : Moelle cultivée en présence d'une palette ( n=8 )



## DISCUSSION

Nos résultats montrent que la croissance des neurites d'un explant de moelle épinière de Pleurodèle adulte est fortement stimulée par la présence d'un blastème de régénération de membre prélevé au stade cône. Comparativement aux fibres issues de moelle adulte cultivée seule (culture témoin), celles obtenues en présence d'un blastème sont plus nombreuses (X6.7), plus longues (X2.3) et

leur survie dépasse 15 jours (X2). Le blastème possède donc une incontestable influence trophique sur l'extension des neurites des cellules nerveuses spinales. La séparation des deux tissus composant le blastème démontre en outre que le mésenchyme est le support de cet effet trophique. L'épiderme est incapable à lui seul de stimuler la croissance nerveuse et ceci quelle que soient les conditions dans lesquelles il est cultivé qu'il soit posé seul à proximité du massif nerveux ou qu'il enrobe totalement le mésenchyme du blastème co-cultivé. Cependant, sa présence est nécessaire pour que le mésenchyme exprime ses potentialités neurotropes maximales. En effet, un massif mésenchymateux dénudé entraîne une croissance nerveuse inférieure à celle d'un blastème pourvu de son épiderme. Ceci s'explique par le fait que l'épiderme est indispensable à la bonne survie du massif mésenchymateux cultivé *in vitro* (Vanrapenbusch, résultats non publiés). Ces résultats concernant la croissance des neurites sous l'effet d'un blastème sont sensiblement identiques à ceux obtenus par Richmond et Pollack (1983). Ces auteurs ont montré que la croissance des neurites de moelle de larve de grenouille est stimulée par la présence d'un mésenchyme provenant d'un blastème de régénération de membre postérieur. La croissance des neurites est d'autant plus faible que la moelle ou le blastème de régénération proviennent d'animaux plus âgés incapables de régénérer complètement leur membre amputé.

Cet effet trophique du mésenchyme n'est pas particulier au blastème. Des tissus riches en mésoderme tel que la peau et les muscles permettent également une croissance, toutefois plus limitée, des prolongements nerveux alors que l'extrémité d'un doigt qui contient essentiellement de l'os enrobé de peau n'a aucune action stimulatrice.

Dans nos conditions de culture, la distance qui sépare le blastème de la moelle épinière (1 mm environ) empêche dans l'immédiat toutes relations directes entre les deux tissus. Par conséquent, l'effet trophique du blastème ne peut se réaliser que par l'intermédiaire d'un facteur diffusible libéré par le

mésenchyme. De plus, la concentration de ce facteur influe sur la densité des fibres nerveuses régénérées ; en effet, plus la masse de tissu blastémal est importante plus le nombre de prolongements nerveux augmente. Toutefois, celui-ci se stabilise dès que la co-culture est réalisée avec 2 blastèmes ou plus. L'existence de ce plateau ne peut s'expliquer par la présence d'un éventuel inhibiteur libéré par les blastèmes puisque dans ce cas, la densité des fibres nerveuses devrait diminuer à partir d'une certaine concentration d'inhibiteur. Il semble donc que la stimulation nerveuse ait atteint sa valeur maximale lorsque la moelle est cultivée en présence de 2 blastèmes.

L'orientation des prolongements nerveux régénérés varie en fonction de la distance séparant les deux tissus ; quand celle-ci est faible, on constate dans un nombre significatif de cas que les fibres s'orientent préférentiellement vers le blastème ; quand la distance est importante, la direction des prolongements devient totalement aléatoire. Cette différence de comportement souligne probablement la dilution du facteur trophique dans le milieu de culture, la concentration de ce facteur étant d'autant plus importante autour de la moelle que le blastème est placé plus près de celle-ci. La pente de ce gradient est suffisante pour influencer la direction des fibres nerveuses vers leurs cellules cibles mais insuffisante pour stimuler davantage la croissance de ces mêmes fibres puisque leur nombre ne varie pas de façon significative en fonction de la distance séparant le blastème de la moelle.

L'ensemble de nos observations conduit à penser que la production du facteur neurotrophe est exclusivement lié aux tissus mésenchymateux ; en effet, l'épiderme n'a jamais provoqué la moindre stimulation nerveuse et celui-ci est même capable d'inhiber l'effet stimulateur du mésenchyme lorsque les conditions de culture l'amène à enrober ce massif. L'absence de stimulation observée dans ce cas peut s'expliquer soit par la nécrose du mésenchyme consécutive à l'enrobage épidermique (Lassalle, 1983), soit par le blocage de la libre diffusion du facteur neurotrophe par la barrière épidermique ou encore par

la conjugaison des deux mécanismes. Que l'épiderme ne provoque aucune attraction nerveuse n'est pas surprenant puisqu'il a été montré (Verna et Saxod, 1983) que les fibres issues de ganglions spinaux embryonnaires de Poulet ont un comportement d'évitement vis à vis de tissus cutanés placés en co-culture. Nous avons également constaté qu'il existe une relation nette entre la prolifération des cellules mésenchymateuses et leur capacité à promouvoir la croissance des neurites : plus la prolifération cellulaire est active et plus la densité des prolongements nerveux spinaux est élevée. Cette relation implique qu'un tissu en cours de différenciation doit avoir des capacités stimulatrices inférieures à celles d'un tissu en active prolifération cellulaire. L'utilisation de régénérats ayant atteint le stade palette (stade de la chondrogenèse) confirme ce point de vue. Les résultats de Pollack et coll. obtenus chez la larve de *Rana pipiens* peuvent être interprétés de cette façon. Ces auteurs constatent en effet que des régénérats provenant de têtards proches de la métamorphose et qui perdent progressivement leur pouvoir régénérateur (Richmond et Pollack, 1983) ou d'explants de membre de larve âgée (Pollack et Liebig, 1977) fortement différenciés (Pollack et Richmond, 1981) ont des capacités neurostimulatrices réduites.

La nature des cellules à l'origine des neurites reste difficile à préciser compte tenu des modifications architecturales que subit la moelle cultivée. Toutefois, la possibilité d'obtenir la croissance de neurites à partir de n'importe quelle région de la moelle montre à l'évidence que des cellules nerveuses autres que les motoneurones peuvent survivre et émettre des neurites contrairement à ce que soutiennent Pollack *et al.* (1981) et Pollack et Muhlach (1982) à la suite d'observations réalisées sur des larves de grenouille.

La stimulation de la croissance des neurites obtenue à partir d'explants nerveux cultivés *in vitro* en présence de tissus divers a été observée chez de nombreuses autres espèces, Insectes (Chamley *et al.*, 1973), Amphibiens anoures (Richmond et Pollack, 1983), Oiseaux (Ebendal et Jacobson, 1977 ; Verna et

Saxod, 1979), Mammifères (Coughlin, 1975, Dribin et Barrett, 1980). Tous ces travaux ont montré que les tissus cultivés en association avec l'explant nerveux émettent une substance diffusible ayant des propriétés neurotrophiques. Le NGF (Nerve Growth Factor) a souvent été soupçonné d'être le responsable de cette activité neurotrophique en raison de son caractère ubiquitaire. En effet, cette petite protéine (12600 daltons) est présent en quantité plus ou moins importante dans un grand nombre de tissus (revue dans Viores et Guroff, 1980). Cependant, son action est restreinte aux systèmes nerveux sympathique et sensoriel (Levi-Montalcini et Angeletti, 1968 ; Thoenen et Barde, 1981) ainsi qu'à quelques lignées cellulaires tumorales (Viores et Guroff, 1980 ; Thoenen et Barde, 1981). Dans nos conditions expérimentales, le NGF ne provoquant pas l'extension des neurites des cellules de la moelle épinière, il ne peut être retenu comme le facteur neurotrophe mésenchymateux du blastème de régénération d'autant que le NGF agit sur les stades embryonnaires du tissu nerveux alors que nos explants proviennent de moelle d'individus adultes.

## **CHAPITRE II**

## CHAPITRE II

### INTRODUCTION

La présence d'un blastème de régénération à proximité d'un explant de moelle épinière de Pleurodèle provoque la croissance de fibres nerveuses issues de la moelle. Cette croissance est nécessairement l'expression d'une activation du métabolisme spinal sous l'effet du régénérat. Nous avons alors tenté de mieux saisir les processus qui conduisent à la multiplication et à l'extension des neurites en mesurant d'une part les synthèses de molécules qui traduisent une stimulation générale du métabolisme tissulaire qu'il soit neuronal ou non comme les protéines et les acides nucléiques et d'autre part, l'activation de molécules spécifiquement neurales comme les transmetteurs catécholaminergiques (dopamine, noradrénaline, adrénaline) et certaines enzymes associées aux transmetteurs cholinergiques (choline acétyl transférase et acétylcholine estérase) et catécholaminergiques.

### METHODOLOGIE ET TECHNIQUES

#### A. Méthodologie

Les synthèses de protéines et d'ADN ont été mesurées par l'incorporation de précurseurs radioactifs spécifiques (mélange d'acides aminés pour les protéines, thymidine pour l'ADN) dans les moelles cultivées seules (culture témoin) et les moelles cultivées en présence d'un blastème (co-culture). Dans ce cas, le précurseur est ajouté 24h avant la fin de la culture. La synthèse d'ADN a été en outre visualisée par l'incorporation 6h avant la fin de la culture de bromodéoxyuridine (BrdU) rendue fluorescente par un anticorps anti-BrdU.

L'activation des transmetteurs aminergiques et des enzymes associées aux transmetteurs cholinergiques a été appréciée en quantifiant ces molécules à la fois dans les cultures témoins, les co-cultures et les moelles non cultivées.

Enfin, nous avons tenté de déceler l'activité des enzymes aminergiques par immunocytochimie.

## B. Techniques

### 1 - Mesure de la synthèse d'ADN et de protéines

#### a) Mesure de la radioactivité

La technique repose sur une double incorporation de précurseurs radioactifs spécifiques. La synthèse d'ADN est appréciée par l'incorporation de thymidine marquée au carbone 14 (activité spécifique 50 mCi/mM) et celle des protéines par l'utilisation d'un mélange d'acides aminés tritiés comprenant de la L Glycine, L Leucine, L Proline, L Sérine et L Valine (activité spécifique 42 Ci/mM).

Chaque explant nerveux est cultivé pendant 24 h en présence de 1,5  $\mu$ Ci/ml de milieu de thymidine marquée et de 1,5  $\mu$ Ci/ml d'acides aminés tritiés. Après rinçage dans une solution saline dépourvue de précurseurs radioactifs, les explants sont broyés individuellement à l'aide d'un homogénéiseur de Potter dans 1 ml de tampon à 4°C. Le tampon est composé de 0,1 mM/ml de NaCl, de 0,01 mM d'EDTA et de 0,01 mM/ml de Tris. Chaque homogénat est ensuite transféré dans un tube à hémolyse maintenu à 0°C par de la glace fondante. 1 ml de tampon ayant servi au rinçage du broyeur est ajouté dans chaque tube. Un échantillon de 0,4 ml prélevé sur les 2 ml précédents sert au dosage de la quantité d'ADN. Les macromolécules des 1,6 ml restants sont précipités par 0,2 ml d'acide trichloracétique (ATCA) pendant 15 mn à 0°C. Le précipité est recueilli sur un filtre en fibre de verre (Whatman GF/C) qui est

placé, après séchage à l'obscurité, dans un pilulier de comptage contenant 6 ml de liquide scintillant (Lipoluma). La radioactivité est mesurée en coups par minute (cpm) par un compteur à scintillation liquide (LKB, Wallac 1215).

#### b) Dosage de l'ADN

L'échantillon de 0,4 ml d'homogénat prélevé précédemment est complété par 0,2 ml de tampon contenant 100 ng/ml de diaminophénylindole (DAPI), intercalant fluorescent spécifique de l'ADN (Brunket *al.*, 1979 ). La quantité d'ADN est déterminée par mesure au spectrofluorimètre Perkin Elmer LS3. La courbe étalon est réalisée à partir d'ADN de testicules de Poisson (Sigma).

#### c) Dosage des protéines

Les protéines de la moelle épinière sont dosées selon la technique de Lowry *et al.* (1951) modifiée par Markwell *et al.* (1978). Les protéines sont colorées par le réactif de Folin en présence de cuivre en milieu alcalin. La coloration obtenue qui est proportionnelle à la quantité de protéines est mesurée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 660 nm. La courbe étalon est établie à partir d'une solution de sérum albumine bovine.

## 2 - Activation des transmetteurs aminergiques

La détermination et le dosage des catécholamines dans la moelle épinière de Triton ont été entreprises par la technique de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) de Mefford (1981).

#### a) Dosage des catécholamines

##### - Principe de l'HPLC

La chromatographie en phase liquide inverse permet de séparer

des substances solubles en les retardant sélectivement. La figure 9 montre schématiquement les différents composants de l'HPLC.

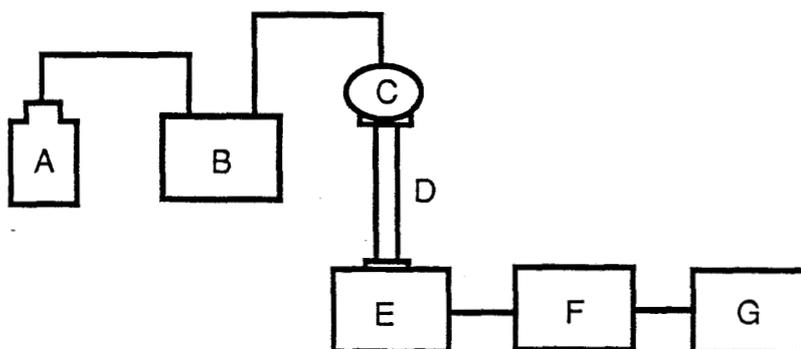


Figure 9 : Schéma représentant le principe de l'HPLC

A : solvant ; B : pompe ; C : injecteur ; D : colonne analytique  
E : électrode ; F : amplificateur ; G : enregistreur sur papier.

Les fragments de moelle épinière non cultivée, cultivée seule ou cultivée en présence d'un blastème de régénération sont broyés dans 200  $\mu$ l d'acide perchlorique HClO<sub>4</sub> 0,2 M dans un homogénéiseur de Dounce. Après sonication, le broyat est centrifugé à 10000 tours/mn pendant 20 mn. A l'aide d'une seringue Hamilton, le surnageant clair est recueilli puis injecté dans l'injecteur de colonne. Celui-ci fixe le volume de surnageant introduit dans la colonne analytique à 20  $\mu$ l. Le solvant de cette colonne permettant de séparer les catécholamines ainsi qu'un catabolite de la dopamine, le DOPAC, est constitué d'acétate de sodium 0,1 M, d'acide citrique 0,02 M, 100 mg/l de sodium octyl sulfate, 50 mg/l d'EDTA et 15% de méthanol. Le débit de ce solvant réglé par la pompe est de 1 ml/mn.

- Détection électrochimique.

La détection électrochimique est obtenue par oxydation au niveau de la cellule détectrice des groupements alcools des catécholamines en

groupements quinones. Ce processus entraîne la libération de 2 protons et de 2 électrons (Fig. 10) qui seront captés par l'électrode de la cellule provoquant ainsi l'apparition d'un courant électrique.

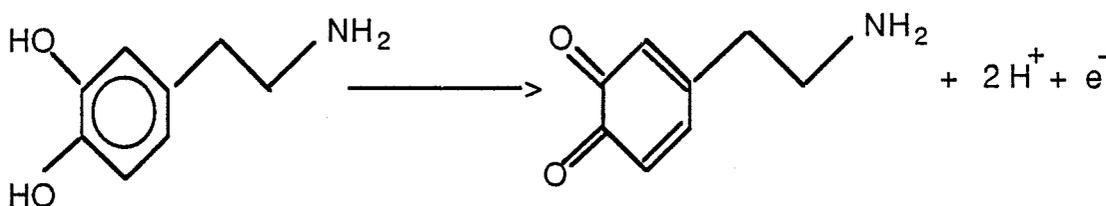


Figure 10 : Schéma représentant le principe de la détection électrochimique utilisée pour doser les neurotransmetteurs mono-aminergiques

L'expression de ce courant est obtenu grâce à la formule de Levich (1962) :

$$I = n K F V C$$

$I$  = intensité du courant obtenu

$n$  = nombre d'électrons libérés au cours de l'oxydation par 1 mole de la substance

$K$  = constante dépendant de la diffusion de la substance et de la viscosité du solvant

$F$  = constante de Faraday

$V$  = vitesse de la solution passant au niveau de l'électrode

$C$  = concentration de la substance électro-active présente dans l'homogénat

Pour une substance donnée,  $n$ ,  $K$ ,  $F$  et  $V$  sont constants. Le courant électrique dérivé de l'arrachement des électrons est par conséquent proportionnel à la concentration de la substance. Un amplificateur permet l'enregistrement sur papier des variations électriques sous forme de pics dont la surface correspond à la quantité de substance présente dans l'homogénat. Une solution titrée de catécholamines permet d'étalonner l'enregistrement. Le taux

des catécholamines des différents échantillons est ramené par mg de protéines de tissu.

b) Détection des enzymes aminergiques par immunocytochimie

La détection des enzymes aminergiques en particulier la tyrosine hydroxylase (TH), la dopamine  $\beta$  hydroxylase (DBH) et la phényléthanolamine N méthyl transférase (PNMT) a été entreprise par immunocytochimie sur coupe à congélation à l'Unité INSERM 156 de Lille.

- Préparation des tissus

Après dissection et prélèvement de la moelle ou après culture de celle-ci en présence ou non d'un blastème de régénération, le tissu nerveux est fixé pendant 1 h au PAF (Picric Acid Formaldéhyde) de Stéfanini *et al.* (1967). Les explants sont rincés ensuite dans le tampon de Coons 0,1 M à pH 7,2 contenant 15% de saccharose puis enrobés dans du tissue-tek (Miles Lab., Illinois). L'ensemble est alors plongé dans du propane liquide refroidi par l'azote liquide. Le bloc est fixé sur la platine porte-objet du cryostat et des sections de 5 à 10  $\mu$ m d'épaisseur sont confectionnées puis collées sur des lames traitées à la gélatine-alun de chrome. Ces lames sont préparées de la manière suivante : après un nettoyage soigné, elles sont plongées dans l'eau, égouttées mais non séchées puis immergées quelques secondes dans une solution à 60°C contenant 100 ml d'eau, 50 mg d'alun de chrome et 0,5 g de gélatine. Les lames égouttées et séchées à l'étuve peuvent être conservées à -20°C.

- Réaction immunocytochimique

La méthode utilisée pour la réaction immunocytochimique est une méthode indirecte (Fig. 11). Elle se déroule en deux temps. L'immunsérum spécifique de l'antigène recherché, dans notre cas d'une enzyme catalysant la synthèse de catécholamines, a été produit chez le lapin. Le sérum utilisé comme révélateur est produit par immunisation d'un animal d'une autre espèce (en général le mouton) contre les immunoglobulines de lapin. C'est ce dernier sérum qui sera couplé à un marqueur, la peroxydase. L'anticorps de lapin est appliqué

aux dilutions de 1/1000 pour la TH, 1/2500 pour la PNMT, 1/2500 pour la DBH pendant 65 heures à 4°C. La dilution de l'immunsérum est faite dans le tampon Coons à pH 7,2 additionné volume à volume d'eau distillée contenant 0,1% d'albumine. L'application du sérum marqué se fait en incubation courte c'est à dire pendant 30 mn pour un dilution au 1/40 à 20°C. Le sérum marqué provenant de l'Institut Pasteur ne contient que la fraction variable ou Fab de l'anti-immunoglobuline de lapin marqué à la peroxydase de Raifort. L'avantage de la fraction Fab marquée par rapport à l'anti-immunoglobuline totale réside dans la diminution du bruit de fond tout en gardant la même résolution.

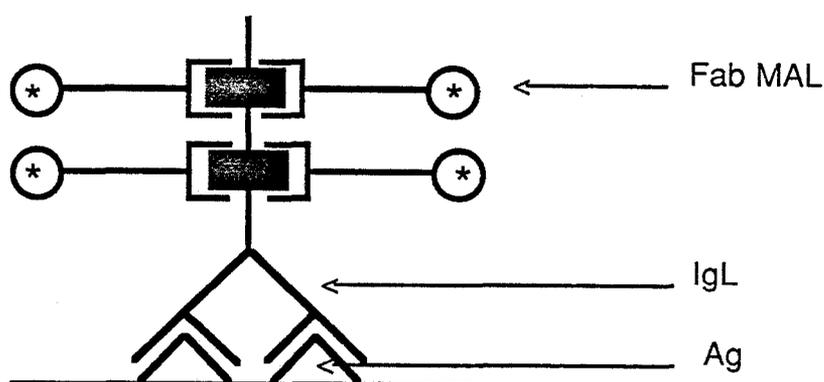


Figure 11 : Schéma représentant la réaction immunocytochimique indirecte  
 Ag : antigène tissulaire - IgL : immunoglobuline de lapin - Fab MAL : fraction Fab marquée de mouton anti immunoglobuline de lapin  
 ⊙ = peroxydase

#### 4 - Dosage de l'activité cholinergique

##### a) Dosage de l'activité de l'Acétyl Choline Transférase

L'activité de l'acétylcholine transférase (CAT) a été appréciée selon la technique de Fonnum (1969) par la mesure de la synthèse d'acétylcholine

(ACh) marquée résultant de la réaction entre l'acétyl CoA marqué au carbone 14 sur l'acétyl (activité spécifique : 56  $\mu\text{Ci}/\text{mM}$ ) et la choline (Fig. 12).

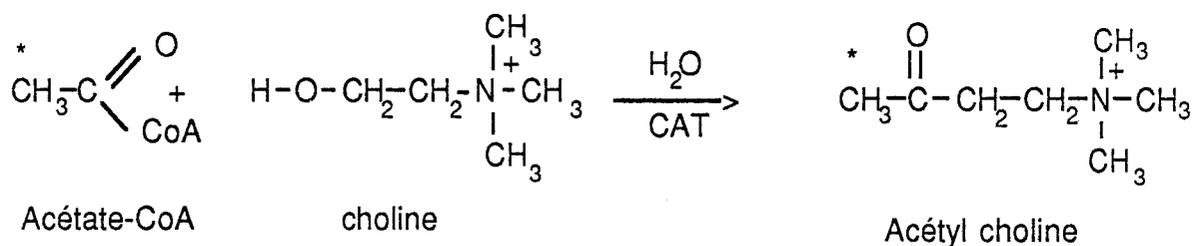


Figure 12 : synthèse de l'acétylcholine par la CAT à partir de l'acétate-CoA marqué sur l'acétate (noté par \*) et de la choline

La séparation du neurotransmetteur et des réactifs ou des produits secondaires de la réaction est réalisée par extraction de l'acétylcholine dans un solvant spécifique, le tétraphénylborate.

- Extraction de la CAT

Dix mg de tissu nerveux sont broyés dans 10 ml de tampon phosphate (2,5 mM/ml) contenant 0,5% de Triton X100, 10 mM/ml de NaCl, 0,1 mM/ml de phénanthroline et 0,1 mg/ml d'albumine.

- Dosage de l'activité enzymatique

10  $\mu\text{l}$  de l'homogénat contenant l'enzyme sont incubés pendant 10 mn dans 10 ml de tampon phosphate (2,5 mM/ml) contenant 5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  d'acétyl CoA marqué, 20 mM/ml de choline, 20% d'albumine, 2 mM/ml de phénanthroline et 0,2 mM/ml d'ésérine. Le pH du tampon est ajusté à 7,4.

L'incubation terminée, 100  $\mu\text{l}$  d'une solution d'éthyl butyl cétone contenant 1% de tétraphénylborate sont ajoutés. Puis la solution contenant les 2 solvants non miscibles est fortement agitée. Cette opération permet d'assurer le

contact entre l'acétylcholine et le solvant et facilite le passage du neuromédiateur dans ce solvant. Après décantation, 50 µl de surnageant formé par l'éthyl butyl cétone sont prélevés et placés dans un pilulier de comptage contenant 6 ml de liquide scintillant (Aqualuma). La radioactivité est alors mesurée.

L'activité enzymatique est déterminée en comparant la radioactivité de l'homogénat à celle d'un témoin où les 10 µl d'homogénat ont été remplacés par 10 µl de tampon phosphate tritoné. Connaissant, par l'activité spécifique, le nombre de moles d'acétyl CoA déposées dans un pilulier (soit 0,86 nM/tube) et le nombre de cpm correspondant à ces moles radioactives (soit 93845,36 cpm), le nombre de moles de neurotransmetteurs formés dans chaque tube est déterminé de la façon suivante :

$$\text{nombre de moles d'ACh} = 0,86 * (\text{cpm échantillon} - \text{cpm témoin}) / 93845,36.$$

L'activité de l'enzyme est exprimée par heure et par mg de protéines.

#### b) Dosage de l'activité des Acétylcholine Estérases.

L'activité totale des acétylcholine estérases (AChE) est dosée selon la technique de Ellman. Les explants nerveux sont broyés dans 150 µl d'une solution contenant 10 mM/ml de tampon Tris/HCl à pH 7, 1% de Triton X100, 1 mM/ml de NaCl, 1 mM/ml d'EDTA, 1 mM/ml d'EGTA et 1 mg/ml de bacitracine afin d'inhiber les protéases. Après centrifugation de l'homogénat à 4°C pendant 30 mn à 12000 g, 10 µl du surnageant sont prélevés et ajoutés à 100 µl d'un réactif comprenant 0,1 M/ml de tampon phosphate à pH 7, 10 mM/ml de DNTB, 1,5 mg/ml de carbonate de sodium. 1 ml de tampon phosphate complète cette solution. Après quelques minutes, 75 µl d'acétyl thio iodure représentant le substrat enzymatique sont ajoutés. La thiocholine issue de l'hydrolyse enzymatique du substrat réagit avec le DNTB formant un complexe jaune (Fig. 13)

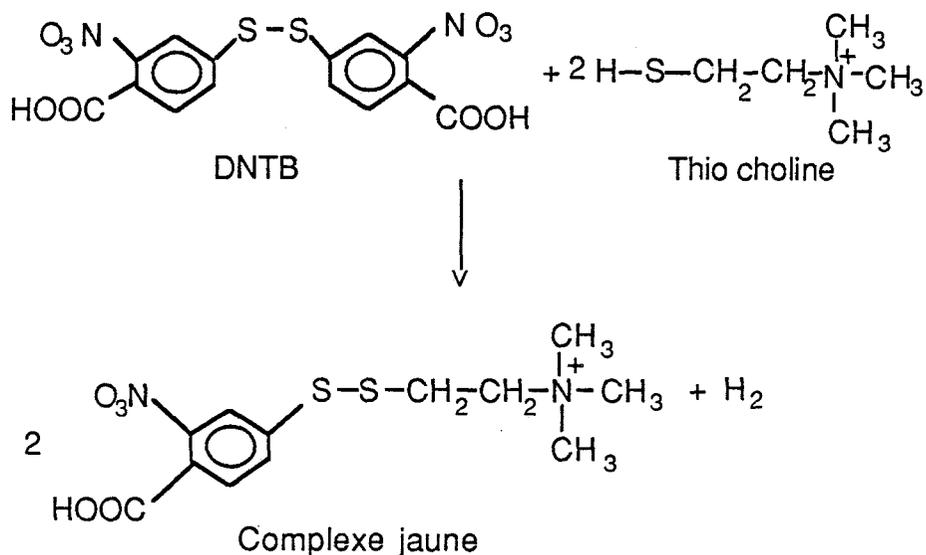


Figure 13 : Réaction chimique entre le DNTB et la thio choline

La coloration obtenue qui est proportionnelle à la quantité de substrat hydrolysé est mesurée au spectrophotomètre (Pye Unicam) à la longueur d'onde de 412 nm. Les résultats sont exprimés sous la forme d'une droite dont la valeur de la pente en fonction du temps et de la quantité de protéines de l'extrait nerveux détermine l'activité enzymatique de l'AChE. Cette activité est exprimée en moles par heure et par mg de protéines.

## RESULTATS

### Synthèse de protéines

La mesure de la synthèse des protéines par l'incorporation d'un mélange d'acides aminés marqués au tritium montre que les explants de moelle cultivés en présence d'un blastème ont une activité de synthèse légèrement

supérieure (+49%) à celle des cultures témoins (Tab 6).

	Incorporation $^3\text{H}$ AA cpm / ng ADN	Stimulation
Culture témoin	12,35 $\pm$ 1,53	1
Co-culture	18,45 $\pm$ 6,4	1,49 *

Tableau 6: incorporation d'acides aminés tritiés dans la moelle épinière cultivée seule (culture témoin) ou en présence d'un blastème de régénération (co-culture)

La comparaison de l'activité synthétique de chaque explant nerveux avec le nombre de fibres issues de ces mêmes explants révèle l'existence d'une forte corrélation ( $r = 0,93$ ) dans le cas des cultures témoins (Fig.14). Par contre, cette corrélation est pratiquement nulle ( $r = 0,21$ ) dans les co-cultures (Fig.14). Cependant, dans ce dernier cas, l'examen des courbes montre à l'évidence l'existence de deux sous populations, la première d'entre elles (A) regroupant la majorité des co-cultures (13/16) est caractérisée par un niveau de synthèse faible non significativement différent des cultures témoins et un indice de corrélation moyen ( $r = 0,48$ ). La seconde (B) sous population (3 cas/16) possède une activité de synthèse trois fois plus élevée que celle du groupe précédent.

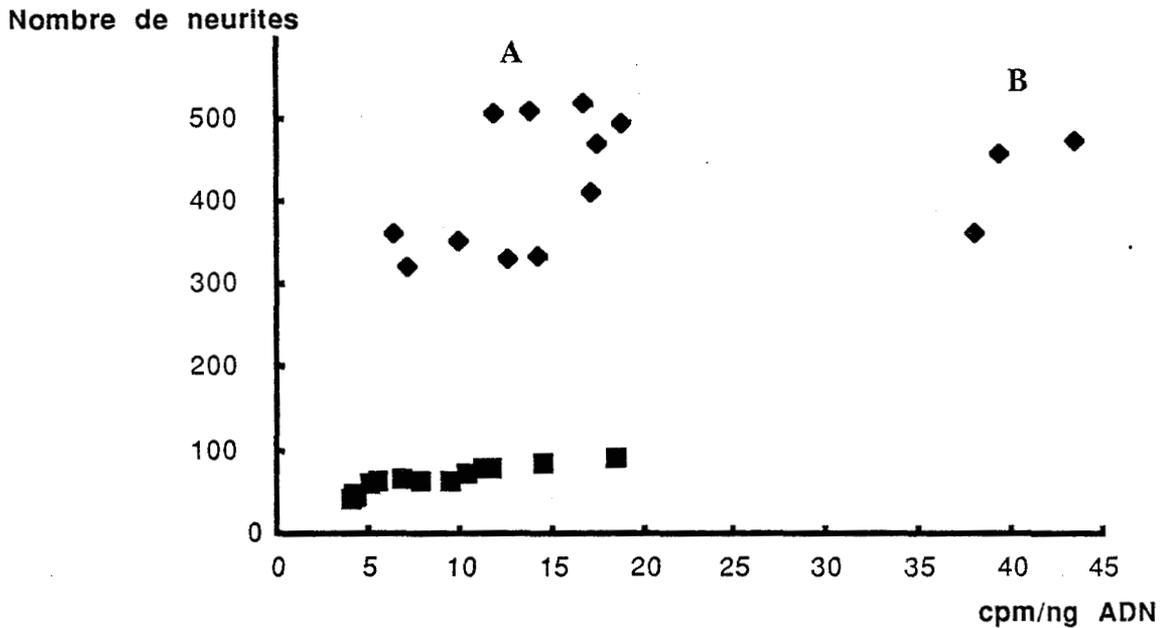


Figure 14 : Comparaison de l'activité synthétique des protéines (cpm/ng ADN) avec le nombre de neurites de la moelle épinière

Les losanges représentent la moelle cultivée en présence d'un blastème . Equation de la droite de régression  $Y = 37,244 + 3,287 x$ . Coefficient de corrélation  $r = 0,21$  pour A et B réunis,  $r = 0,48$  pour A

Les carrés représentent la moelle cultivée seule ( $Y = 467 + 1,518 X$ ,  $r = 0,93$ )

### Synthèse d'ADN

La mesure de l'incorporation de thymidine tritiée montre que les cultures témoins et les co-cultures ont une activité de synthèse en ADN tout à fait similaires (Tab 7). La BRdU qui permet de visualiser les noyaux des cellules en cours de synthèse d'ADN révèle que celle-ci est localisée aux cellules épendymaires et à quelques cellules situées sur le pourtour des explants nerveux cultivés isolément ou en présence d'un régénérat.

	Incorporation $^3\text{H}$ Thy cpm / ng ADN	Stimulation
Culture témoin	$0,21 \pm 0,07$	1
Co-culture	$0,25 \pm 0,1$	1,2

Tableau 7: incorporation de thymidine tritiée dans la moelle épinière cultivée seule (culture témoin) ou en présence d'un blastème (co-culture)

### Activation des transmetteurs aminergiques

Rappelons que les transmetteurs catécholaminergiques dérivent de la tyrosine et sont métabolisés dans l'ordre suivant : dopamine, noradrénaline, adrénaline ( Fig 15).



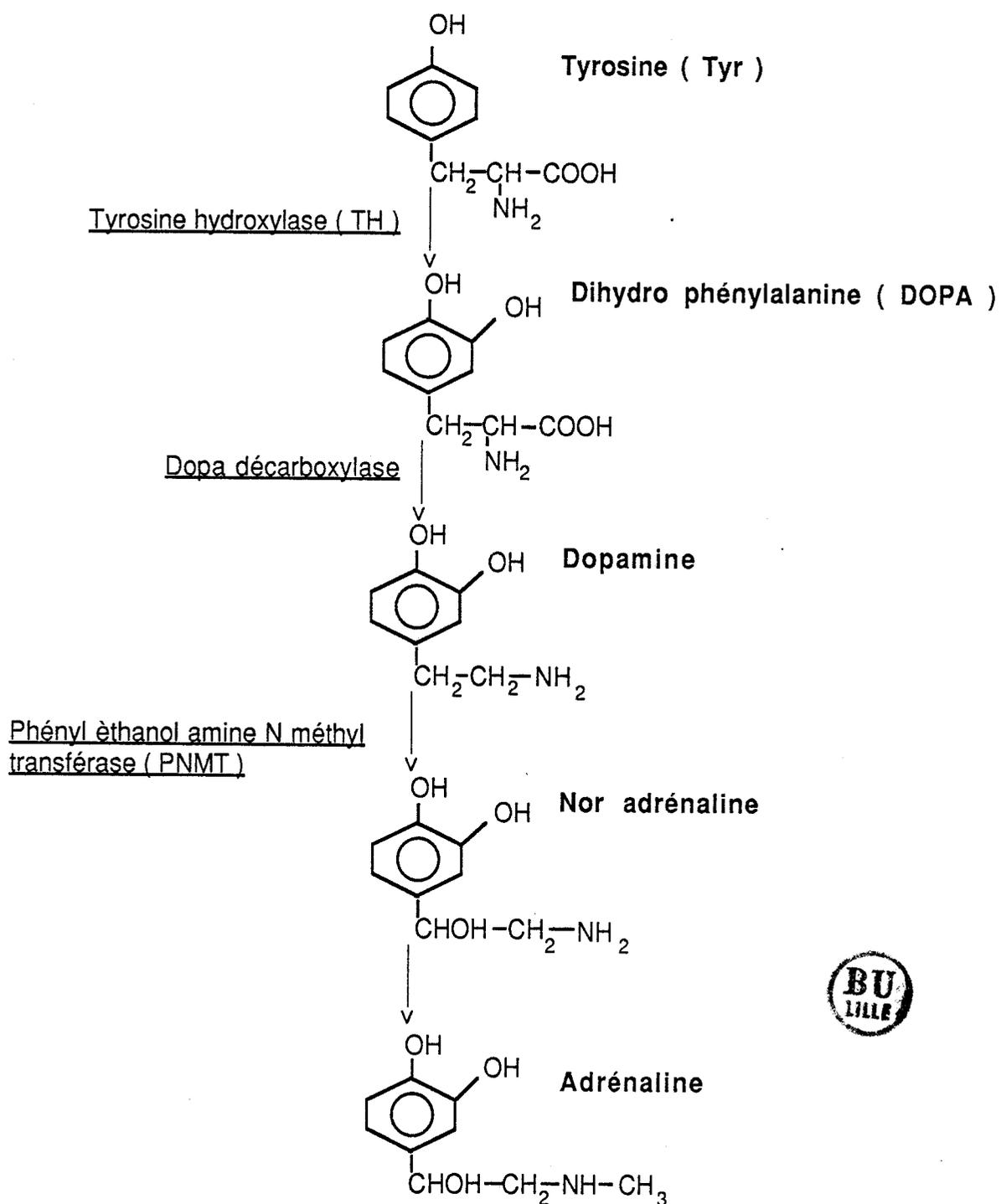


Figure 15 : schéma représentant le métabolisme des neurotransmetteurs catécholaminergiques

## a) Dosage des neurotransmetteurs

Le dosage des neurotransmetteurs aminergiques par HPLC révèle que la présence d'un blastème de régénération provoque dans la moelle co-cultivée une augmentation importante (x 5,5) de la quantité de noradrénaline et dans une moindre mesure (x 2,2) de l'adrénaline (Tab 8. et Fig.16) c'est à dire des transmetteurs terminaux de la chaîne métabolique. La dopamine à l'origine de ces transmetteurs n'a été retrouvé dans nos conditions expérimentales que dans un cas.

	Nor adrénaline	Stimulation	Adrénaline	Stimulation
Culture témoin	4,54 ± 0,9	1	11,61 ± 1,77	1
Co-culture	25,1 ± 9,58	5,53 *	25,43 ± 4,04	2,19 *
Moelle <i>in vivo</i>	7,48 ± 1,18	1,65 *	13,2 ± 2,15	1,14

Tableau 8 : dosage de la noradrénaline et de l'adrénaline dans de la moelle épinière *in situ*, cultivée seule (culture témoin) ou cultivée en présence d'un blastème (co-culture)

Tous ces transmetteurs sont également présents dans la moelle d'individus dont les membres antérieurs sont soit en cours de régénération, soit totalement régénérés ( Tab. 8 et Fig.16 et17). La quantité décélée est bien moins importante (2 à 3 fois) que celle observée dans la moelle co-cultivée en présence d'un blastème.

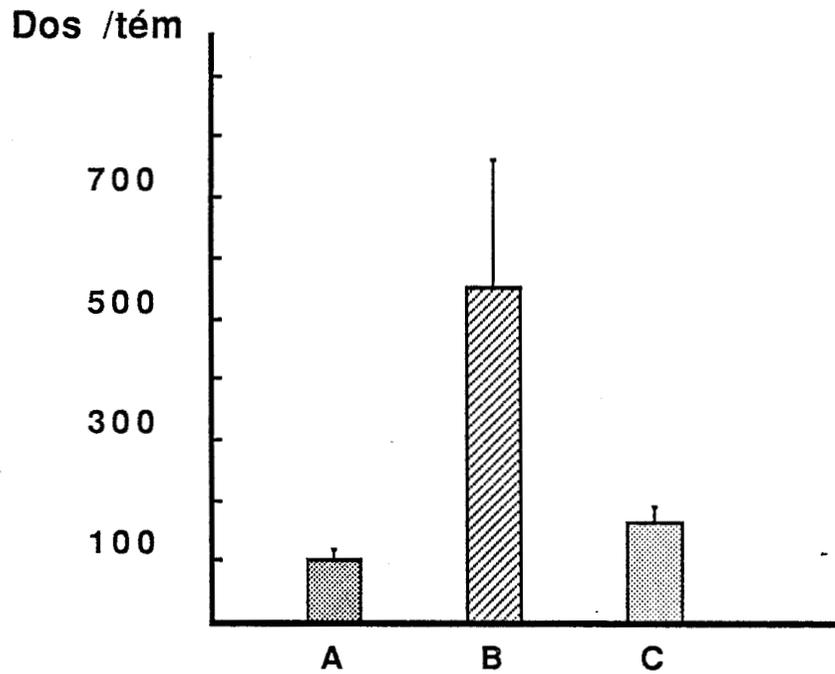


Figure 16 : Dosage de la noradrénaline dans la moelle épinière  
Dos/tém : dosage de la noradrénaline par rapport au témoin  
ramené arbitrairement à 100

A : Moelle cultivée seule ( n=5 )

B : Moelle cultivée en présence d'un blastème ( n=5 )

C : Moelle *in vivo* ( n=5 )



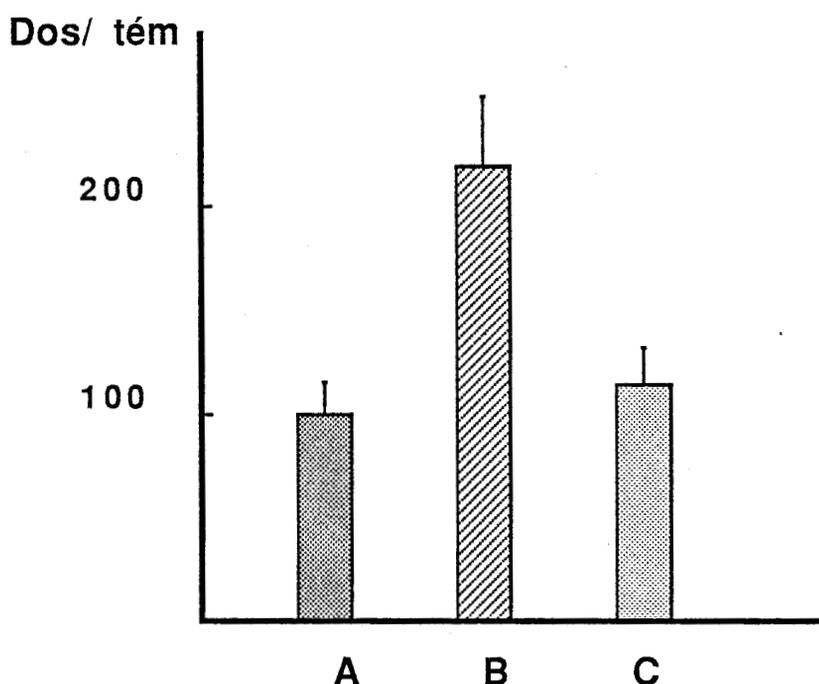


Figure 17 : Dosage de l'adrénaline dans la moelle épinière.

Dos / tém : dosage de l'adrénaline par rapport au témoin ramené arbitrairement à 100

A : Moelle cultivée seule ( n=5 )

B : Moelle cultivée en présence d'un blastème ( n= 5 )

C : Moelle *in vivo* ( n=5 )

#### b) Détection des enzymes synthétisant les monoamines

L'examen des coupes de moelle cultivée et traitées pour détecter les enzymes responsables de la biosynthèse des neuromédiateurs catécholaminergiques montre la présence de corps cellulaires de neurones marqués par les anticorps dirigés contre la DBH et la PNMT (Fig.18). Ces neurones ne semblent pas localisés dans une région précise de la moelle. Aucun corps cellulaire n'apparaît marqué par les immunoglobulines anti-TH seules quelques fibres sont sensibles à ces anticorps.



Figure 18 : Marquage des neurones par des immuno globulines anti DBH (X 450)

### **Activation des enzymes cholinergiques**

Rappelons que l'acétylcholine est formée à partir de choline et d'acétyl coenzyme A, la réaction étant catalysée par la choline acétyl transférase (CAT). Le catabolisme de l'acétylcholine catalysé par l'acétylcholinestérase (AChE) se traduit par la formation de choline et d'acétate. L'activité de la CAT est appréciée par la mesure de la quantité d'acétylcholine formée alors que celle de l'AChE l'est par la mesure de la quantité de choline formée.

La présence du régénérat à proximité de la moelle entraîne au niveau de celle-ci une augmentation respective de 33 et de 54% des activités choline acétyl transférasiques et cholinestérasiques (Tab. 9 et Fig. 19 et 20). Mesurées dans la moelle non cultivée d'individus adultes, ces activités sont tout à fait semblables à celles des moelle cultivées seules (pendant 72 h.).

	CAT	Stimulation	AChE	Stimulation
Culture témoin	2,035 ± 0,19	1	0,0272 ± 0,003	1
Co-culture	2,705 ± 0,2	1,33 *	0,0419 ± 0,004	1,54 *
Moelle <i>in vivo</i>	2,261 ± 0,18	1,1	0,0277 ± 0,003	1,02

Tableau 9 : activité enzymatique de la CAT et de l' AChE dans la moelle épinière cultivée seule (culture témoin), en présence d'un blastème (co-culture) ou *in vivo*

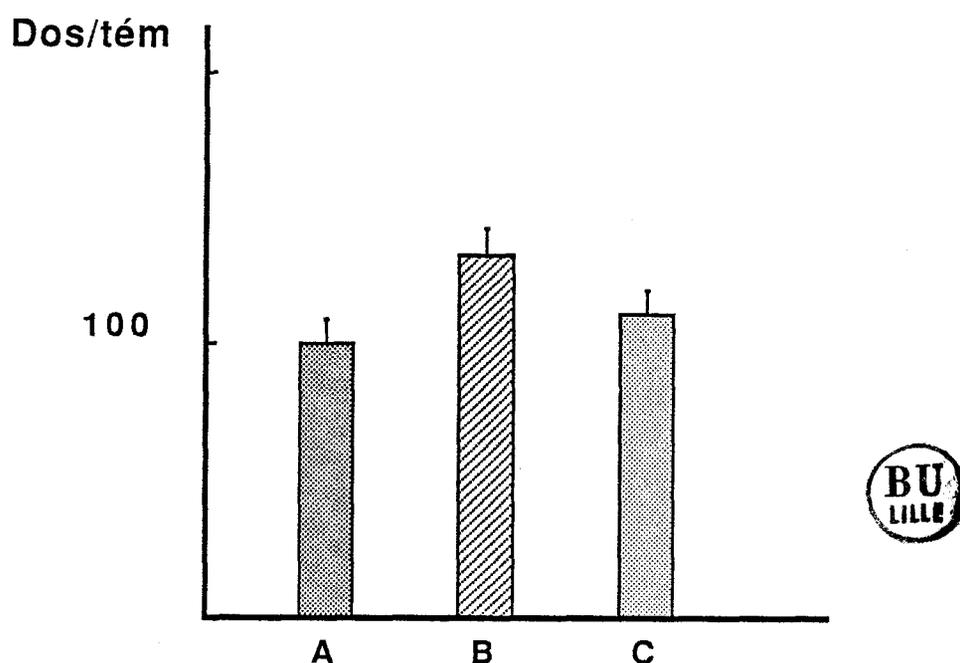


Figure 19 : dosage de l'activité de la CAT. Dos/tém : dosage de l'activité par rapport au témoin ramené arbitrairement à 100

A : Moelle cultivée seule ( n=5 )

B : Moelle cultivée en présence d' un blastème ( n=5 )

C : Moelle *in vivo* ( n=5 )

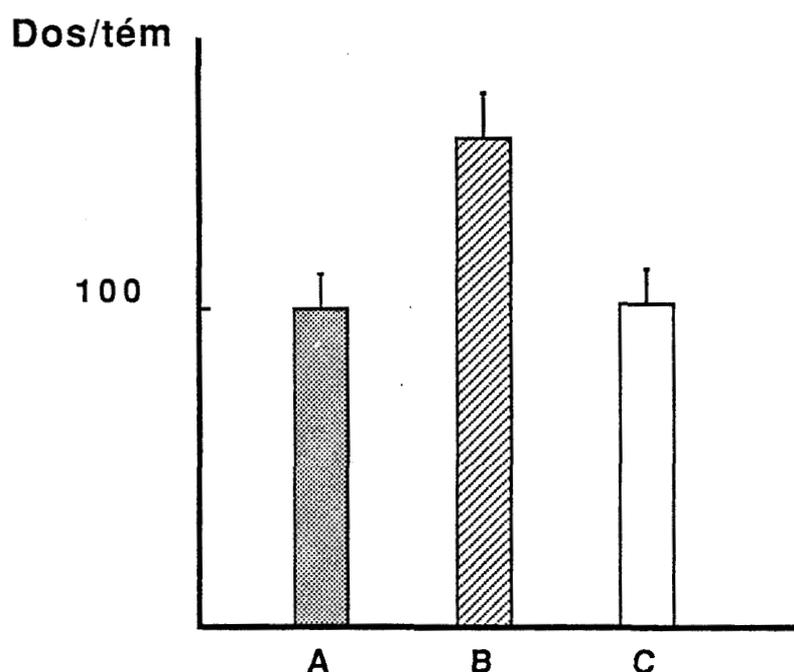


Figure 20 : dosage de l'activité de l'AChE dans la moelle épinière  
 Dos/tém : dosage de l'activité par rapport au témoin ramené  
 arbitrairement à 100

A : moelle cultivée seule ( n=3 )

B : moelle cultivée en présence d'un blastème ( n=3 )

C : moelle *in vivo* ( n=2 )

## DISCUSSION

L'augmentation du métabolisme des protéines et des neurotransmetteurs des explants nerveux co-cultivés constitue l'indice certain de la réponse réactogène spinale à la présence d'un régénérat de membre.

### 1- Synthèse des protéines

La stimulation du métabolisme protéinique est relativement faible (+49%) bien qu'un mélange d'acides aminés essentiels ait été utilisé pour augmenter la sensibilité de la mesure. La nature des cellules responsables de cette

augmentation n'a pas été définie et on ne peut exclure a priori la participation des cellules non neuronales telles que les cellules gliales et les cellules épendymaires à cette activation protéinique puisque ces cellules contrairement aux neurones post mitotiques de la moelle adulte de Pleurodèle continuent non seulement à synthétiser de l'ADN comme le prouvent les images immunofluorescentes après incorporation de BRdU dans les explants mais aussi à se diviser (Zamora, 1978). Cependant le fait que la synthèse d'ADN (appréciée par incorporation de thymidine 3H) des explants co-cultivés ne soit pas significativement supérieure à celle des cultures témoins laisse supposer que les cellules non neuronales contribuent peu voire pas du tout à l'augmentation de la synthèse protéinique spinale.

La croissance des fibres nerveuses tant dans la moelle témoin que dans la moelle co-cultivée nécessitent l'élaboration de matériaux cytoplasmiques et membranaires et il paraît vraisemblable de considérer la synthèse de protéines comme le facteur premier de la reconstruction de l'architecture cellulaire. Pollack et Muhlach (1982) attribuent effectivement l'augmentation de la synthèse protéique de moelle de têtard explanté d'un bourgeon de membre à la croissance des neurites obtenue dans ces conditions. De fait, la plupart des neurones en cours de régénération à la suite d'une amputation axonale synthétisent des protéines en quantité appréciable. C'est le cas notamment des cellules ganglionnaires de rétine de Poisson et des neurones hypoglosses de Rongeurs et de Lagomorphes (Aldskogius *et al.*, 1980 ; Murray, 1973 ; Murray et Grafstein, 1969). Les protéines synthétisées appartiennent à la fois au groupe des protéines à transport axonal rapide (Benowitz *et al.*, 1981 ; Heacock et Agranoff, 1982) et à celui à transport axonal lent (Giulan *et al.*, 1980 ; Heacock et Agranoff, 1976). Les protéines de la composante rapide sont encore largement inconnues, par contre, celles de la composante lente sont constituées essentiellement des molécules de la charpente cytosquelettique axonale, neurofilaments, microtubules et microfilaments d'actine (Grafstein, 1980). Tubuline, actine,

calmoduline sont quelques unes des protéines dont la synthèse est fortement augmentée lors de la régénération des fibres sensorielles (Heacock et Agranoff, 1976) ou motrices (Bisby, 1980 ; Hoffman et Lasek, 1980).

Les résultats que nous avons obtenus montrent d'une part qu'il existe chez les cultures témoins une relation de proportionnalité entre la synthèse de protéines et le nombre de fibres nerveuses formées mais que cette relation ne persiste pas dans les co-cultures moelle régénérat et d'autre part, que pour la plupart des explants co-cultivés (13/16), la synthèse protéinique n'est pas sensiblement différente de celle des explants cultivés seuls bien que le nombre et la longueur des fibres nerveuses dans l'un et l'autre cas soit très différents. L'absence de proportionnalité entre le nombre de neurites et le métabolisme protéinique des moelles co-cultivées indique que les protéines formées ne correspondent pas à la composante lente (caractéristique de l'élaboration du cytosquelette) mais plus vraisemblablement à la composante rapide du transport axonal. Celle-ci étant liée à l'élaboration initiale des neurites (McQuarrie et Grafstein, 1982), il n'est pas surprenant de constater qu'il puisse exister une relation proportionnelle entre la synthèse de protéines et le nombre de neurites lorsque ceux-ci sont peu nombreux et de petite taille comme dans les explants de moelle épinière cultivés seul. Par contre, lorsque la croissance des fibres nerveuses est importante comme dans les moelles co-cultivées, il est difficile de comprendre que cette croissance ait lieu sans synthèses protéiques. Cependant, des observations tout à fait comparables ont été réalisées au cours de la régénération des axones du ganglion de la racine dorsale de grenouille (Perry et Wilson, 1981) où les modifications morphologiques (des corps cellulaires) et biochimiques sont des plus discrètes. Dans ce cas, force est d'admettre que le niveau métabolique normal de ces tissus est suffisant pour permettre la régénération et que, par exemple, une augmentation de la vitesse d'assemblage du cytosquelette ou une diminution du turn-over de certains constituants cellulaires seraient alors plus importants qu'une augmentation de la synthèse

macromoléculaire (Grafstein, 1983).

La nature des protéines du transport axonal rapide n'est pas connue. Cependant, il a été montré (Skene et Willard, 1981) que certaines protéines associées à la croissance ou Growth Associated Proteins (GAP) et liées à la formation des neurones sont associées à un transport rapide. Notamment la GAP 43 se trouve en abondance dans les fibres du nerf optique de lapin nouveau-né mais disparaît rapidement lorsque la croissance est achevée. Aucune augmentation de cette protéine n'a été décelée après section du nerf optique adulte, incapable de régénérer. Par contre, cette même protéine apparaît dans le nerf hypoglosse de Lapin adulte (Skene et Willard, 1981a) ou du nerf optique de Crapaud (Skene et Willard, 1981b) qui sont quant à eux doués de propriétés régénératrices. De même, Müller *et al.*, (1985) ont montré qu'en réponse à une dénervation, la synthèse d'une protéine de 37 Kd (Skene et Shooter, 1983) est augmentée tant dans le système nerveux central (moelle) que périphérique (nerfs sciatique et optique) de rat adulte. La production de cette protéine est également plus importante dans les systèmes nerveux central et périphérique d'individus nouveaux-nés que d'individus adultes.

Des travaux ont été entrepris dans notre laboratoire (Scaps, 1986) dans le but de préciser la nature des protéines synthétisées au cours de la régénération axonale.

## 2- Synthèse des neurotransmetteurs

L'étude du métabolisme des explants de moelle mesuré à la fois par l'activité de la CAT qui produit l'ACh et de l'AChE qui dégrade l'ACh montre que la présence d'un régénérat stimule quelque peu l'activité cholinergique de la moelle explantée respectivement de 33 et 45% par rapport à un explant cultivé seul. Cette augmentation de l'activité cholinergique des explants n'est pas pour surprendre puisqu'il est classiquement reconnu que les cellules de la moelle épinière, cellules motrices et cellules préganglionnaires sensorielles et

sympathiques sont cholinergiques. La stimulation de la CAT que nous avons obtenue est tout à fait semblable à celle rapportée (+30%) par Pollack et Muhlach (1982) sur des cultures de moelle de larve de Grenouille cultivée en présence d'un bourgeon de membre indifférencié.

La comparaison des activités cholinergiques (CAT et AChE) des moelles cultivées seules avec celles de moelles non cultivées prélevées sur des animaux témoins montre une similitude tout à fait remarquable et suggère que la culture n'a pas pour effet de diminuer globalement le niveau métabolique des explants, diminution qui serait compensée par l'apport d'éléments nutritifs issus du régénérat mais que celui-ci a un effet neurotrope indépendant de la survie de l'explant nerveux.

Si la stimulation cholinergique d'explants de moelle ou de cellules nerveuses spinales co-cultivés en présence de tissu mésenchymateux (Giller *et al.*, 1977) n'est pas surprenante, il n'en va pas de même de l'augmentation de l'activité catécholaminergique que nous avons décelée dans nos explants par HPLC, méthode reconnue pour sa précision dans la séparation des catécholamines (Downer *et al.*, 1985). Cette augmentation, encore jamais signalée dans la littérature, concerne principalement la noradrénaline (x 5,5) et dans une moindre mesure l'adrénaline (x 2,2).

L'étude des catécholamines de la moelle épinière de Vertébrés n'a pas engendré un grand nombre de travaux ; cependant , il est maintenant parfaitement démontré que la moelle non seulement contient des catécholamines mais aussi et surtout qu'elle est capable de les synthétiser grâce à des cellules dont la présence révélée par histofluorescence et immunocytochimie est clairement montrée dans tous les groupes de Vertébrés étudiés.

Chez les Amphibiens, c'est à Kojima *et al.* (1978) que l'on doit d'avoir montré par action des vapeurs de formol (Falk et Hillarp, 1962) sur la moelle de Grenouille (*Rana catesbeiana*) la présence de varicosités fluorescentes (donc aminergiques) dans la région dorsale de l'axe cérébro-spinal. Par dosage

en HPLC, ces auteurs ont pu préciser qu'en fait l'ensemble du territoire spinal contient des catécholamines mais que la région dorsale par rapport à la région ventrale est 3 fois plus riche en adrénaline et 2 fois plus riche en noradrénaline (Kojima *et al.*, 1980). Par contre, la dopamine n'a pu être décelée. Ce dernier résultat concorde avec la plupart de nos mesures réalisées également en HPLC. Kojima *et al.* (1980) suggèrent que cette absence de dopamine serait due à un turn-over élevé de ce métabolite de la chaîne catécholaminergique le rendant par là même difficilement décelable. Dans les expériences que nous avons réalisées dans ce domaine, il faut préciser que dans 1 cas sur 6 nous avons pu déceler la présence de dopamine dans la moelle de Pleurodèle. Cette observation d'un cas favorable semblait confirmer la suggestion de Kojima *et al.* (1980) et indiquer que généralement la concentration en dopamine de la moelle est en quantité trop peu importante pour être décelée par les détecteurs habituels de l'HPLC. Or, récemment, l'utilisation d'un détecteur beaucoup plus sensible que celui que nous avons utilisé jusqu'alors a révélé la présence systématique de dopamine à faible concentration dans les échantillons de moelle testés.

L'origine des catécholamines de la moelle a souvent été recherchée dans les segments extra-spinaux et il a été proposé notamment pour les monoamines de Grenouille que celles-ci proviennent d'afférences rhombencéphaliques (Tohyama *et al.*, 1975) et des ganglions spinaux et de leur racine dorsale (Kojima *et al.*, 1981). Cependant, l'étude systématique de la moelle a révélé la présence de cellules spinales à catécholamines chez les Vertébrés. Ces cellules apparaissent très tôt au cours du développement. Chez *Ambystoma mexicanum*, Amphibien urodèle, les premiers neurones catécholaminergiques apparaissent au stade 41 dans la zone épendymaire de la moelle (Sims, 1977, Sims et Nichols, 1982). Ces cellules en relation avec le liquide cérébro-spinal persistent pendant toute la vie de l'animal bien que l'intensité de fluorescence des cellules adultes soit moins marquée que chez l'embryon. Curieusement, chez les Amphibiens, il a été montré que la corde

avant même le système nerveux contient des catécholamines (Sims, 1977). Ce résultat obtenu chez l'Ambystome a été retrouvé par Godin et Gipouloux (1985) chez l'embryon de Xénope. Récemment, Duprat *et al.* (1985) ont pu montrer également chez l'embryon de *Pleurodeles waltlii* et celui d'*Ambystoma mexicanum* qu'il existe déjà au stade de la plaque neurale des cellules (1 à 2%) devenant fluorescentes sous l'effet de l'acide glyoxilique témoignant de la présence de catécholamines. Ce pourcentage s'élève à 50% lorsque la technique plus sensible d'incorporation de dopamine 3H est employée. Cependant, à un stade aussi précoce, il est difficile d'affirmer que toutes les cellules à catécholamines de la plaque neurale participeront à l'édification de la seule moelle épinière de l'adulte. Néanmoins, il est hautement probable qu'une part d'entre elles participeront à l'architecture spinale. La détection par immunocytochimie de cellules contenant les enzymes de la chaîne catécholaminergique telles que TH, DBH et PNMT dans nos explants de moelle épinière confirme ce point de vue.

La présence de cellules monoaminergiques spinales n'est pas restreinte aux seuls Amphibiens, de telles cellules ont aussi été mises en évidence chez le Poisson *Lepisosteus* (Parent et Northcutt, 1982), chez les Reptiles comme le lézard *Varanus exanthematicus* (Wolters *et al.*, 1984) et chez les Mammifères au niveau de la corne ventrale de l'embryon de Rat (Commissiong, 1983). La large distribution des cellules catécholaminergique dans le phylum des Vertébrés pose le problème du rôle que jouent ces cellules et leur transmetteur dans la vie de l'animal. Force est de reconnaître que jusqu'à présent, celui-ci est totalement inconnu. Compte tenu des effets puissants de la L Dopa sur les mécanismes moteurs somatiques (Commissiong, 1981), Commissiong (1985) avance l'hypothèse que les catécholamines spinales joueraient un rôle crucial dans le contrôle des réflexes moteurs. Chez les Urodèles, la découverte de monoamines en quantité appréciable dans le blastème de régénérat du Triton (Taban *et al.*, 1978) a conduit Sicard (1983) à proposer un modèle synthétique des

mécanismes précoces de la régénération dans lequel les catécholamines constituent l'une des clés du bon déroulement de la régénération (voir conclusion générale).

Nous n'avons pas encore pu préciser la nature des cellules nerveuses à l'origine de la synthèse des catécholamines. Dans une étude préliminaire réalisée en marquant les cellules catécholaminergiques avec des anticorps dirigés contre les enzymes de synthèse, nous avons pu constater que les cellules marquées sont relativement peu nombreuses et qu'elles ne sont pas localisées dans une région particulière de la moelle bien que la déformation subie par ce tissu après culture (voir chapitre 1) rende sujette à caution cette interprétation. Néanmoins, la stimulation catécholaminergique de la moelle en présence d'un blastème de régénération se traduit histologiquement par la détection non équivoque de cellules immunocytochimiquement positives. L'apparition de ces cellules peut être interprétée en admettant que dans les conditions normales, le niveau d'activité synthétique des cellules catécholaminergiques est suffisamment bas pour échapper à la détection immunologique alors que la présence du blastème qui exacerbe l'activité synthétique de ces cellules permet leur détection. Cette interprétation n'exclue cependant pas la possibilité d'une augmentation de l'activité catécholaminergique due aux conditions de culture. En effet, il est maintenant bien démontré que l'environnement cellulaire conditionne la différenciation vers l'une ou l'autre des voies métaboliques conduisant à la formation des neurotransmetteurs (Le Douarin, 1982 ; Senssenbrenner *et al*, 1980). Il est vrai que la très grande majorité des observations découle de travaux réalisés sur des cultures de cellules isolées et donc totalement séparées de leur environnement tissulaire et qui plus est embryonnaires. Dans ce cas, la plasticité neuronale reste suffisante pour que l'expression du neurotransmetteur puisse être modulée en fonction de l'environnement cellulaire (milieu de culture, co-culture). Cependant, il a été montré que des neurones sympathiques dissociés à partir de rat âgés de 1 à 3 jours, époque à laquelle *in situ* les cellules ont

exprimé le choix du neurotransmetteur (Black, 1978) sont capables d'une dédifférenciation suffisante pour exprimer la synthèse d'un neurotransmetteur accordé à leur environnement cellulaire. Cultivé en l'absence de cellules non nerveuses, ces cellules accumulent de la noradrénaline alors qu'en présence de cellules non nerveuses, elles accumulent de l'acétylcholine (Patterson et Chun, 1977). En culture d'explant, l'environnement cellulaire des neurones est certainement beaucoup plus respecté qu'en culture cellulaire, néanmoins il n'est pas exclu que ces conditions particulières favorisent l'expression d'un neurotransmetteur qui dans les conditions normales serait réprimé.

## **CHAPITRE III**

## CHAPITRE III

### INTRODUCTION

Dans nos conditions de culture décrites dans le 1er chapitre, la distance séparant le blastème de régénération et le fragment de moelle épinière implique que l'action du régénérat sur le tissu nerveux ne peut s'exercer que par l'intermédiaire d'une substance chimique. Cette molécule, issue du massif mésenchymateux, serait responsable de la survie des cellules nerveuses, de la croissance des neurites spinaux ainsi que de la stimulation du métabolisme neural tel que celui des protéines et des neurotransmetteurs cholinergiques et catécholaminergiques (voir chapitre II). Toutes les hypothèses du mode d'action d'un facteur de croissance nerveuse sont basées sur les connaissances d'une substance biochimiquement définie appelée NGF (voir Levi-Montalcini, 1968, Cohen, 1960) dont les effets neurotropes ne sont sensibles que sur les tissus nerveux embryonnaires sensitif et sympathique. Il semble donc que le NGF ne puisse être identifié au facteur neurotrope mésenchymateux du blastème comme nous l'avons montré dans le 1er chapitre. Afin de déterminer la nature de ce facteur et d'ébaucher son mécanisme d'action, des extraits de régénérat ainsi que des milieux conditionnés par des blastèmes de membre au stade cône sont réalisés et testés *in vitro* sur des fragments de moelle épinière. Ce sont les résultats de ces tests que nous présentons dans ce chapitre.

## TECHNIQUES

### 1°) Préparation du milieu conditionné

Le conditionnement du milieu de culture par les sécrétions d'un blastème a été réalisé en cultivant par paire des régénérats de membre au stade cône. Les blastèmes, séparés de 2 à 3 mm l'un de l'autre, sont cultivés en immersion directement sur le fond de la boîte de Pétri pendant 48 heures.

Après ce laps de temps, le milieu de culture est recueilli. Un volume égal de milieu n'ayant pas été utilisé pour la culture est ajouté afin de remédier partiellement aux pertes d'éléments nutritifs consécutifs à la culture des blastèmes tout en évitant une trop forte dilution du facteur diffusible issu du blastème.

En 1ère approximation, on peut considérer que le milieu est donc conditionné par un blastème. Ce milieu, ainsi obtenu, est testé immédiatement sur des cultures de fragments de moelle épinière.

### 2°) Préparation de l'extrait de blastème

Des blastèmes sont prélevés et broyés grâce à un homogénéiseur (Potter) dans une solution inhibitrice de protéases maintenue à 0°C par de la glace fondante. Cette solution est constituée d'un tampon phosphate sans magnésium ni calcium pH 7,5 comprenant 5 mM/ml d'EDTA (Sigma), 4 mM/ml d'EGTA (Sigma), 20 TUI/ml d'aprotinine (Sigma), 1 µg/ml de pepstatine (Sigma), 10 µg/ml d'antipaïne (Sigma), 10 µg/ml de leupeptine (Sigma) et 1 mM/ml de phenyl méthyl sulfonyl fluoride, PMSF (Sigma) dilué dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO).

Après centrifugation à 10 000 g pendant une heure à 4°C, le surnageant claire est recueilli puis stérilisé sur filtre Swinnex (taille des pores

0,22  $\mu\text{m}$ ). La concentration en protéines est évaluée par la méthode de Lowry (voir dosage des protéines chapitre II).

### 3°) Traitement enzymatique

Le milieu conditionné par un blastème de régénération au stade cône est soumis à l'action de la papaine greffée sur des billes d'agarose (Sigma, activité 5000 Unités BAEE par minute et par gramme d'Agarose) à la concentration de 5 % pendant 30 mn à 30°C. Le mélange est agité pendant toute la durée du traitement puis la papaine insoluble est éliminée par filtration sur papier Swinnex (diamètre des pores 0,45  $\mu\text{m}$ ).

Le milieu conditionné est aussi traité par la trypsine à la concentration de 0,5 % (Difco, activité 1/250) pendant 30 mn à 37°C. L'activité enzymatique de la trypsine est ensuite détruite par l'adjonction de 1 % d'inhibiteur issu du soja (Calbiochem, activité 19000 Unités BAEE d'inhibition par mg de matière). Cet inhibiteur, qu'il soit associé ou non à l'enzyme, ne modifie pas le comportement des explants nerveux en culture.

### 4°) Détermination du poids moléculaire du facteur neurotrope

La détermination approximative du poids moléculaire du facteur neurotrope issu du blastème a été entreprise par dialyse du milieu conditionné. Cette dialyse est réalisée grâce à des boudins à dialyse (Poly labo).

#### a) Stérilisation des boudins à dialyse

Le traitement subi par les boudins à dialyse a pour but de les stériliser et de détruire toute présence éventuelle de protéases.

Les boudins à dialyse sont maintenus pendant 10 mn dans 3 bains.

successifs dont la température est de 60°C. Le 1er bain est composé par 2% de carbonate de sodium, le second d'eau bidistillée stérile le troisième d'EDTA à 2 mM/ml. Enfin les boudins baignent pendant 24 heures dans une solution d'isopropyl contenant 200 mM/ml de PMSF puis dans une solution de nitrate de sodium contenant 1 % de PMSF.

Après plusieurs lavages dans de l'eau bidistillée stérile, les boudins sont stockés à 4°C dans le dernier bain de lavage. Ils sont, ensuite, manipulés à l'aide de gants chirurgicaux stériles.

#### b) Dialyse du milieu conditionné

Deux types de boudins à dialyse sont utilisés. Le premier retient toutes molécules dont le poids moléculaire est supérieur à 15000 daltons et le deuxième boudin retient les molécules dont le poids moléculaire est supérieur à 8000 daltons.

Le milieu conditionné est placé à l'intérieur du boudin lui-même entreposé dans un tube Ependorf stérile contenant le milieu de culture rendu hypotonique par addition de 10 % d'eau bidistillée stérile. Dans ce milieu sont omis le glucose et la glutamine. Après 24 heures à 4°C les deux milieux sont recueillis et testés. Préalablement le milieu hypotonique est ramené à une pression osmotique identique à celle du milieu conditionné. La glutamine et le glucose sont également rajoutés.

## RESULTATS

### Influence du milieu conditionné

Afin d'apprécier les effets du milieu conditionné sur la croissance des

fibres nerveuses, des associations de moelle épinière ont été réalisées avec un blastème ou avec le milieu conditionné. Les résultats obtenus après 72 heures de culture montrent que le milieu permet d'augmenter fortement le nombre de fibres nerveuses spinales néoformées par rapport au nombre de neurites obtenu à partir de fragments de moelle épinière cultivés seuls. Par contre, aucune différence significative n'est décelable entre les effets neurotropes du milieu conditionné et ceux du blastème cultivé à peu de distance de l'explant nerveux (Tab. 10, Fig. 21).

	Nombre de fibres	Stimulation
Culture témoin	69,5 ± 24,3	1
Co-culture	495 ± 99	7,12 *
Milieu conditionné	535,4 ± 108,3	7,7 *

Tableau 10: Influence du milieu conditionné sur le nombre de neurites de la moelle épinière par rapport à une moelle cultivée seule ( culture témoin ) ou en présence d'un blastème( co-culture)



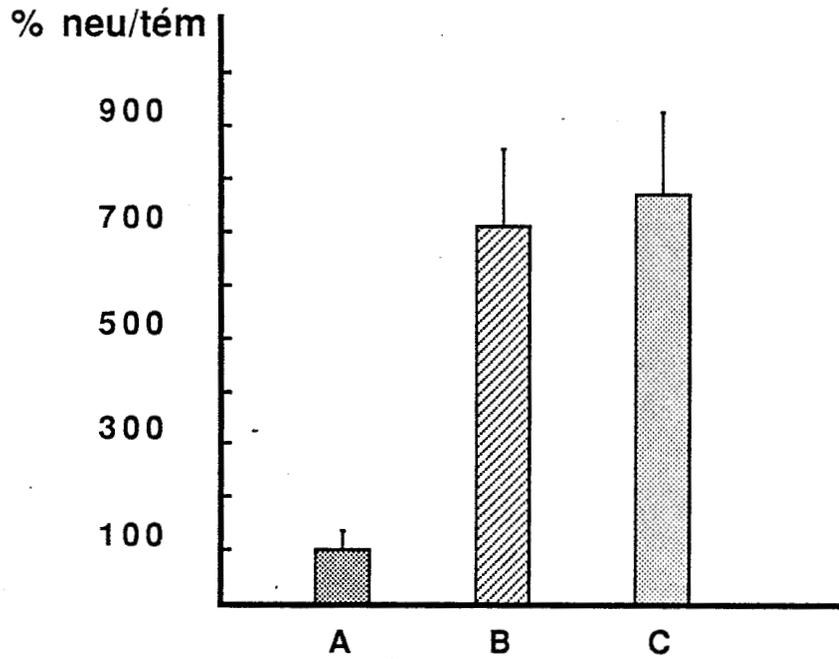


Figure 21: Stimulation exprimée en pourcentage par rapport au témoin ramené arbitrairement à 100 ( % neu/tém ) de la croissance des neurites de la moelle épinière en présence du milieu conditionné ou d'un blastème

A : moelle cultivée seule ( n=10 )

B : moelle cultivée en présence d'un blastème ( n=10 )

C : moelle cultivée avec le milieu conditionné ( n=10 )



### Influence de protéines témoins

Afin de comparer l'influence du BNTF à celles de protéines diverses sur la croissance des fibres nerveuses, des cultures de moelle épinière associée ou non à des régénérats ont été réalisées soit en présence du milieu habituel soit en présence d'un milieu à base de Leibovitz L15 dilué à 70 % additionnée de 0,035 U/ml d'insuline (Sigma) et 10 % de sérum de veau foetal (SVF) ou de sérum albumine bovine (SAB).

Après 72 heures de culture le SVF ou la SAB ne stimulent pas la croissance des fibres nerveuses par rapport à la culture témoin. De même, le SVF en présence d'un blastème ne permet pas d'augmenter l'effet neurotrophe obtenu par un blastème en présence du milieu habituel (Tab. 10, Fig. 22).

	Nombre de fibres	Stimulation
Culture témoin	63,4 ± 29,3	1
Co-culture	378,6 ± 123,4	5,97 *
Moelle + SVF	57,5 ± 21,4	0,91
Moelle + SVF + blastème	387,8 ± 112,5	6,12 *
Moelle + SAB	65,5 ± 23,4	1,03

Tableau 10 : Influence du facteur neuronotrophique ( BNTF ) sur la croissance des neurites de la moelle épinière par rapport à des protéines témoins ( SAB, SVF )

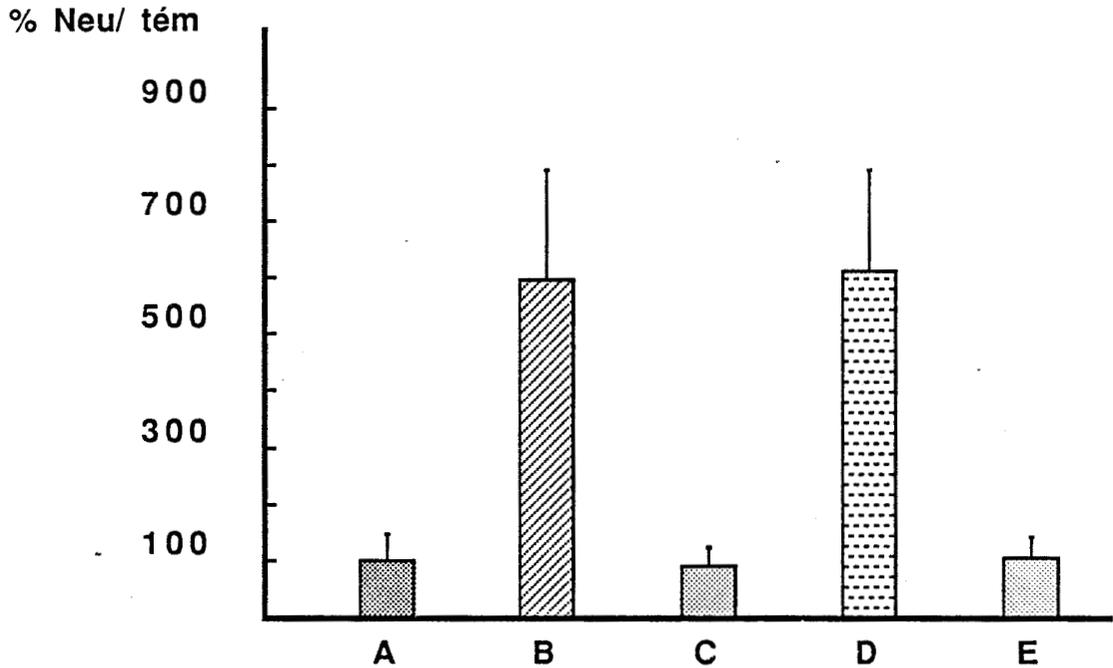


Figure 22 : Stimulation de la croissance des neurites de la moelle épinière par le BNTF ou des protéines témoins par rapport au témoin ramené arbitrairement à 100 (% Neu/tém)

A : Moelle cultivée seule ( n=10 )

B : Moelle cultivée en présence d' un blastème ( n=10 )

C : Moelle cultivée en présence de SVF ( n=10 )

D : Moelle cultivée en présence d'un blastème et de SVF ( n=10 )

E : Moelle cultivée en présence de SAB ( n=10 )

### Dilution du milieu conditionné

Le milieu conditionné est obtenu en cultivant dans chaque boîte de Pétri 4 blastèmes de régénération . Après dilution, ce milieu est alors 2 fois plus concentré que le milieu conditionné standard. Après des dilutions variables, le

milieu est ensuite testé pendant 72 heures sur des fragments de moelle épinière. Les résultats montrent que le nombre des fibres nerveuses néoformées croît avec la concentration de protéines blastémales contenue dans le milieu pour atteindre un plateau correspondant au conditionnement équivalent à 1,5 blastèmes (Tab. 11, Fig. 23).

	Concentration du milieu	Nombre de fibres	Stimulation
Culture témoin	—	81,6 ± 22,4	1
Milieu conditionné	100%	769 ± 115,4	9,42 *
	75%	772,6 ± 192,5	9,47 *
	50%	720,5 ± 169	8,83 *
	25%	429,5 ± 123,8	5,26 *
	10%	106,5 ± 44,6	1,3

Tableau 11 : Influence de la dilution du milieu conditionné sur la croissance des neurites de la moelle épinière. 100% correspond à un milieu conditionné par 2 blastèmes



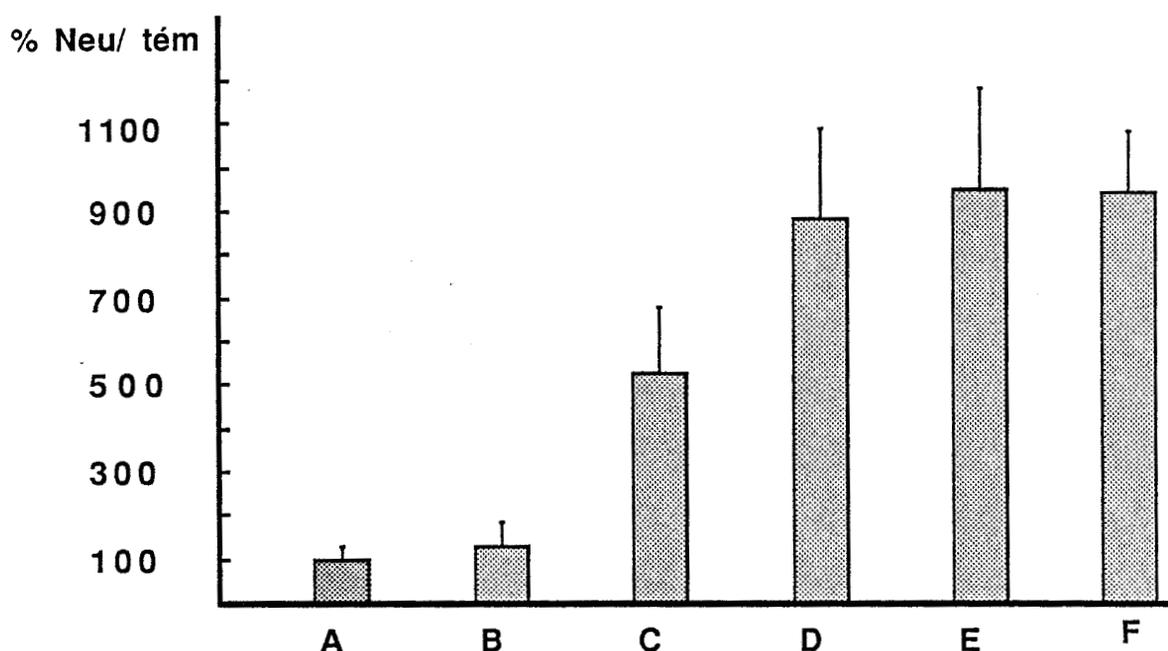


Figure 23 : Influence de la dilution du milieu conditionné sur la croissance des neurites de la moelle épinière par rapport au témoin.

A : Moelle cultivée seule ( n=8 )

B à F : Moelle cultivée en présence du milieu conditionné (B = 10 %,

C = 25 %, D = 50 %, E = 75 %, F = 100 %) (n = 8)

### Effet d'un extrait de blastème

Une quantité d'homogénat limpide résultant de la centrifugation d'un broyat de blastèmes est ajouté au milieu de culture. La concentration finale en protéines de l'extrait est de  $2,7 \mu\text{g/ml}$  ce qui correspond à la concentration en protéines du surnageant d'1 blastème. Le milieu contenant l'extrait est immédiatement testé sur des fragments de moelle épinière. Des cultures de tissus nerveux associées ou non à des régénérats sont également réalisées afin de comparer leur effet neurotrope à celui de l'extrait. Après 72 heures de culture,

l'extrait blastémal augmente fortement le nombre des neurites issus de l'explant nerveux par rapport à celui obtenu à partir de fragment de moelle épinière cultivé seul. Cette activité neurotrope de l'extrait est similaire à celle du blastème cultivé à peu de distance du régénérat (Tab. 12, Fig. 24).

	Nombre de fibres	Stimulation
Culture témoin	88,8 ± 26,4	1
Co-culture	559,4 ± 183,5	6,3 *
Extrait de blastèmes	622,2 ± 145,4	7 *



Tableau 12: Stimulation de la croissance des neurites de la moelle épinière par un blastème ou par un extrait de blastème

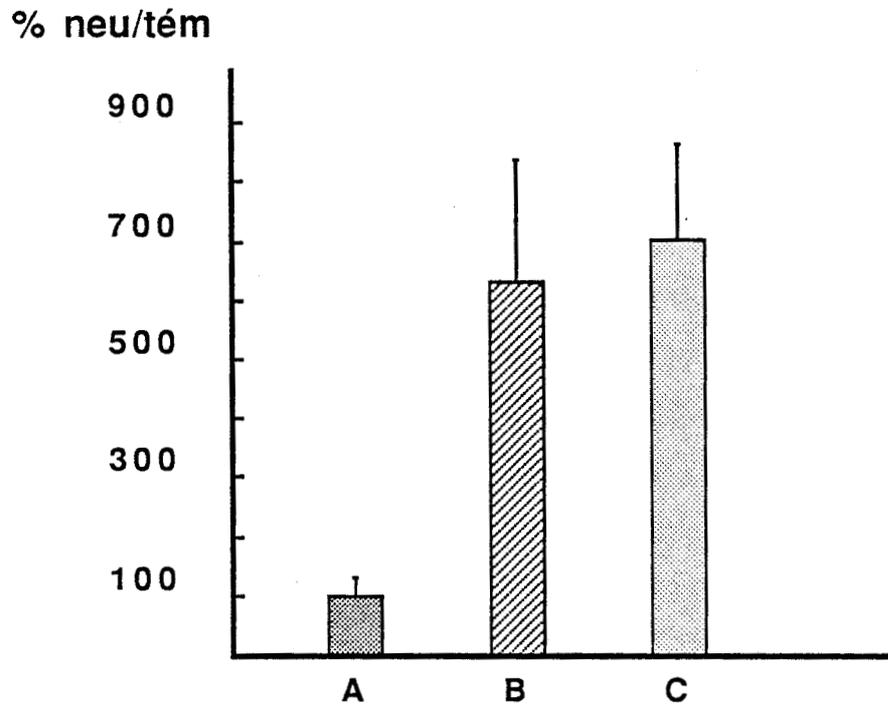


Figure 24 : Histogramme indiquant la stimulation en pourcentage de la croissance des neurites de la moelle épinière par un blastème ou un extrait de blastèmes par rapport au témoin ramené arbitrairement à 100 (%neu/ tém )

A : moelle cultivée seule ( n=16 )

B : moelle cultivée en présence d'un blastème ( n= 16 )

C : moelle cultivée en présence de l'extrait de blastème ( n=16 )

### Mode d'action du facteur neurotrope

#### 1°) Effet du milieu conditionné et de la boîte conditionnée

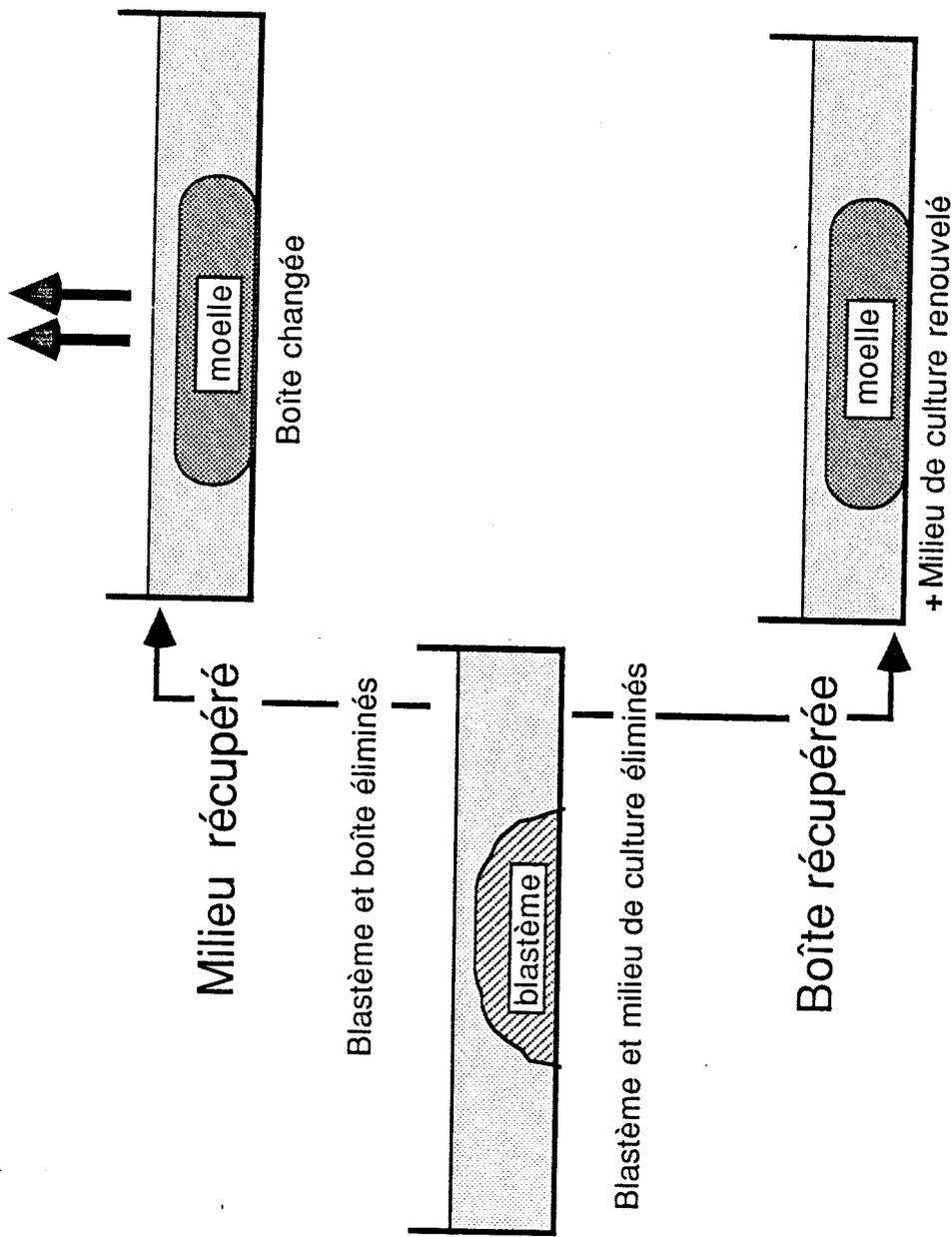
Le milieu conditionné par un régénérat ainsi que l'extrait blastémal sont capables de promouvoir la croissance des neurites spinaux grâce à la

présence d'une molécule chimique, le BNTF. Ce facteur neurotrophe peut correspondre soit à une substance d'attachement permettant la migration des cônes de croissance des fibres nerveuses, soit à une substance agissant directement ou indirectement sur le métabolisme neural.

Pour discriminer ces deux hypothèses, des blastèmes sont cultivés par paire afin d'obtenir un milieu conditionné. Les blastèmes sont ensuite éliminés et leur position sur le fond de la boîte de culture repérée. Des fragments de moelle épinière sont alors cultivés pendant 72 heures sur le fond des boîtes ayant servi au conditionnement du milieu à 1 mm des repères marquant la position des blastèmes et en présence du milieu habituel ou dans des boîtes de culture vierges en présence du milieu conditionné (Fig. 25). Des cultures témoins de moelle épinière ainsi que des co-cultures blastème-tissu nerveux sont également réalisées .

Le milieu conditionné permet de stimuler significativement la croissance des neurites spinaux néoformés par rapport à la culture témoin et aussi par rapport aux fragments de moelle épinière cultivés sur le fond des boîtes de culture ayant servies à la préparation du milieu conditionné (Tab. 13, Fig. 26). Le nombre de neurites issus des explants nerveux cultivés sur le plastique des boîtes conditionnées est similaire à celui de la culture témoin.

Croissance des fibres nerveuses



Pas de croissance des fibres nerveuses

Fig. 25 : Etude de l'influence respective du milieu conditionné et de la boîte conditionnée par un blastème

	Nombre de fibres	Stimulation
Culture témoin	81,6 ± 12,4	1
Co-culture	587,3 ± 113,3	7,19 *
Milieu conditionné	655 ± 99,6	8,02 *
Boîte conditionnée	86,3 ± 21,5	1,06

Tableau 13 : Influence du conditionnement de la boîte de culture ou du milieu de culture sur la croissance des neurites de la moelle épinière



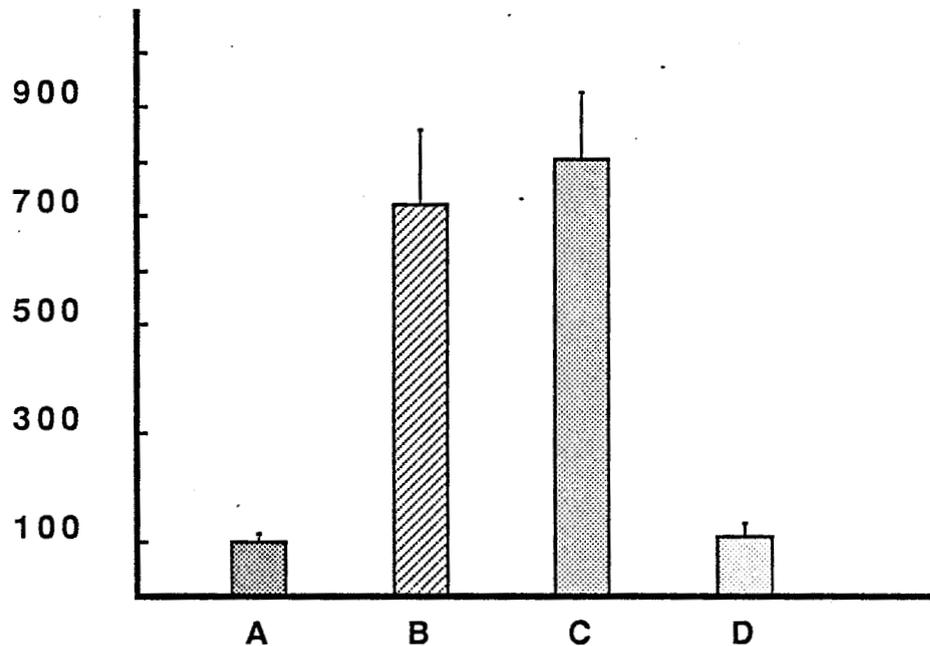


Figure 26 : Influence en pourcentage du conditionnement de la boîte de culture ou du milieu de culture sur la croissance des neurites de la moelle par rapport au témoin ramené arbitrairement à 100

A : moelle cultivée seule ( n=10 )

B : moelle cultivée en présence d'un blastème ( n=10 )

C : moelle cultivée en présence du milieu conditionné ( n=10 )

D : moelle cultivée en présence du substrat conditionné ( n=10 )

## 2°) Rôle du substrat

Bien que la croissance des fibres nerveuses néoformées issues de la moelle épinière dépende d'un facteur neurotrope qui n'est pas déposé sur le fond de la boîte de culture, la nature du substrat utilisé pour la culture peut, éventuellement, agir sur la formation des neurites spinaux. Dans le but de vérifier cette hypothèse des cultures d'explants nerveux associés ou non à un blastème de régénération sont réalisées pendant 72 heures sur différents substrats : le plastique de la boîte de culture (Primaria), le collagène type VII de Sigma (collagène de queue de rat type I) la poly L lysine ou encore la laminine.

Quel que soit le substrat, le blastème de régénération permet de stimuler la croissance des fibres nerveuses spinales. Par contre aucune différence significative n'est décelable entre les différents substrats en ce qui concerne le nombre de prolongements nerveux néoformés issus de la moelle épinière que celle-ci soit cultivée seule ou en présence du régénérat (Tab.13 et 14 , Fig. 27 et 28).

	Nombre de fibres	Stimulation
Plastique	84,7 ± 27,2	1
Collagène	79,5 ± 24,3	0,94
Poly L Lysine	75,3 ± 32	0,89
Laminine	86,4 ± 19,6	1,02



Tableau 13 : influence de substrats divers sur la croissance des neurites de la moelle épinière cultivée seule

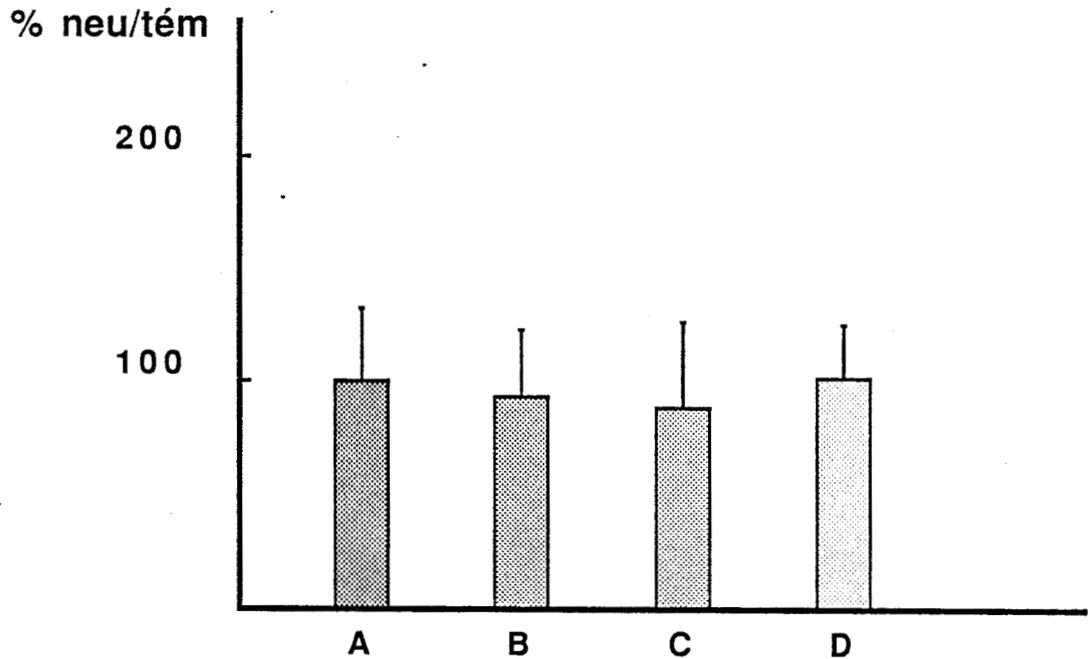


Figure 27 : Influence du substrat sur la culture de moelle épinière seule en pourcentage par rapport au témoin ramené arbitrairement à 100 ( %neu/tém )

A : moelle cultivée sur plastique Primaria ( n=16 )

B : moelle cultivée sur collagène type VII ( n=16 )

C : moelle cultivée sur poly L lysine ( n=16 )

D : moelle cultivée sur lamine ( n= 16 )

	Nombre de fibres	Stimulation
Plastique	409,5 ± 84	1
Collagène	372,6 ± 91,2	0,91
Poty L Lysine	363,7 ± 101,1	0,89
Laminine	417,5 ± 111,5	1,02



Tableau 14 : Influence de substrats divers sur la croissance des neurites de la moelle épinière cultivée en présence d'un blastème

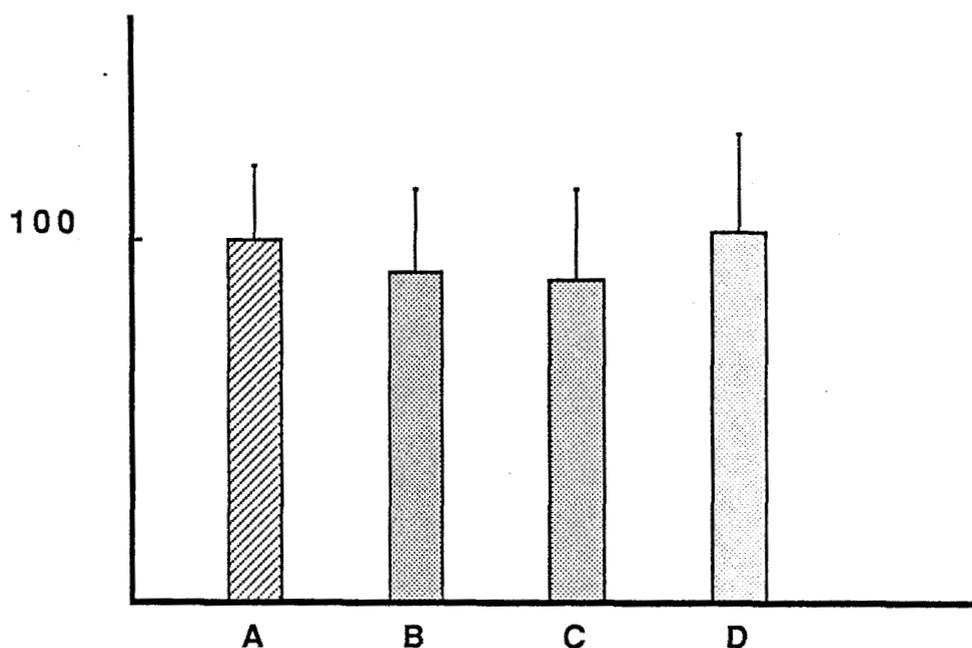


Figure 28 : Influence du substrat sur la culture de la moelle épinière en présence d'un blastème par rapport au témoin ramené arbitrairement à 100 ( % neu/ tém )

A : moelle cultivée sur plastique primaria ( n=16 )

B : moelle cultivée sur collagène type VII ( n=16 )

C : moelle cultivée sur poly L lysine ( n=16 )

D : moelle cultivée sur laminine ( n=16 )

## Nature du facteur

### 1°) Action enzymatique

Le milieu conditionné par un blastème est divisé en 3 lots. Au premier de ces lots est ajouté de la papaïne insoluble. La suspension ainsi obtenue est ensuite agitée pendant 30 mn à une température de 30° C. Le deuxième lot est soumis à l'action de la trypsine pendant 30 mn à 37 °C. Le 3ème lot sert de témoin.

L'activité enzymatique est ensuite bloquée grâce à un inhibiteur de

trypsine provenant du soja. Les différents lots sont ensuite testés *in vitro* sur des fragments de moelle épinière. Une culture de fragments nerveux servant de témoin est également réalisée 72 heures après le début des différentes cultures, les dénombrements de fibres nerveuses spinales montrent que la trypsine diminue de 50 % l'effet neurotrope du milieu conditionné tandis que le traitement à la papaïne insoluble inhibe totalement cet effet (Tab. 15, Fig. 29).

	Nombre de fibres	Stimulation
Culture témoin	71,6 ± 27,4	1
Co-culture	375 ± 95,4	5,28 *
Papaïne	84 ± 33,3	1,17
Trypsine	179,6 ± 68	2,5 *

Tableau 15 : Influence de la papaïne et de la trypsine sur le milieu conditionné

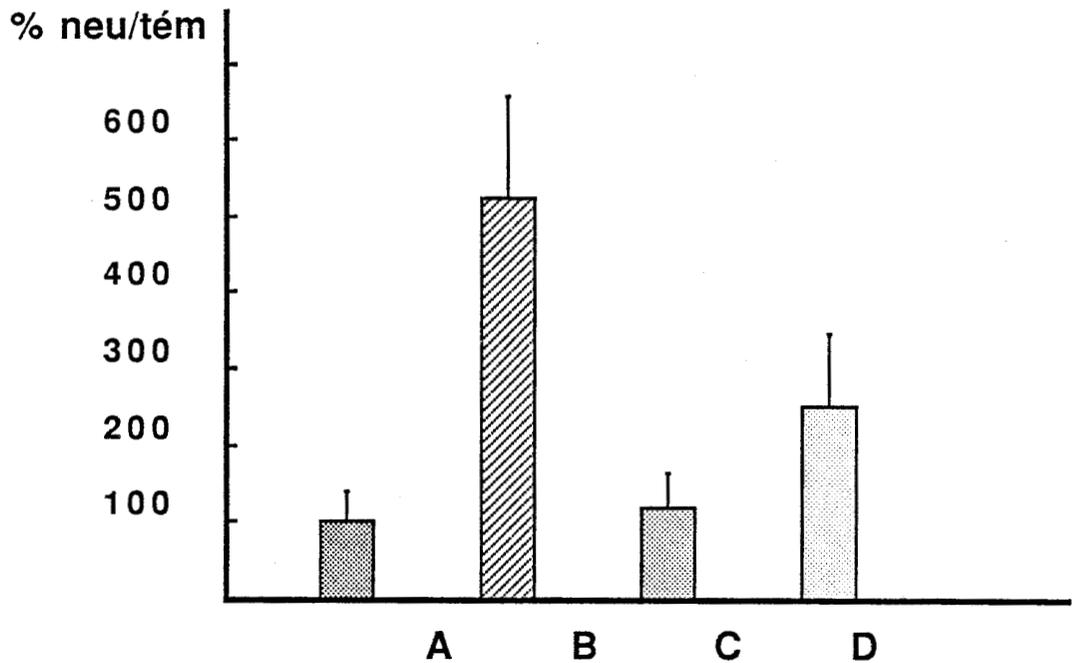


Figure 29 : Influence de la papaïne et de la trypsine sur l'activité neurotrophe du milieu conditionné en pourcentage par rapport au témoin ramené arbitrairement à 100 ( % neu/ tém )

A : moelle épinière cultivée seule ( n=10)

B : moelle cultivée en présence du milieu conditionné ( n=10 )

C : effet de la papaïne sur le milieu conditionné ( n=10 )

D : effet de la trypsine sur le milieu conditionné ( n=10 )

## 2°) Thermolabilité

Le milieu conditionné par un régénérat est soumis soit à l'action de la chaleur pendant 20 mn aux températures de 60°C ou de 90°C soit à la congélation à -20°C pendant 15 jours. Les différentes solutions obtenues après les traitements sont testées sur des fragments de moelle épinière en culture. Afin d'apprécier les effets des différents traitements, les cultures habituelles

d'explants nerveux sont réalisées.

Les résultats obtenus montrent que le traitement du milieu conditionné à 90°C permet d'inhiber l'effet neurotrope de celui-ci alors qu'une température de 60°C diminue de 45 % l'action du facteur neurotrope ; la congélation, quant à elle, ne modifie pas l'effet du BNTF (Tab.16, Fig.30).

	Nombre de fibres	Stimulation
Culture témoin	98,3 ± 41,5	1
Milieu conditionné	428 ± 79	4,36 *
Chaleur 60°C	237,4 ± 89,1	2,42 *
Chaleur 90°C	91,4 ± 42,4	0,92
Congélation 15 jours	397,5 ± 101,4	4,1 *



Tableau 16 : Influence de la température sur le milieu conditionné

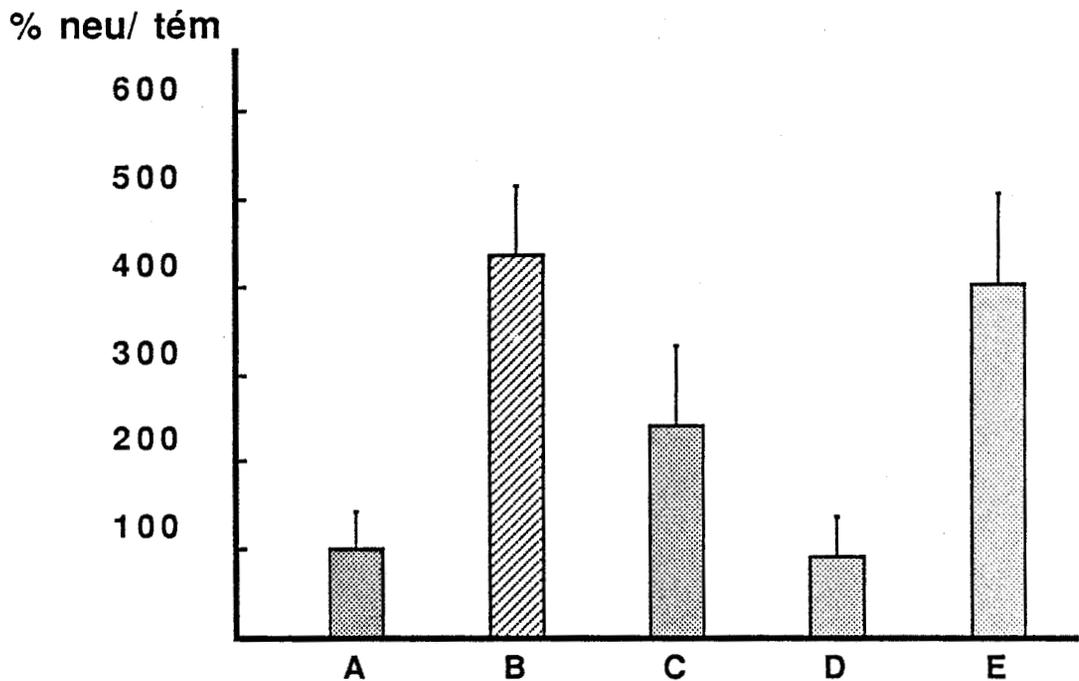


Figure 30: Influence de la température sur l'activité neurotrophe du milieu conditionné en pourcentage par rapport au témoin ramené arbitrairement à 100 (% neu/ tém)

A : moelle cultivée seule ( n=10 )

B : moelle cultivée en présence du milieu conditionné ( n=10 )

C : effet de la chaleur à 60°C pendant 20 mn sur le milieu conditionné ( n=10 )

D : effet de la chaleur à 90°C pendant 20 mn sur le milieu conditionné ( n=10 )

E : effet de la congélation sur le milieu conditionné ( n=10 )

### Poids moléculaire du BNTF

L'évaluation approchée du poids moléculaire du BNTF a été établie en dialysant le milieu conditionné par des boudins à dialyse.

Le milieu conditionné standard est divisé en 3 lots. Le premier lot est placé dans un boudin à dialyse laissant passer les molécules de poids inférieur à 15000 daltons. Le deuxième lot est placé dans un boudin à dialyse laissant passer

des molécules dont le poids est inférieur à 8000 daltons. Après une dialyse de 24 heures à 4°C, les milieux internes (protéines non dialysées) et externes (protéines dialysées) sont recueillis et testés immédiatement sur des fragments de moelle épinière pendant 72 heures. Les effets neurotropes de ces milieux sont comparés à ceux d'une culture de moelle épinière seule (culture témoin) ou en présence du troisième lot (milieu conditionné brut)

Les résultats obtenus (Tab.17 et 18, Fig. 31 et 32) montrent que les protéines dialysées obtenues par un boudin à dialyse laissant passer les molécules de poids inférieur à 15000 daltons sont capables de stimuler la croissance des neurites spinaux. Par contre les protéines obtenues par un boudin laissant passer des molécules de poids inférieur à 8000 daltons sont incapables de promouvoir la croissance de ces neurites.

	Nombre de fibres	Stimulation
Culture témoin	94,5 ± 38,4	1
Milieu conditionné	623,6 ± 165,5	6,6 *
Protéines dialysées	389,5±111	4,12 *
Protéines non dialysées	349,6 ± 104,5	3,7 *

Tableau 17 : Stimulation de la croissance des neurites de la moelle épinière par les protéines issues de la dialyse du milieu conditionné réalisée grâce à un boudin laissant passer les molécules de poids inférieur à 15000 d.

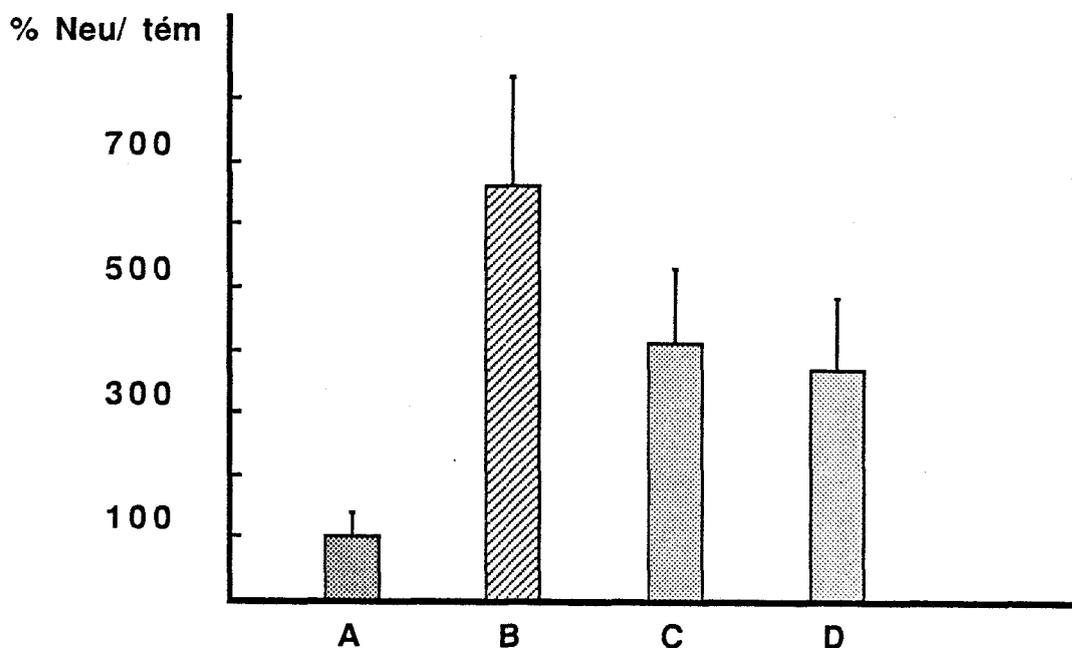


Figure 31 : Stimulation de la croissance des neurites de la moelle épinière par un blastème ou les protéines dialysées ou non par un boudin laissant passer les molécules de poids inférieur à 15000 d.

A : Moelle cultivée seule ( n=16 )

B : Moelle cultivée en présence d'un blastème ( n=16 )

C : Moelle cultivée en présence des protéines dialysées ( n=16 )

D : Moelle cultivée en présence des protéines non dialysées ( n=16 )

	Nombre de fibres	Stimulation
Culture témoin	99,4 ± 41	1
Milieu conditionné	720 ± 169	7,24 *
Protéines dialysées	109,9 ± 48,4	1,1
Protéines non dialysées	686 ± 172,4	6,9 *



Tableau 18: Stimulation de la croissance des neurites de la moelle épinière par les protéines issues de la dialyse du milieu conditionné réalisée grâce à un boudin laissant passer les molécules de poids inférieur à 8000 d.

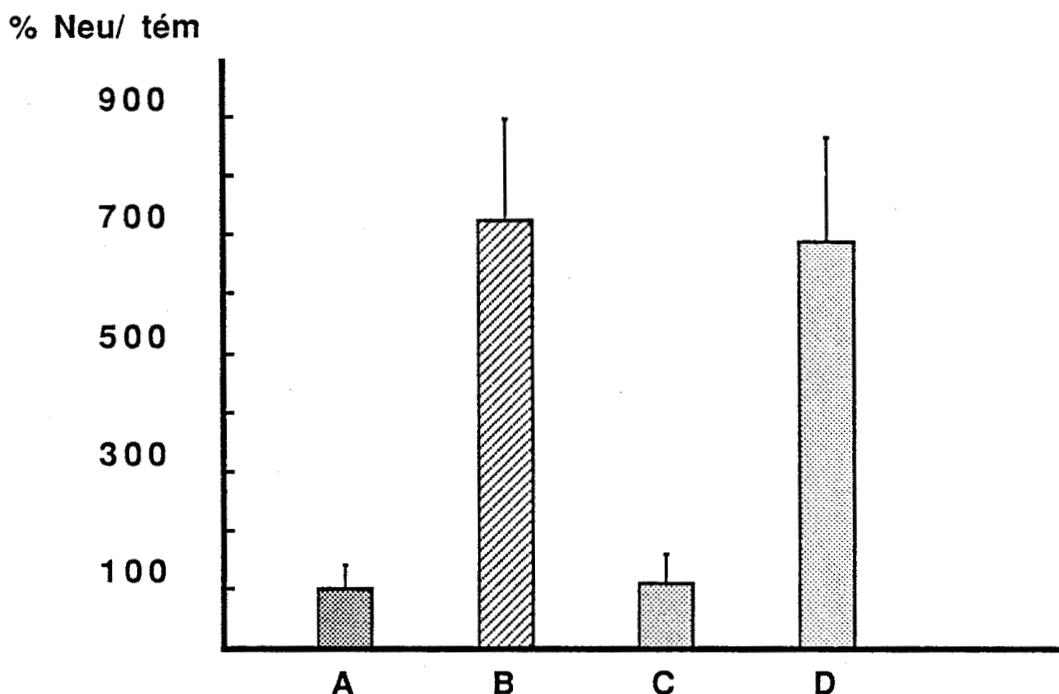


Figure 32 : Stimulation de la croissance des neurites de la moelle épinière par un blastème ou les protéines dialysées ou non par un boudin laissant passer les molécules de poids inférieur à 8000 d.

A : Moelle cultivée seule ( n=16 )

B : Moelle cultivée en présence d'un blastème ( n=16 )

C : Moelle cultivée en présence des protéines dialysées ( n=16 )

D : Moelle cultivée en présence des protéines non dialysées ( n=16 )



## Discussion

La stimulation de la croissance des neurites issus d'un explant de moelle épinière de Pleurodèle cultivé en présence d'un régénérat de membre peut être intégralement reproduite lorsque ces explants nerveux sont cultivés dans un milieu conditionné c'est-à-dire dans un milieu dans lequel a préalablement

séjourné le blastème de régénération. Une telle situation expérimentale qui ne peut être interprétée que par la libération dans le milieu conditionné d'un ou de plusieurs facteurs chimiques capables de provoquer la croissance des fibres nerveuses soulève le problème de la nature véritablement neurotrophe de ce facteur chimique. La croissance nerveuse pourrait en effet n'être le résultat que de l'enrichissement du milieu de culture par des métabolites blastémaux améliorant simplement les conditions de survie de la moelle explantée. Il ne semble pas que cette hypothèse puisse être retenue puisque l'addition au milieu de culture habituel (non conditionné) d'une protéine comme la sérum albumine ou d'un composé aussi riche que le sérum de veau foetal ne provoque la moindre stimulation nerveuse.

Le ou l'ensemble des facteurs neurotropes blastémaux que nous appellerons par commodité BNTF (Blastemal NeuroTrophic Factor) a pour origine, nous l'avons vu (chapître 1), la composante mésenchymateuse du régénérat. Le seul exemple similaire connu chez les Amphibiens est celui rapporté par Richmond et Pollack (1983). Ces auteurs ont montré que le mésenchyme d'un régénérat de membre postérieur de larve de Grenouille (*Rana pipiens*) favorise la croissance des neurites d'explants de moelle épinière d'animaux de même stade ou ou peu plus âgés. Cette activité neurotrophe également présente dans le mésenchyme des bourgeons de membre en cours de développement (Pollack et Liebig, 1977 ; Pollack et Muhlach, 1982) est liée à un facteur non identifié libéré dans le milieu de culture (Pollack, 1980, Pollack *et al.*, 1981). Chez les oiseaux (Nurcombe et Bennett, 1982, Collins et Dawson, 1982, Schnaar et Shaffner, 1981, Henderson *et al.*, 1981, 1984) et chez les Mammifères (Dribin et Barrett, 1980, 1982 ; Smith et Appel, 1983, Appel *et al.*, 1984), des milieux conditionnés à partir de muscles squelettiques ou cardiaques provoquent également la croissance des neurites spinaux d'animaux embryonnaires ou néonataux.

L'influence du facteur neurotrophique issu du mésenchyme blastémal, le BNTF, sur la croissance des neurites néoformés, est directement lié à sa concentration dans le milieu de culture ; en effet, plus la dilution du milieu conditionné est faible, plus le nombre des prolongements nerveux est élevé. Cependant, celui-ci se stabilise dès que le conditionnement du milieu est réalisé par 1,5 blastèmes. Les résultats du 1er chapitre avaient montré que le nombre de neurites spinaux néoformés atteignait un plateau dès que l'explant nerveux était cultivé en présence de 2 blastèmes. Cette légère différence de la masse blastémale nécessaire pour atteindre ce plateau peut être attribuée à la chute des synthèses (40 %) du blastème enregistrée au cours des premières heures de culture (consécutivement à la dénervation du régénérat) qu'il s'agisse de la synthèse d'ADN (Lassalle, 1983) ou celle des protéines (Carlone et Foret, 1979). Cette chute du métabolisme blastémal pourrait entraîner une diminution de la production et de la sécrétion du BNTF.

La production de facteurs neurotrophiques par des cellules ou des tissus en culture n'est en rien la preuve que ce facteur soit produit en aussi grande abondance *in vivo*. En effet, certains types cellulaires synthétisent des quantités décelables de NGF lorsqu'ils sont en culture alors qu'*in vivo*, la quantité de NGF produite par ces mêmes tissus n'est pas mesurable (Thoenen et Barde, 1980). Dans notre système expérimental, l'hypothèse selon laquelle la production du BNTF serait la résultante des conditions de culture ne peut être retenue puisqu'un extrait de blastème est capable de promouvoir de façon similaire au milieu conditionné ou à la co-culture régénérat-tissus nerveux, la croissance des neurites spinaux.

La thermolabilité et le fait que l'activité neurotrophe du milieu conditionné soit abolie par l'action de la papaine et, à un moindre degré, par celle de la trypsine concourent tous deux à suggérer que le BNTF est de nature protéique. Ceci apparaît d'ailleurs comme une constante des facteurs

neurotropes présents dans les milieux conditionnés ou les extraits tissulaires agissant soit sur la moelle épinière (Smith et Appel, 1983 ; Muhlach et Pollack, 1982 ; Norrgren et Ebendal, 1980 ; Henderson *et al.*, 1984 ; Calof et Reichardt, 1985, Giller *et al.*, 1977 ; Flanigan *et al.*, 1985) soit sur des tissus nerveux sensoriels ou sympathiques et parasympathiques (Levi-Montalcini et Angeletti 1968, Barde *et al.*, 1982 ; Manthorpe et Varon, 1985 ; Edgar et Thoenen, 1982 ; Lindsay et Tarbit, 1979). Seuls 3 facteurs neurotropes ont pu être purifiés, il s'agit du NGF (Nerve Growth Factor), du BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) et du CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor). Le NGF, purifié à partir de la glande salivaire de souris (Cohen, 1960) permet, *in vitro*, la survie des neurones de ganglions sympathiques ou sensitifs de poulet embryonnaire. Des observations réalisées sur des cultures de neurones dissociés ont montré que le NGF est capable de supporter la survie neuronale et la croissance des neurites de ces tissus nerveux pendant une période très précise de leur développement (Barde *et al.*, 1980). L'importance du NGF au cours du développement embryonnaire a également été soulevé (Levi-Montalcini et Angeletti, 1968). En effet, l'injection du NGF à des rongeurs nouveaux nés entraînent une augmentation considérable (x 10) du volume des ganglions sympathiques. Cette augmentation est due au maintien en survie des neurones, à leur différenciation plus rapide et à une augmentation de la taille des neurones complètement différenciés. Chez l'embryon de Poulet l'injection de NGF permet de maintenir en survie des neurones résiduels immatures qui normalement disparaissaient avec le développement.

Le BDNF fut isolé, quant à lui, du cerveau de Porc (Barde *et al.*, 1982). Il permet la survie et la croissance de neurites issus de neurones sensoriels tel que ceux du ganglion noueux d'embryons de Poulet, de la rétine foetal de Rat ou certains neurones insensibles au NGF des ganglions de la racine dorsale de la moelle épinière. Le CNTF permet, *in vitro*, la survie des neurones

parasympathiques du ganglion ciliaire d'embryon de poulet de 8 jours et des neurones des ganglions sympathiques ou spinaux d'embryons de Poulet de 11 jours (Varon *et al*, 1979, Manthorpe et Varon, 1985). Les effets du CNTF ne peuvent être mimés par le NGF et le BDNF. A l'inverse des 2 autres facteurs purifiés, le CNTF est une protéine acide et il est présent dans tous les extraits des tissus se trouvant sur le chemin normal des fibres du ganglion ciliaire c'est à dire la choroïde, l'iris, les corps ciliaires et les muscles de l'oeil.

L'ensemble de nos résultats conduit à penser que le BNTF est une protéine promouvant la survie des neurones spinaux et l'extension des fibres issues de ces neurones. Le BNTF agit à la fois sur les cornes ventrales et dorsales de la moelle épinière (voir chapitre I). Comme la localisation des motoneurones spinaux est restreinte exclusivement à l'extrémité latéro-ventrale des cornes ventrales (voir planche 2), il apparaît que le BNTF n'agit pas seulement sur ce type de neurones à l'inverse de ce qu'il a été rapporté soit chez les anoures (Pollack *et al*, 1981) où l'influence neurotrophe du facteur issu des bourgeons de membre semble être spécifique des motoneurones spinaux, soit chez les mammifères (Appel, 1983) ou les oiseaux (Calof et Reichardt, 1985) où apparemment les motoneurones spinaux sont les cibles des extraits de muscles squelettiques ou cardiaques. L'influence neurotrophe du BNTF semble être directement liée à une stimulation des cônes de croissance des neurites par une interaction du type "hormone-récepteur". En effet, le milieu conditionné par un blastème de régénération permet la stimulation de la croissance nerveuse à l'inverse du conditionnement de la boîte par un blastème ce qui excluerait la présence d'un facteur d'attachement tel que le polyornithine-attachable neurite promoting factor (Adler *et al.*, 1981) ou le PNME (post natal muscle extracts, Henderson *et al.*, 1984) ou encore la laminine (Calof et Reichardt, 1985). De manière générale, toutes les substances d'attachement possèdent un poids moléculaire élevé et ne sont pas dialysables. Nos résultats montrent au contraire

que le BNTF est une molécule dialysable de poids moléculaire situé entre 8000 et 15000 daltons. Des tests préliminaires réalisés à partir d'extrait de blastème en électrophorèse de gel d'acrylamide-polyacrylamide à 10 % et en milieu dénaturant montrent la présence d'une bande dont l'intensité de coloration argentique augmente en fonction du degré de prolifération du blastème. Le poids moléculaire de cette substance est environ de 12000 daltons.

De nombreux facteurs neurotropes promeuvent la croissance de neurites en stimulant le métabolisme neuronal. Le NGF notamment est capté par l'extrémité de l'axone puis atteint le corps cellulaire par transport rétrograde ce qui entraîne l'augmentation des synthèses. De même, le milieu conditionné par des cellules cardiaques d'embryons de Poulet contient une substance soluble permettant la croissance des fibres nerveuses toutefois, dans ce cas, ce facteur doit être nécessairement associé à une substance d'adhésion pour exprimer ses potentialités neurotropes (Collins et Dawson, 1982) celle-ci apparaît être le plus souvent la laminine (Mähönen et Rauvala, 1985 ; Lindsay et Peters, 1984 ; Calof et Reichardt, 1985) parfois à la fibronectine (Mähönen et Rauvala 1985).

Dans nos conditions de culture (culture d'explants) il ne nous est pas possible d'apprécier le rôle éventuel de l'environnement cellulaire des neurones, les cellules gliales pouvant en effet émettre une substance trophique à l'égard des neurones. Seule la culture de cellules nerveuses permettrait de répondre à cette question et c'est dans cette voie que nos travaux vont désormais s'engager.

## **CONCLUSION GENERALE**

## CONCLUSION GENERALE

Le système expérimental que nous avons utilisé dans le but de mieux saisir les relations qui s'établissent entre le blastème de régénération du membre antérieur de Triton et le système nerveux brachial nous a permis de mettre en lumière les effets neurotropes qu'exercent le régénérat sur la croissance des fibres nerveuses issues de la moelle épinière. Cet effet neurotrope qui concerne semble-t-il l'ensemble de la population neuronale spinale agit par l'intermédiaire d'un facteur soluble de nature protéinique et de faible poids moléculaire. La production du facteur neurotrope que nous avons appelé BNTF (Blastemal NeuroTrophic Factor), est exclusivement lié aux cellules mésenchymateuses du blastème, l'épiderme étant dépourvu de tout effet neurostimulateur. La présence du BNTF dans le milieu de culture de l'explant spinal provoque une légère augmentation de la synthèse protéique traduisant une augmentation du métabolisme spinal bien que celle-ci ne soit pas en relation avec la production des neurites néoformés nombreux et de grande taille. En outre, le BNTF stimule l'activité des chaînes métaboliques cholinergiques et catécholaminergiques se traduisant par la formation particulièrement nette de noradrénaline.

Qu'en est-il de ces observations dans le cadre des mécanismes connus de la régénération du membre d'Amphibien urodèle? La description des étapes successives des processus régénératifs en association avec les perturbations métaboliques dominantes déjà connues va nous permettre de proposer un schéma récapitulatif (Fig. 33) des événements fondamentaux de la morphogénèse régénératrice du membre d'Amphibien urodèle.

L'amputation d'un membre de Triton est une opération drastique qui a pour effet de provoquer une libération de catécholamines localement au niveau du front d'amputation, par l'intermédiaire des nerfs sectionnés (Sicard, 1983).

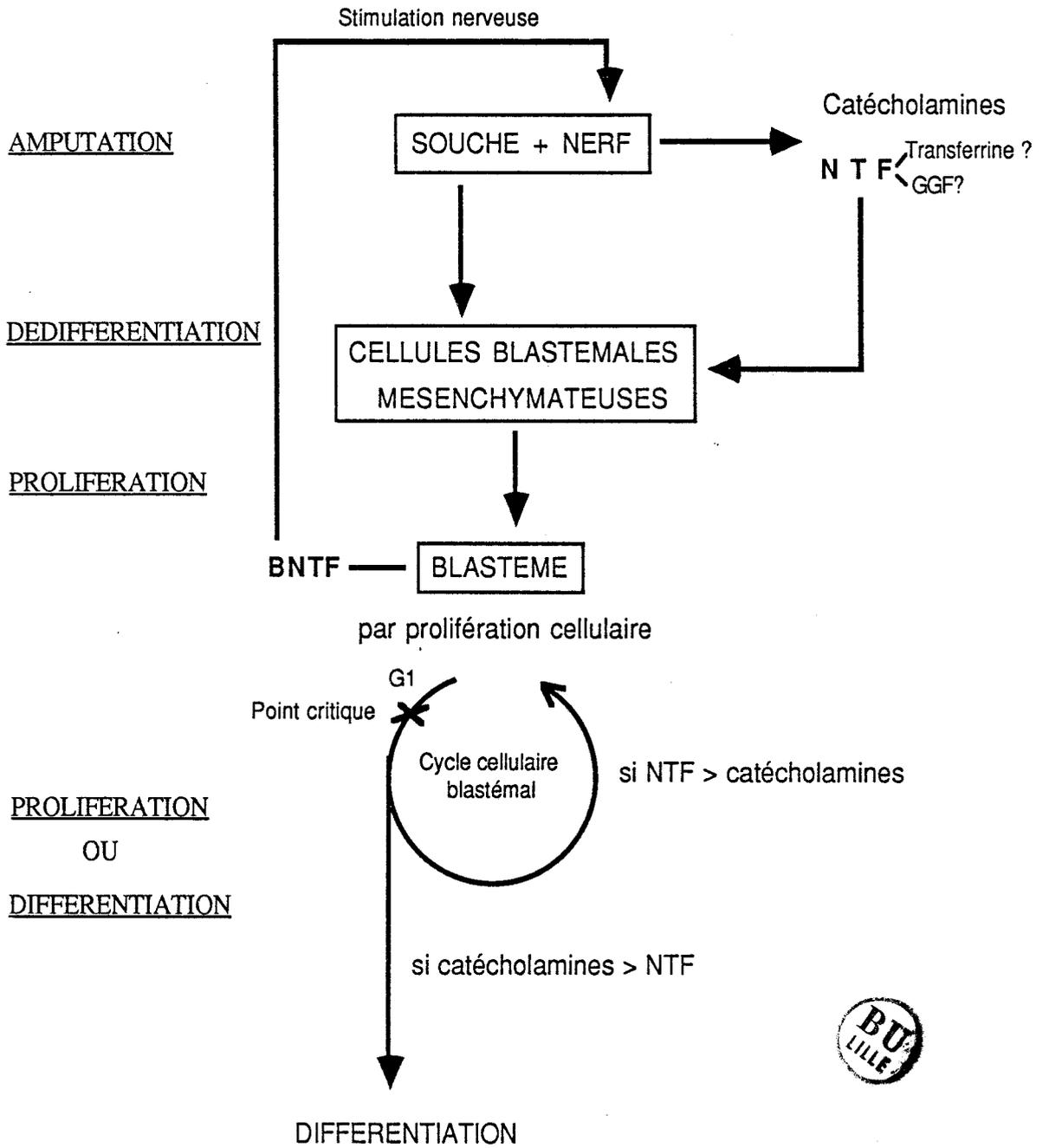


Fig.33 Schéma récapitulatif des effets supposés des facteurs nerveux et blastémaux au cours des premières phases de la régénération du membre d'Amphibien Urodèle.

Cette réaction amplifiée par la décharge de catécholamines systémique provoque au niveau des cellules de la souche une augmentation de l'AMPc (Taban *et al.*, 1978). Cette forte décharge de catécholamines aurait pour conséquence de désensibiliser provisoirement les cellules à ces monoamines (Sicard, 1983). La conjugaison de ces deux mécanismes, désensibilisation aux monoamines et augmentation d'AMPc, crée les conditions favorables à la dédifférenciation des cellules de la souche. Les cellules blastémales dédifférenciées subissent alors l'influence du facteur neurotrophique protéique (NTF) de Singer (1974, 1978), facteur dont la nature est encore inconnue bien que récemment transferrine (Mescher et Munain, 1984) et glial growth factor (GGF) (Brockes, 1984) aient été proposés comme candidats. Le NTF qui possède un indéniable pouvoir mitogène (Jabaily et Singer, 1977) stimule la prolifération des cellules dédifférenciées conduisant à la formation du massif mésenchymateux blastémal. En retour, les cellules blastémales élaborent un facteur neurotrophe, le BNTF dont la production est d'autant plus forte que les cellules prolifèrent activement. Le BNTF en agissant sur la croissance des fibres nerveuses permet probablement une adéquation entre le nombre de cellules blastémales et le nombre de fibres nerveuses associées.

Ce mécanisme auto-entretenu se poursuivrait indéfiniment si au cours des divisions successives n'apparaissait la resensibilisation des cellules blastémales aux catécholamines (Sicard, 1983). Les cellules jusqu'alors en cycle auront le "choix" au cours de leur phase G1 au niveau d'un point critique (Globus, 1978) soit de continuer à se diviser, soit de se différencier. Le choix sera en fait imposé par le rapport NTF-catécholamines. Si le rapport est en faveur du NTF, les cellules continuent leur cycle, si ce rapport est inversé, sous l'effet de l'augmentation de l'AMPc intracellulaire, la différenciation intervient (Sicard, 1983). La présence de catécholamines tout au long des différentes phases

de la régénération du membre d'Amphibien (Taban *et al*, 1978) et le fait que catécholamines plus particulièrement la noradrénaline n'ont pas d'effet mitogène sur les cellules blastémales mais augmentent l'APMc intracellulaire constituent les bases de ce raisonnement qui a amené Sicard (1983) à proposer une hypothèse qui tentait de faire la synthèse des observations faites en ce domaine. Nous avons repris cette hypothèse en la complétant avec les résultats de nos propres travaux. Ceux-ci ne constituent qu'une étape dans la compréhension des mécanismes qui lient le blastème et les fibres nerveuses. Ils se poursuivront pour tenter de localiser les cellules responsables de la synthèse des catécholamines et aussi pour déterminer la nature de cellules qui sont sensibles au BNTF (motoneurones, cellules sensorielles spinales). Pour cela, la culture de neurones spinaux isolés s'avèrera indispensable. Nous nous attacherons également à déterminer la nature chimique du BNTF ainsi que ses effets sur d'autres neurones tels que ceux du ganglion de la racine dorsale ou encore ceux d'espèces différentes.

## BIBLIOGRAPHIE

- ADLER R. , MANTHORPE M., SKAPER S.D. and VARON S., 1981. Polyornithine attached neurite-promoting factors (PNPFs). Culture sources and responsive neurons. *Brain Res.* **206**, 129-144.
- ALDSKOGIUS M., BARRON K.D. and REGAL R., 1980. Axon reaction in dorsal motorvagal and hypoglossal neurons of the adult rat. Light microscopy and RNA-cytochemistry. *J. Comp. Neurol.* **193**, 165-177.
- APPEL S.H., SMITH R.G., VACA K. and J.MC MANAMAN, 1984. Neurotrophic factors and the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscular Diseases* ed. by Serratrice et al. Raven Less N.Y.
- BARDE Y.A., 1983. New neurotrophic factors. *Ann. Rev. Physiol.*, **45**, 601-612.
- BARDE Y.A., EDGAR D., THOENEN H., 1980. Sensory neurons in culture : changing requirements for survival factors during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 1199-1203.
- BARDE Y.A., EDGAR D., THOENEN H., 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* **1**, 549-553.
- BARDE Y.A., EDGAR D., THOENEN H., 1983. New neurotrophic factors. *Ann. Rev. Physiol.* **45**, 601-612.
- BAUDUIN B., BOILLY B., LASSALLE B., 1984. Etude *in vitro* de l'influence du blastème de régénération de Pleurodèle sur la croissance des fibres nerveuses. *Arch. Anat. Microsc.* **73**, 309-310.

- BAUDUIN B., LASSALLE B., BOILLY B., 1986. Stimulation de la croissance des fibres nerveuses de moelle épinière sous l'influence d'un blastème de régénération de Triton. Etude *in vitro*. *Biol. cell* (Soumis).
- BENOWITZ L.I., SMASHOUA J.E., YOON M.G., 1981. Specific changes in rapidly transported proteins during regeneration in the goldfish optic nerve. *J. Neurosci.* **1**, 300-307.
- BISBY M.A., 1980. Retrograde axonal transport. *Adv. Cell Neurobiol.* **1**, 69-116.
- BLACK I.B., 1978. Regulation of autonomic development. *Ann. Rev. Neurosci.* **1**, 229-240.
- BLACK M.M., LASEK R.J., 1978. A difference between the proteins conveyed in the fast component of axonal transport in guinea pig hypoglossal and vagus motor neurons. *J. Neurobiol.* **9**, 433-443.
- BOTTENSTEIN J.E., SKAPER S.D., VARON S.S., SATO G.M., 1980. Selective survival of neurals from chick embryo sensory ganglionic dissociates utilizing serum-free supplemented medium. *Exp. Cell Res.* **125**, 183-190.
- BROCKES J.P., 1984. Mitogenic growth factors and nerve dependence of limb regeneration. *Nature* **225**, 1280-1287
- BRUNK C.F., JONES K.C., JAMES T.W., 1979. Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal. Biochem.*, **92**, 497-500
- CALOF A.L., REICHARDT L.F., 1985. Response of purified chick motoneurons to myotube conditioned medium : laminin is essential for the substratum-binding, neurite outgrowth promoting activity. *Neurosci. Lett.* **59**, 183-189.
- CARLONE R.L., FORET J.E., 1979. Stimulation of mitosis in cultured limb blastemata of the newt, *Notophthalmus viridescens*. *J. Exp. Zool* **210**, 245-252

- CHAMLEY J.H., GOLLER I. et BURNSTOCK G., 1973. Selective growth of sympathetic nerve fibres to explants of normally densely innervated autonomic effector organs in tissue culture. *Dev. Biol.*, **31**, 362-379.
- CHOO A.T., LOGAN D.M. et RATHBONE M.P., 1981. Nerve trophic effects : partial purification from chick embryo brains of proteins that stimulate protein synthesis in cultured newt blastema. *Exp. Neurol.*, **73**, 558-570.
- COHEN S., 1960. Purification of a nerve growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **46** : 302-311.
- COLLINS F., DAWSON A., 1982. Conditioned medium increases the rate of neurite elongation : separation of this activity from the substratum-bound induces of neurite out growth. *J. neurosc.* **2**, 1005-1010.
- COLLINS F., GARRETT J., 1980. Elongation of nerve fibers is guided by a pathway of material released from embryonic nonneuronal cells. *Proc. Acad. Natl. Sci. U.S.A.*, **77**, 6226-6228.
- COMMISSIONG W.J., 1981. Spinal mono aminergic systems : an aspect of somatic motor function. *Fed. Proc.* **40**, 2771-2777.
- COMMISSIONG J., 1983. The development of catecholaminergic nerves in the spinal cord of the rat. *Brain Res.* **264**, 197-208.
- COMMISSIONG J.W., 1985. Metabolism of catecholamines in the developing spinal cord of the rat. *J. Neuroch.* **44**, 1060-1668.
- COUGHLIN M.D., 1975. Target organ stimulation of parasympathetic nerve growth in the developing mouse submandibular gland. *Dev. Biol.*, **43**, 140-158.
- DOWNER R.G.M., BAILEY B.A., MARTIN R.J., 1985. Estimation of biogenic amines in biological tissues. *Neurobiol.* 248-263.

- DRIBIN L.B. et BARRETT J.N., 1980. Conditioned medium enhances neuritic outgrowth from rat spinal cord explants. *Dev. Biol.*, **74**, 184-195.
- DRIBIN L.B., BARRETT J.N., 1982. Characterization of neuritic outgrowth-promoting activity of conditioned medium on spinal cord explants. *Dev. Brain Res.* **4**, 435-441.
- DUPRAT A.M., KAN M., FOULQUIER F., 1985. *In vitro* differentiation of neuronal precursor cells from amphibian late gastrulae : morphological, immunocytochemical studies biosynthesis, accumulation and uptake of neurotransmitters. *J. Embryol. exp. Morph.* **86**, 71-87.
- EBENDAL T., 1984. Nerve growth-promoting activities in embryonic and adult tissues. In : *Organizing of Neural Development*, Sharme S.C., ed, Plenum publishing corporation, 93-107.
- EBENDAL T. et JACOBSON C.O., 1977. Tissue explants affecting extension and orientation of axons in cultured chick embryo ganglia. *Exp. Cell. Res.*, **105**, 379-387
- EDGAR D., THOENEN H., 1982. Modulation of NGF-induced survival of chick sympathetic neurons. *Dev. Brain Res.* **5**, 89-92.
- EDGAR M., SINGER M., 1971. A quantitative electron microscope analysis of peripheral nerve in the urodèle amphibian in relation to limb regeneration capacity. *J. Morph.* **133**, 387-398.
- ELLMAN G.L., COURTNEY D.D., VALENTINO A., FEATHERSTONE R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholin-esterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95.
- FALCK B., HILLARP N., THIEME G., TORP A., 1962. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. **10**, 348-354.
- FLANIGAN T.P., DICKSON J.G., WALSH F.S., 1985. Cell survival characteristics and choline acetyltransferase activity in motor neurone-enriched cultures from chick embryo spinal cord. *J. Neurochem.* **45**, 1323-1326.

- FONNUM F., 1969. Radiochemical micro assays for the determination of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities. *Biochem. J.* **115**, 465-472.
- GERAUDIE J., SINGER M., 1984. Rôle du système nerveux périphérique au cours de la régénération des appendices des vertébrés. *Ann. Biol.* 243-270.
- GILLER E.L., NEALE J.H., BULLOCK P.N., SCHRIER B.K., NELSON P.G., 1977. Choline acetyltransferase activity of spinal cord cell cultures increased by co-culture with muscle and by muscle-conditioned medium. *J. Cell Biol.* **74**, 16-29.
- GIULIAN D., DES RUISSEAU H., COWBURN D., 1980. Biosynthesis and intra-axonal transport of protein during neuronal regeneration. *J. Biol. Chem.* **255**, 6494-6501.
- GLOBUS M., 1978. Neurotrophic contribution to a proposed tripartite control of the mitotic cycle in the regeneration blastema of the newt *Notophthalmus (Triturus) viridescens*. *Amer. Zool.* **18**, 855-863
- GLOBUS M., VETHAMANY-GLOBUS S., 1977. Transfilter mitogenic effect of dorsal root ganglia on cultured regeneration blastema, in the newt *Notophthalmus viridescens*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **33**, 813-829
- GODIN I., GIPOULOUX J.D., 1985. Etude de la capacité de la chorde dorsale des embryons d'Amphibiens anoures à synthétiser des catécholamines. *C.R. Acad. Sc. Paris* **301**, 429-432.
- GRAFSTEIN B., FORMAN D.S., 1980. Intracellular transport in Neurons. *Physiol. Rev.* **60**, 1167-1283.
- GRAFSTEIN B., 1983. Chromatolysis reconsidered : A new view of the reaction of the nerve cell body to axon injury. *Nerve organ and tissue regeneration : research perspectives* Academic Press, Inc.
- HAY E.D., 1960. The fine structure of nerves in the epidermis of regenerating salamander limbs. *Exp. Cell Res.*, **19**, 299-317.

- HEACOCK A., AGRANOFF B.W., 1976. Enhanced labeling of a retinal protein during regeneration of optic nerve in goldfish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 828-832.
- HEACOCK A., AGRANOFF B.W., 1982. Protein synthesis and transport in the regenerating goldfish visual. *System. Neurochem. Res.* **7**, 771-788.
- HENDERSON C.E., HUCHET M., CHANGEUX J.P., 1981. Neurite outgrowth from embryonic chicken spinal neurons is promoted by media conditioned by muscle cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* , **78**, 2625-2629
- HENDERSON C.E., HUCHET M., CHANGEUX J.P., 1983. Denervation increases a neurite-promoting activity in extracts of skeletal muscle. *Nature* **302**, 609-611.
- HENDERSON C.E., HUCHET M., CHANGEUX J.P., 1984. Neurite promoting factors for embryonic spinal neurons and their developmental changes in the chick. *Develop. Biol.* **104**, 336-347.
- HOFFMAN P.N., LASEK, 1980. Axonal transport of the cytoskeleton in regenerating motor neurons : constancy and change. *Brain Res.* **202**, 217-333.
- JABAILY J., SINGER M., 1977. Neurotrophic stimulation of DNA synthesis in the regenerating forelimb of the newt *Triturus*. *J. exp. Zool.* **199**, 251-256.
- KAMRIN R.P., SINGER M., 1955. The influence of the nerve on regeneration and maintenance of the label of the catfish *Ameiurus nebulosus*. *J. Morph.* **96**, 173-187.
- KOJIMA H., YO SHIDA M., SUETAKE K., ANRAKU S., 1978. The distribution of catecholamines in the zona terminalis of bull frog spinal cords. *Kurume Med. J.* **25**, 347-348.
- KOJIMA H., FUKUSHIMA S., HIRONO T., SUETAKE K., ANRAKU S., INANAGA K., 1980. The presence of abundant adrenaline in the dorsal part of the bull frog spinal cord. *Kurume Med. J.* **27**, 299-302.



- KOJIMA H., FUKUSHIMA S., HIRONO T., SUETAKE K., TOSHIMA M., YOSHIDA M., ANRAKU S., INANAGA K., 1981. Biochemical and histochemical studies on catecholamines in bull frog *Rana catesbeiana* spinal ganglia. *J. Neurochem.* **36**, 2106-2109.
- KONIECZNA-MARCZYNSKA B., SKOWRON-CENDRZAK A., 1958. The effect of the augmented nerve supply on the regeneration in post metamorphic *Xenopus laevis*. **6**, 37-46.
- LASSALLE B., 1983. Synthèse d'ADN dans les blastèmes de régénération de *Pleurodeles waltlii* (Amphibien Urodèle) en culture *in vitro*. Conditions de culture. *Biol. Cell*, **47**, 187-192.
- LE DOUARIN N.M., 1982. The neural crest. Cambridge University Press.
- LENTZ T.L., 1969. Vesicle and granule content of sympathetic ganglion cells during limb regeneration of the newt *Triturus*. *Z. Zellforsch...*, **102**, 447-458.
- LENTZ T.L., ADDIS J.S. et CHESTER J., 1981. Partial purification and characterization of a nerve trophic factor regulating muscle acetylcholinesterase activity. *Exp. Neurol.*, **73**, 542-557.
- LEVI-MONTALCINI R. et ANGELETTI P.U., 1963. Essential role of the nerve growth factor on the survival and maintenance of dissociated sensory and sympathetic embryonic nerve cells *in vitro*. *Dev. Biol.*, **7**, 653-659.
- LEVI-MONTALCINI R., ANGELETTI P., 1968. Nerve growth factor. *Physiol. Rev.* **48**, 534-569.
- LEVICH V.G., 1962. Physicochemical hydrodynamics. *Prentice Hall*, New-York.
- LHEUREUX E., 1983. Replacement of irradiated epidermis by migration of non-irradiated epidermis in the newt limb : the necessity of healthy epidermis for regeneration. *J. Embryol. exp. Morph.*, **76**, 217-234.

- LINDSAY R.M., TARBIT J., 1979. Developmentally regulated induction of neurite outgrowth from immature chick sensory neurons (DRG) by homogenates of avian or mammalian heart, liver and brain. *Neurosci. Lett.* **12**, 195-200.
- LINDSAY R.M., PETERS C., 1984. Spinal cord contains neurotrophic activity for spinal nerve sensory neurons-late developmental appearance of a survival factor distinct from nerve growth factor. *Neurosci.* **12**, 45-51.
- LOCATELLI P., 1925. Nuovi esperimenti sulla funzione della sistema nervoso sulla regenerazione. *Arch. Sci. Biol.* **7**, 300-312.
- LOWRY O.H., N.J. ROSEBROUGH, FARR A.L., RANDALL R.J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
- MAHONEN Y., RAUVALA M., 1984. Adhesive membrane protein of rat brain enhances neurite outgrowth of neuroblastoma cells. *Euro. J. Cell Biol.* **36**, 91-97.
- MANTHORPE M., VARON S., 1985. Regulation of neuronal survival and neuritic growth in the avian ciliary ganglion by trophic factors. *Growth and Maturation factors* vol. 3 ed. G. guroff pp 77-117 Wiley.
- MARKWELL M.A.K., HASS M.S., BIEBER L.L., TOLBERT N.E., 1978. A modification Lowry procedure to simplify protein determination in membranes and lipoprotein. *Samples An. Biochem.* **87**, 206-210.
- Mc QUARRIE I., GRAFSTEIN B. 1982. Protein synthesis and axonal transport during regeneration of goldfish optic axons accelerated by a conditioning lesion. *Brain Res.* **25**, 25-37.
- MEFFORD I.M., 1981. Application of high performance liquid chromatography with electrochemical detection to neurochemical analysis : measurement of catecholamines, serotonin and metabolites in rat brain. *J. Neurosc. Methods* **3**, 207-224.

- MESCHER A.L., MUNAIM S.I., 1984 . "Trophic" effect of transferrin on amphibian limb regeneration blastemas. *J. Exp . Zool. , 230*, 485-490.
- MOUCHET P. , MANIER M., DIETL M., C. FEUERSTEIN, BEROD A., ARLUISON, DENOROY L., THIBAUT J., 1986. Immunohistochemical study of catecholaminergic cell bodies in the rat spinal cord. *Brain Res. Bull.*, **16**, 341-353.
- MUHLACH W.L., POLLACK E.D., 1982. Target tissue control of nerve fiber growth rate and periodicity *in vitro*. *Dev. Brain Res.* **4**, 461-364.
- MULLER H.W, GEBICKE-HARTER P.J., HANGEN D.H., SHOOTER E.M., 1985. A specific 37000 dalton protein that accumulates in regenerating but not in nonregenerating mammalian nerves. *Nature* **228**, 499-501
- MURRAY M., 1973. <sup>3</sup>H-uridine incorporation by regenerating retinal ganglion cells of goldfish. *Exp. Neurol.* **39**, 489-497.
- MURRAY M., GRAFSTEIN B., 1969. Changes in the morphology and amino acid incorporation of regenerating goldfish optic neurons. *Exp. Neurol.* **23**, 544-560.
- NORRGREN G., EBENDAL T., 1980. Test of the possible action of trophic factors upon embryonic chick CNS neurons. *54 th Euro. Neurosci. Meet. Brighton, Neurosci. lett.* p. 5124.
- NURCOMBE V., BENNETT M.R., 1982. Evidence for neuron-survival and neurite promoting factors from skeletal muscle : their effects on embryonic spinal cord. *Neurosci. lett.* **34**, 89-93.
- PARENT A., NORTHCUTT R.G. 1982. The monoamine-containing neurons in the brain of the garfish, *Lepisosteus. osseus* *Brain Res. Bull.* **9**, 189-204.
- PATTERSON P.H., CHUN L.L.Y., 1977. The induction of acetylcholine synthesis in primary cultures of dissociated rat sympathetic neurones. I. Effects of conditioned medium. *Develop. Biol.* **56**, 263-280.

- PEADON A.M., SINGER M., 1965. A quantitative study of forelimb innervation in relation to regenerative capacity in the larval land stage, and adult form of *Triturus viridescens*. *J. exp. Zool.* **159**, 337-346.
- PERRY G.W., WILSON D.L., 1981. Protein synthesis and axonal transport during nerve regeneration. *J. Neurochem.* **37**, 1203-1217.
- POLLACK E.D. et LIEBIG V., 1977. Differentiating limb tissue affects neurite growth in spinal cord cultures. *Science*, **197**, 899-900.
- POLLACK E.D. et MUHLACH W.L., 1982. Target control of neuronal development during formation of the spinal reflex arc : an operant model. *J. Neurosc. Res.*, **8**, 343-355.
- POLLACK E.D. et RICHMOND M., 1981. Analysis of mesenchyme in the developing hind limb of *Rana pipiens* larvae with implications for neural development. *J. Morphol.*, **169**, 253-257.
- POLLACK E.D., MUHLACH W.L. et LIEBIG V., 1981. Neurotropic influence of mesenchymal limb target tissue on spinal cord neurite growth *in vitro*. *J. Comp. Neurol.*, **200**, 393-405.
- RICHMOND M.J. et POLLACK E.D., 1983. Regulation of tadpole spinal nerve fiber growth by the regenerating limb blastema in tissue culture. *J. Exp. Zool.*, **225**, 233-242.
- SALPETER M.M., 1965. Disposition of nerve fibers in the regenerating limbs of the adult newt, *Triturus*. *J. Morphol.*, **117**, 201-212.
- SCADDING S.R., LIVERSAGE A.R., 1979. Axoplasmic transport in regenerating limbs of *Ambystoma maculatum* larvae. *Experientia* **35**, 266-267.
- SCAPS P., 1986. Evolution des activités biosynthétiques dans la moelle épinière au cours de la régénération du membre d'amphibien. D.E.A. Université de Lille.

- SCHMIDT A.J., Cellular biology of vertebrate regeneration and repair. *The University of Chicago Press*
- SCHNAAR R.L., SCHAFFNER A.E.S., 1981. Separation of cell types from embryonic chicken and rat spinal cord : characterization of motoneuron-enriched fractions. *J. Neurosci.* **1**, 204-217.
- SCHOTTE O.E., 1926. Hypophysectomie et régénération chez les batraciens urodèles. *C.R. Soc. Phys. hist. Nat. Genève* **43**, 67-72.
- SENSENBRENNER M., G. LABOURDETTE, J.P. DELAUNOY, B. PETTMANN, G. DEVILLIERS, G. MOONEN and E. BOCK, 1980. Morphological and biochemical differentiation of glial cells in primary culture. In *Tissue Culture in Neurobiology* ed. by E. Giacobini *et al.* Raven Press N.Y.
- SICARD R.E., 1983. Neurotrophic influence on proliferation differentiation decisions during amphibian forelimb regeneration : an hypothesis. *Bio Systems* **16**, 65-73.
- SIMPSON S.B. Jr., 1977. Nerves, Trophic factors and limb regeneration. *British society for developmental Biology Symposium* **3**.
- SIMS T.J., 1977. The development of monoamine containing neurons in the brain and spinal cord of the salamander *Ambystoma mexicanum*. *J. Comp. Neurol.* **173**, 319-336.
- SIMS T.J., NICHOLS R.M., 1982. Two types of catecholamine-containing neurons are located in the spinal cord of the axolotl salamander. *Anatomical record* **202**, 176A-177A.
- SINGER M., 1946. The nervous system and regeneration of the forelimb of adult triturus V. - The influence of number of nerve fibers, including a quantitative study of limb innervation. *J. Exp.* **101**, 297-337.
- SINGER M., 1952. The influence of the nerve in regeneration of the amphibian extremity. *Quart. Rev. Biol.*, **27**, 169-200.

- SINGER M., 1954. Induction of regeneration of the forelimb of the postmetamorphic frog by augmentation of the nerve supply. *J. exp. Zool.* **126**, 419-472.
- SINGER M., 1973. Limb regeneration in the vertebrates. *Add. Wels. Mod. in Biology*, **6**, 27 p.
- SINGER M., 1974. Neurotrophic control of limb regeneration in the newt. *Ann. NY Acad. Sci.*, **228**, 308-322
- SINGER M., 1978. On the nature of the neurotropic 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., MAIER C.E. et McNUTT W.S., 1976. Neurotrophic activity of brain extracts on forelimb regeneration in the urodele, *Triturus*. *J. Exp. Zool.*, **196**, 131-150.
- SKENE J.H.P., SHOOTER E.M., 1983. Denervated sheath cell secrete a new protein after nerve injury. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **80**, 4169-4174
- SKENE J.M.P., WILLARD ., 1981 a. Changes in axonally transported proteins during regeneration in toad retinal ganglion cell. *J. Cell. Biol.* **89**, 86-95.
- SKENE J.M.P., WILLARD M. 1981 b. Axonally transported proteins associated with axon growth in rabbit central and peripheral nervous systems. *J. Cell Biol.* **89**, 96-103.
- SMITH R.G., APPEL S.H., 1983. Extracts of skeletal muscle increase neurite outgrowth and cholinergic activity of foetal rat spinal motor neurons. *Science* **219**, 1079-1081.
- TABAN C.H., CATHIENI M., GUNTERN R., CONSTANTINIDIS J., 1978. Histofluorescence of monoamines in newt forelimb regenerates. *Wilhelm Roux's archives* **185**, 79-94.

- TABAN C.H., CATHIENI M., SCHORDERET M., 1978. Cyclic AMP and noradrenaline sensitivity fluctuations in regenerating newt tissue. *Nature* **271**, 470-472.
- THOENEN H. et BARDE Y.-A., 1981. Physiology of nerve growth factor. *Physiol. Rev.*, **60**, 1284-1335.
- TODD J.J., 1823. On the process of reproduction of the members of the members of the aquatic salamander. *Quart. Sci. Lit. Arts* **16**, 84-96.
- TOHYAMA M., MAEDA T., SHIMIZU N., 1975. Comparative anatomy of the *locus coeruleus* II. Organization and projection of the catecholamine containing neurons in the upper rhombencephalon of the frog, *Rana catesbiana*. *J. Hornforsch.* **16**, 81-89.
- TOMLINSON B.L., GLOBUS M. et VETHAMANY-GLOBUS S., 1981. Promotion of mitosis in cultured newt limb regenerates by a diffusible nerve factor. *In vitro*, **17**, 167-172.
- TWEEDLE C., 1971. Transneuronal effects on amphibian limb regeneration. *J. Exp. Zool.* **177**, 13-29.
- UNGEWITTER L.H., 1951. An urea silver nitrate method for nerve fibers and nerve endings. *Stain Technol.*, **26**, 73-76.
- VAN STONE J.M., 1955. - The relationship between innervation and regenerative capacity in hind limbs of *Rana sylvatica*. *J. Morph.* **97**, 345-391.
- VARON S., MANTHORPE M., ADLER R., 1979. Cholinergic neuronotrophic factors : I. Survival neurite outgrowth and choline acetyltransferase activity in monolayer cultures from chick embryo ciliary ganglia. *Brain Res.* **173**, 29-45.
- VARON S., MANTHORPE M., LONGO F.M. et WILLIAMS L.R., 1983. Growth factors in regeneration of neural tissues. In : *Nerve, Organ, and Tissue Regeneration : Research Perspectives.*, Seil F. J., Ed., Acad. Press, 127-155.

- VERNA J.M. et SAXOD R., 1979. Co-cultures de neurones ganglionnaires spinaux et de mésenchyme dermique d'embryons d'oiseaux. *Biol. Cell.* **35**, 233-242.
- VERNA J.M. et SAXOD R., 1983. Analyse microcinématographique quantitative des interactions entre cellules nerveuses sensorielles et tissus cutanés *in vitro* : mise en évidence d'une différence de comportement des fibres nerveuses vis-à-vis des cellules dermiques et épidermiques. *C.R. Acad. Sc. Paris*, **297**, 241-246.
- VINOIRES S. et GUROFF G., 1980. Nerve growth factor : mechanism of action. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **9**, 223-257.
- WALLACE M., 1981. Vertebrate limb regeneration. *John Wiley stand Sons.* Chichester, New-York.
- WEIS J.S., WEIS P., 1970. The effect of nerve growth factor in limb regeneration in *Ambystoma*. *J. exp. Zool.* **174**, 73-78.
- WOLTERS J.G., DONKELAAR H.J., VERHOFSTAD, 1984. Distribution of catecholamines in the brain stem and spinal cord of the lizard *Varanus exanthematicus* an immunohistochemical study based on the use of antibodies to tyrosine hydroxylase. *Neurosci.* **13**, 469-493.
- ZAMORA A.J., 1978. The ependymal and glial configuration in the spinal cord of urodeles. *Anat. Embryol.* **154**, 67-82.

Planche 1 : Croissance des neurites à partir d'explants de moelle épinière de Pleurodèle cultivés *in vitro*.

Fig. a : moelle témoin cultivée seule. Fig. b, c, d : moelle cultivée en présence d'un blastème (B) de Pleurodèle prélevé au stade cône sur de jeunes animaux. Dans un faible nombre de cas (25 %), les neurites issus de la moelle se dirigent préférentiellement vers le blastème (Fig. b), alors que le plus souvent, les neurites présentent une disposition radiaire que le blastème soit posé directement sur le fond de la boîte (Fig. d) ou posé (Fig. c) sur un filtre Millipore (F). a : X 110, b : X 110, c : X 110, d : X 110.

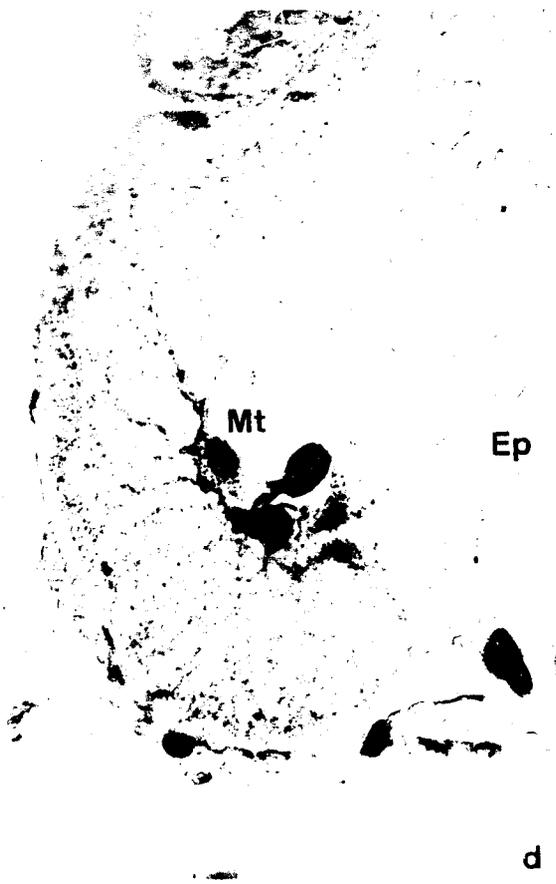
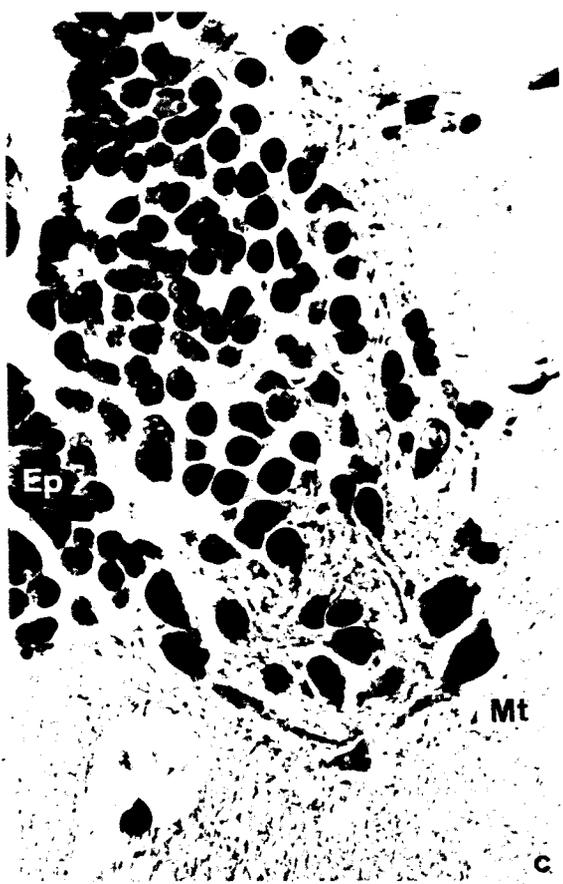
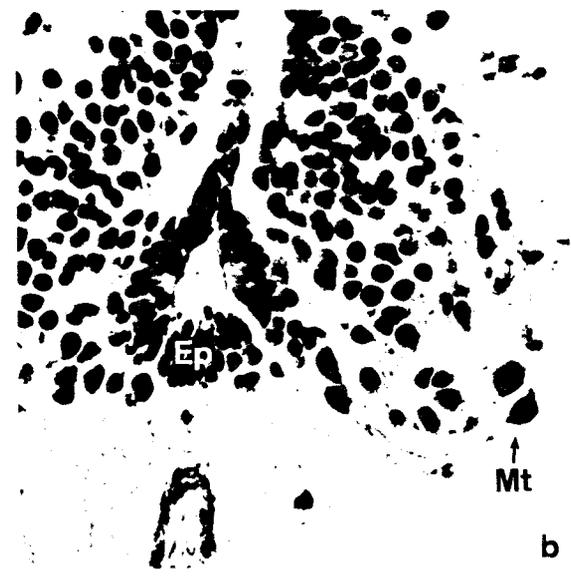
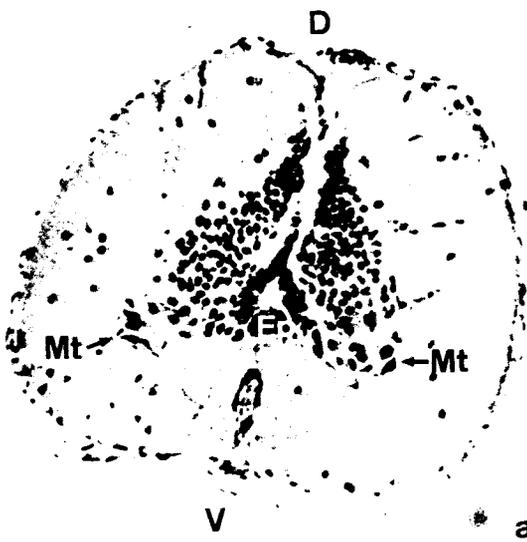


BU  
VILLE

Planche 2 : Moelle épinière de Pleurodèle *in vivo*.

Fig. a : aspect d'une moelle épinière non cultivée. Les cellules nerveuses sont regroupées autour de l'épendyme (Ep). D : région dorsale, V : région ventrale.

Fig. b, c, : détail de la Fig a montrant les motoneurones (Mt) regroupés en position latéro-ventrale. Fig. d : coloration par la peroxydase des motoneurones (réalisée par C. ZENJARI.) a : X 110, b : X 399, c : X 465, d : X 465.

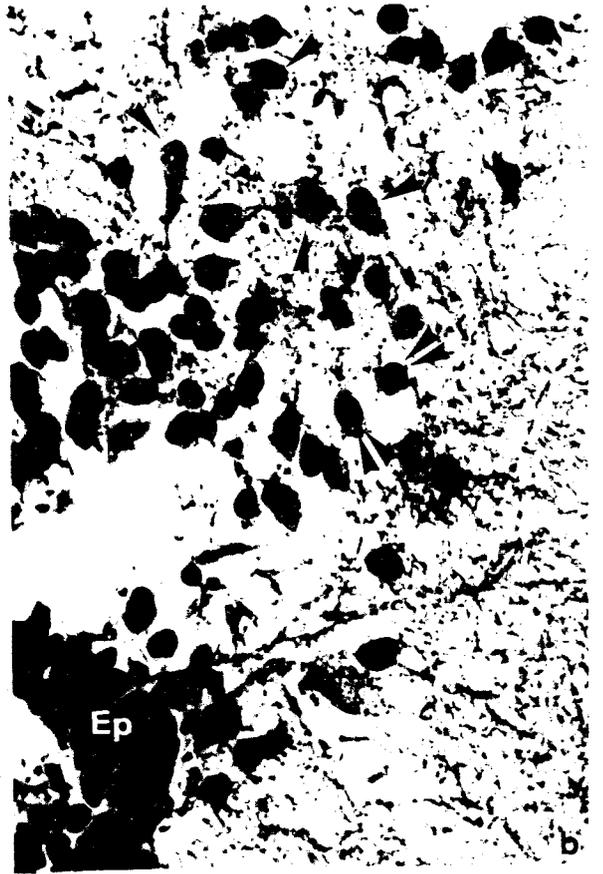


BU  
LILLE

Planche 3 : Moelle épinière de Pleurodèle après 3 jours de culture *in vitro*.

Fig. a : aspect d'une moelle épinière cultivée pendant 3 jours. L'architecture de la moelle est quelque peu modifiée en raison de l'aplatissement du tissu. Les cellules nerveuses sont disposées de manière moins ordonnée autour de l'épendyme (Ep).

Fig. b : détail de la figure a. A côté des noyaux pycnotiques (double flèche), on note la présence de neurones restés parfaitement vivants (simple flèche). Fig. c, d : des fibres nerveuses (f) apparaissent dans les moelles cultivées. a : X 110, b : X 300, c : C : X 300, d : X 465.



BU  
LILLE