

50376
1986
223

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES ARTOIS

50376
1986
223

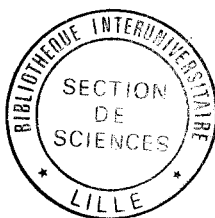
N° d'ordre 63

**THESE DE DOCTORAT
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Présentée par :

Françoise REVILLION-CARETTE

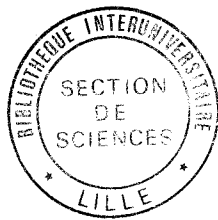
**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES EFFETS DU dbAMPc SUR
LA CHONDROGENESE DANS L'EBAUCHE EMBRYONNAIRE
DE MEMBRE DE SOURIS *IN VITRO***



Soutenu le 5 décembre 1986 devant la commission d'examen

Président : M. B. BOILLY
Rapporteurs : MM. J.V. RUCH - P. SENDEL
Directeur de thèse : M. A. BART
Examineur : Mme E. DEUDON





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	Psychophysologie
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 hertziennne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertziennne
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 démograph
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 hertziennne

M. KREMBEL Jean
 M. LANGRAND Claude
 M. LATTEUX Michel
 Mme LECLERCQ Ginette
 M. LEFEVRE Christian
 Mlle LEGRAND Denise
 Mlle LEGRAND Solange
 Mme LEHMANN Josiane
 M. LEMAIRE Jean
 M. LE MAROIS Henri
 M. LHENAFF René
 M. LOCQUENEUX Robert
 M. LOSFELD Joseph
 M. LOUAGE Francis
 M. MACKE Bruno

 M. MAIZIERES Christian
 M. MESSELYN Jean
 M. MESSERLIN Patrick
 M. MONTEL Marc
 Mme MOUNIER Yvonne
 Mme N'GUYEN VAN CHI Régine
 M. PARSY Fernand
 M. PASZKOWSKI Stéphan
 Mlle PAUPARDIN Colette
 M. PERROT Pierre
 M. PERTUZON Emile
 M. PONSOLLE Louis
 M. PORCHET Maurice
 M. POVY Lucien
 M. RACZY Ladislas
 M. RAOULT Jean-François
 M. RICHARD Alain
 M. RIETSCH François
 M. ROBINET Jean-Claude
 M. ROGALSKI Marc
 M. ROY Jean-Claude
 M. SCHAMPS Joël
 Mme SCHWARZBACH Yvette
 M. SLIWA Henri
 M. SOMME Jean
 Mlle SPIK Geneviève
 M. STAROSWIECKI Marcel
 M. STERBOUL François
 M. TAILLIEZ Roger
 Mme TJOTTA Jacqueline
 M. TOULOTTE Jean-Marc
 M. TURREL Georges
 M. VANDORPE Bernard
 M. VAST Pierre
 M. VERBERT André
 M. VERNET Philippe
 M. WALLART Francis
 M. WARTEL Michel
 M. WATERLOT Michel
 Mme ZINN Justin Nicole

Biochimie
 Probabilités et statistiques
 Informatique
 Catalyse
 Pétrologie
 Algèbre
 Algèbre
 Analyse
 Spectroscopie hertzienne
 Vie de la firme (I.P.A.)
 Géographie
 Physique théorique
 Informatique
 Electronique
 Physique moléculaire et rayonnements atmosphé-
 riques

 Automatique
 Physique atomique et moléculaire
 Sciences économiques
 Physique du solide
 Physiologie des structures contractiles
 Géographie
 Mécanique
 Analyse numérique
 Biologie physiologie végétales
 Chimie appliquée
 Physiologie animale
 Chimie physique
 Biologie animale
 Automatique
 Electronique
 Géologie structurale
 Biologie animale
 Physique des polymères
 E.U.D.I.L.
 Analyse
 Psychophysiologie
 Spectroscopie moléculaire
 Géométrie
 Chimie organique
 Géographie
 Biochimie
 Informatique
 Informatique
 Génie alimentaire
 Mathématiques
 Automatique
 Spectrochimie infrarouge et Raman
 Chimie minérale
 Chimie inorganique
 Biochimie
 Génétique
 Spectrochimie infrarouge et Raman
 Chimie inorganique
 Géologie générale
 Algèbre

Ce travail a été effectué, sous la direction de Monsieur le Professeur A. BART, dans les laboratoires suivants :

- Laboratoire de Morphogenèse Animale (Professeurs A. BART, B. BOILLY, C. CAPURON), C.N.R.S. UA 685, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois.

- Laboratoire de Biochimie Médicale (Professeur J. PICARD), I.N.S.E.R.M. U 181, Faculté de Médecine Saint Antoine, Paris.

Je voudrais tout particulièrement exprimer ma profonde et respectueuse reconnaissance à Monsieur le Professeur A. BART, Laboratoire de Morphogenèse Animale de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, qui a eu la patience et l'amabilité de diriger mon travail durant ces quatre années.

J'adresse mes très vifs remerciements à Monsieur X. DESBIENS, Assistant à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, dont la connaissance dans le domaine de la chondrogenèse et l'amicale collaboration scientifique m'ont été d'une aide précieuse dans la réalisation de cette thèse.

Une partie de ce travail n'aurait pu être réalisée sans Monsieur le Professeur J. PICARD, Laboratoire de Biochimie Médicale de la Faculté de Médecine Saint Antoine de Paris, que je tiens à remercier pour l'accueil particulièrement chaleureux qui m'a été réservé au sein de son laboratoire.

Ma profonde gratitude va également à Madame E. DEUDON, chargée de recherches à l'I.N.S.E.R.M., qui m'a grandement facilité l'accès aux installations de recherche du laboratoire de Monsieur le Professeur J. PICARD et dont les conseils et la constante disponibilité m'ont permis d'étayer plusieurs éléments de ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur B. BOILLY, Laboratoire de Morphogenèse Animale de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse, ainsi que Messieurs les Professeurs J.V. RUCH, Institut de Biologie de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, et P. SENDEL, Laboratoire de Zoologie et Biologie Animale de l'Université Scientifique et Médicale de Grenoble, qui ont accepté la charge de rapporteurs.

Je voudrais également associer à ces remerciements Madame L. MEUNIER et Mademoiselle A. ROUSSEAU, Techniciennes, pour leur aide quotidienne et la sympathie stimulante dont elles ont fait maintes fois preuve à mon égard.

Je remercie enfin très sincèrement et très amicalement Mademoiselle C. BESSAU, Secrétaire, pour la frappe et la mise en page de cette thèse.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	p. 2
MATERIEL ET METHODES	p. 7
I. - MODELE BIOLOGIQUE	p. 7
II. - TECHNIQUES OPERATOIRES	p. 7
III. - TECHNIQUE DE CULTURE	p. 9
1) Prélèvement des bourgeons de membre	p. 9
2) Système de culture	p. 13
3) Conditions de culture	P. 14
a) Traitements au dbAMPc	P. 14
b) Incubation en présence de 5 BrdU	P. 14
IV. - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES	p. 14
1) Mesures d'incorporation de sulfate de sodium radioactif dans les glycosaminoglycannes sulfatés	p. 14
2) Caractérisation des protéoglycannes	p. 15
a) Extraction des protéoglycannes	p. 15
b) Tamisage moléculaire	p. 16
V. - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES	p. 17
1) Fixation et coloration des cultures	p. 17
2) Immunofluorescence	p. 17
CHAPITRE I : EFFETS D'UN TRAITEMENT AU db AMPc SUR LA CHONDROGENESE DE BOURGEONS DE MEMBRES DE SOURIS A DIFFERENTS STADES DE DEVELOPPEMENT ---	p. 20
INTRODUCTION	p. 20
PROTOCOLE EXPERIMENTAL	p. 21
RESULTATS	p. 22
1) Bourgeons de membres de stade 17	p. 22
a) Etude macroscopique et microscopique	p. 22

b) Analyse de la teneur en DNA	-----	p. 25
c) Evolution de l'accumulation des GAG sulfatés	-----	p. 25
2) Bourgeons de membres de stade 19	-----	p. 29
a) Etude macroscopique et microscopique	-----	p. 29
b) Analyse de la teneur en DNA	-----	p. 30
c) Evolution de l'accumulation des GAG sulfatés	-----	p. 30
3) Bourgeons de membres de stade 20	-----	p. 30
a) Etude macroscopique et microscopique	-----	p. 30
b) Analyse de la teneur en DNA	-----	p. 31
c) Evolution de l'accumulation des GAG sulfatés	-----	p. 31
 DISCUSSION	-----	 P. 31
 CHAPITRE II : RECHERCHE DE LA DISTRIBUTION TEMPORELLE ET SPATIALE DES POPULATIONS CELLULAIRES RECEPTIVES AU dbAMPc	-----	 p. 40
 INTRODUCTION	-----	 p. 40
 PROTOCOLE EXPERIMENTAL	-----	 p. 41
 RESULTATS	-----	 p. 42
 I. - RECEPTIVITE TEMPORELLE	-----	 p. 42
1) Explants antérieurs "Ecto +"	-----	p. 44
a) Etude microscopique	-----	p. 44
b) Analyse de la teneur en DNA	-----	p. 44
c) Evolution de l'accumulation des GAG sulfatés	-----	p. 48
2) Explants antérieurs "Ecto -"	-----	p. 48
a) Etude microscopique	-----	p. 48
b) Analyse de la teneur en DNA	-----	p. 49
c) Evolution de l'accumulation des GAG sulfatés	-----	p. 49
3) Explants postérieurs "Ecto +"	-----	p. 49
a) Etude microscopique	-----	p. 49
b) Analyse de la teneur en DNA	-----	p. 49
c) Evolution de l'accumulation des GAG sulfatés	-----	p. 50

4) Explants postérieurs "Ecto -"	-----	p. 50
a) Etude microscopique	-----	p. 50
b) Analyse de la teneur en DNA	-----	p. 50
c) Evolution de l'accumulation des GA sulfatés	-----	p. 51
II. - RECEPTIVITE SPATIALE	-----	p. 52
1) Incorporation de 5-BrdU	-----	p. 52
a) Traitement au dbAMPc appliqué au cours du premier jour de culture	-----	p. 52
b) Traitement au dbAMPc appliqué au cours du deuxième jour de culture	-----	p. 52
c) Traitement au dbAMPc appliqué au cours du troisième jour de culture	-----	p. 53
2) Aspect macroscopique après 6 jours de culture	-----	p. 53
DISCUSSION	-----	p. 62
CHAPITRE III : INFLUENCE DE L'ECTODERME ET DU dbAMPc SUR LES PROTEOGLYCANNES DE LA MATRICE CARTILAGINEUSE	-----	p. 70
INTRODUCTION	-----	p. 70
PROTOCOLE EXPERIMENTAL	-----	p. 75
RESULTATS	-----	P. 75
I. - CONDITIONS DISSOCIANTES	-----	p. 75
II. - CONDITIONS ASSOCIATIVES	-----	p. 78
DISCUSSION	-----	p. 80
CONCLUSION GENERALE	-----	p. 85
BIBLIOGRAPHIE	-----	p. 88

INTRODUCTION

Le début de la morphogenèse des membres chez les Vertébrés Amniotes est caractérisé par la mise en place de bourgeons constitués d'un amas mésodermique recouvert d'une enveloppe ectodermique. Ce feuillet externe présente dans la région distale du bourgeon un épaissement antéro-postérieur : la crête apicale. Au cours de la croissance de ces bourgeons s'édifie un squelette embryonnaire cartilagineux issu des cellules mésodermiques. La détermination de ces cellules puis la différenciation des structures squelettiques semblent dépendre de nombreux facteurs (revue de ELMER, 1982) :

1. - les corrélations ecto-mésodermiques

D'une part, l'excision de la crête apicale entraîne l'arrêt du développement du membre (SAUNDERS, 1948) et d'autre part, la greffe d'une crête apicale supplémentaire a la capacité d'induire la croissance d'un membre surnuméraire (SWILLING, 1956 ; SAUNDERS *et al.* 1976). Réciproquement, le mésoderme semble produire un facteur nécessaire au maintien de l'intégrité de la crête (AEMF = Apical ectodermal maintenance factor, SWILLING et HANSBOROUGH, 1956).

2. - les interactions cellulaires dans le mésoderme

Le premier signe indiquant le début de la différenciation cartilagineuse est l'apparition, au sein du mésoderme, de régions de forte densité cellulaire : les condensations cellulaires ou blastèmes. Au cours de cette phase de condensation, les cellules prennent une forme ronde caractéristique des cellules sécrétrices de matrice cartilagineuse (ARCHER *et al.* ,1982 ; ZANETTI et SOLURSH, 1984 et 1986) et des modifications de surface cellulaire apparaissent, mises en évidence par l'utilisation de lectines (ZIMMERMANN et THIES, 1984)

3. - les facteurs macromoléculaires

La fibronectine (SWALLA et SOLURSH, 1984) semble jouer un rôle inhibiteur de la différenciation cartilagineuse. Inversement, les prostaglandines (KOSHER et WALKER, 1983 ; KOSHER et GAY, 1985) et les lectines (MATSUTANI et KURODA, 1982 ; MATSUTANI et YAMAGATA, 1982) paraissent activer la chondrogenèse. Quant à l'acide hyaluronique, bien qu'il

soit considéré comme un inhibiteur de la chondrogenèse par certains auteurs (KOSHER *et al.*, 1981 ; TOOLE *et al.*, 1984 ; KNUDSON et TOOLE, 1985) des travaux récents ont montré qu'il peut dans certaines conditions être activateur (KUJAWA *et al.*, 1986 a et b).

4. - les facteurs métaboliques

Représentés principalement par des nucléotides cycliques (guanosine 3'5' monophosphate cyclique = GMPc ; adénosine 3'5' monophosphate cyclique = AMPc) qui soit par leur présence, soit par l'évolution de leurs concentrations respectives paraissent jouer un rôle déterminant dans la différenciation des cellules du bourgeon (HO *et al.*, 1982).

D'après les résultats des travaux effectués *in vivo* sur le poulet et la souris, un schéma récapitulatif des étapes conduisant à la chondrogenèse de certaines cellules du bourgeon de membre peut être décrit dans les termes suivants :

La prolifération des cellules mésodermiques et la mise en place progressive des divers segments du membre requièrent la présence de la crête apicale. Son excision provoque des déficiences distales d'autant plus importantes que l'ablation est précoce. Ces observations sont à relier directement au concept de "progress zone" selon lequel le destin des cellules du mésoderme de membre est régi par la durée de leur séjour au sein d'une zone de 230 μm d'épaisseur environ, directement située sous la crête (SUMMERBELL et LEWIS, 1975). Plus ce séjour est long et plus les structures cartilagineuses auxquelles les cellules donneront naissance sont distales (SUMMERBELL *et al.*, 1973).

L'ectoderme et plus particulièrement la crête apicale influencent donc fortement le comportement des cellules mésenchymateuses sous jacentes. Ils semblent favoriser l'accumulation d'acide hyaluronique à la périphérie du bourgeon où les cellules sont isolées les unes des autres par d'importantes quantités d'une matrice extracellulaire sensible à la hyaluronidase (SINGLEY et SOLURSH, 1981). Quand on se rapproche du coeur du bourgeon, la quantité de matrice extracellulaire diminue et des zones de forte densité cellulaire apparaissent (THOROGOOD et HINCHLIFFE, 1975). Il est vraisemblable que des contacts privilégiés permettent alors l'échange

de messages entre les cellules étroitement associées de ces amas. Ces interactions cellulaires sont une condition préalable nécessaire à l'initiation de la chondrogenèse car elles semblent être à l'origine de l'augmentation du taux intracellulaire d'AMPc indispensable au démarrage des synthèses des constituants de la matrice cartilagineuse (HO *et al.*, 1982).

Ces observations ont pu être en partie confirmées par une série de travaux effectués *in vitro* sur des embryons de poulets et de souris, à l'aide de deux modèles expérimentaux différents :

- des cultures d'apex de bourgeons de membres
- des cultures en micromasse de mésenchyme de membre

Quel que soit le système expérimental mis en oeuvre, les résultats montrent que :

1. Les corrélations ecto-mésodermiques intervenant lors de la différenciation squelettique dans les membres embryonnaires présentent trois phases successives. Au cours de la première phase l'ectoderme se montre indispensable pour la survie du mésoderme et nécessaire pour promouvoir la différenciation cartilagineuse (MILAIRE et MULNARD, 1968 ; GUMPEL-PINOT, 1982). La phase suivante se caractérise par le fait que l'ectoderme empêche la chondrogenèse anarchique du mésoderme et dirige la morphogenèse du bourgeon de membre (KOSHER *et al.*, 1979 a ; DESBIENS, 1983). Enfin, au cours de la dernière phase, le mésoderme est déterminé : isolé, il effectue une organogénèse squelettique normale (DESBIENS *et al.*, 1985).

2. D'importantes quantités d'acide hyaluronique, synthétisées et sécrétées par la crête apicale (KOSHER et SAVAGE, 1981) se distribuent sous la forme d'un gradient le long de l'axe proximo-distal du bourgeon de membre (KOSHER *et al.*, 1981)

3. Sorties de la zone d'influence de l'ectoderme, les cellules s'arrondissent et s'agrègent (THOROGOOD et HINCHLIFFE, 1975 ; ARCHER *et al.*, 1982). Un modèle mathématique tente d'expliquer le processus de condensation cellulaire en terme de gonflement et de contraction du gel dont est constitué la matrice extracellulaire. Ces deux états seraient conditionnés par le degré d'hydratation du gel et par le système acide hyaluronique/hyaluronidase. L'enzyme favoriserait la contraction du gel en détruisant l'acide hyaluronique et faciliterait le rapprochement des cellules (OSTER *et al.*, 1985).

4. L'augmentation du taux d'AMPC au sein de ces cellules précède les premiers signes de l'expression de la chondrogenèse (SOLURSH *et al.*, 1979 ; HO *et al.* 1982). Un traitement au dibutyryl adénosine 3'5' monophosphate cyclique (dbAMPc) de cultures organotypiques et cellulaires de mésoderme de membre induit et stimule la chondrogenèse en jouant un rôle antagoniste de celui de la crête apicale (AHRENS *et al.*, 1977 ; MERKER et GÜNTHER, 1979 ; KOSHER *et al.* 1979 b ; SOLURSH *et al.* 1981 a ; OWENS et SOLURSH, 1981).

Munis de ces données et conscients de l'importance de la place tenue par l'AMPC dans les processus d'induction et de stimulation de la chondrogenèse, nous avons étudié sur des cultures organotypiques de membres de souris traitées au dbAMPc.

1. L'antagonisme ectoderme - AMPc
2. L'influence du stade de développement des bourgeons de membres sur leur réceptivité vis-à-vis du nucléotide.
3. La localisation des cellules réceptives et l'évolution de leur réceptivité.
4. L'influence de l'ectoderme et du nucléotide sur la nature des composants de la matrice cartilagineuse.

MATERIEL ET METHODES

Ce chapitre a pour objet de récapituler et de décrire en détail les conditions expérimentales et les techniques essentielles utilisées au cours de cette étude. Des compléments techniques spécifiques seront présentés dans le cours de l'exposé des résultats.

I. - MODELE BIOLOGIQUE

Des souris de la souche Swiss sont élevées au laboratoire . Les femelles sont groupées par 5 dans une même cage. Les accouplements sont assurés en plaçant dans chaque cage un seul mâle pendant une nuit. Le lendemain matin, la découverte d'un bouchon vaginal, considéré comme indice d'accouplement, détermine le jour 0 du calendrier de gestation. Après dislocation des vertèbres cervicales, les femelles supposées gravides sont opérées aux jours 10, 11 et 12 de gestation ce qui permet de sélectionner des embryons parvenus respectivement aux stades 17, 19 et 20 (THEILER, 1972) (Planche I). Si l'on considère que le bord préaxial du bourgeon de membre antérieur est adjacent au somite n° 7, les embryons de stade 17 ont 35 à 39 paires de somites et les embryons de stade 19 ont 45 paires de somites et plus. Au stade 20, les somites de la région du tronc disparaissent rendant impossible leur comptage.

II. - TECHNIQUES OPERATOIRES

Après passage du pelage à l'éthanol 96°, l'opération débute par une incision circulaire au niveau de la ceinture scapulaire . La peau est alors retournée comme un doigt de gant jusqu'à la ceinture pelvienne. La paroi musculaire, badigeonnée à l'éthanol 96°, est ouverte au niveau de l'abdomen. Les deux cornes utérines en sont extraites et maintenues immergées dans la solution

-8-

PLANCHE I : Table de développement des bourgeons de membres de souris: reconstitution d'après THEILER (1972) et MILAIRE (1976).

S = somites

	Jour 9,5	Jour 10	Jour 10,5	Jour 11	Jour 11,5	Jour 12	Jour 12,5	Jour 13
	21 à 29 S.	30 à 34 S.	35 à 39 S.	40 à 44 S.	45 S. et +			
	St.15	St.16	St.17	St.18	St.19	St.20	St.20 âgé	St.21
Membre Antérieur								
Membre Postérieur								



Condensations précartilagineuses



Foyers de dégénérescence

1mm



saline stérile de Earle :

- NaCl 6,8 g
- KCl 0,4 g
- CaCl₂ 0,2 g
- Mg SO₄, 7 H₂O 0,2 g
- Na H₂ PO₄, H₂O 0,14 g
- Na H CO₃ 2,2 g
- Glucose 1 g
- Rouge de Phénol 0,01 g
- Eau bidistillée 1 l
- Antibiotiques : Pénicilline 50 UI/ml
Streptomycine 50 µg/ml

Les cornes utérines sont nettoyées par agitation dans cette solution saline. Chaque site de nidation est isolé puis transféré dans un second bain de lavage. Les embryons sont débarassés de leurs annexes et transférés à l'aide d'une pipette dans un dernier bain où ils sont opérés.

III. TECHNIQUE DE CULTURE

1) Prélèvement des bourgeons de membres

Au stade 17, les bourgeons de membres antérieurs et postérieurs complets sont excisés des flancs de chaque embryon. Pour les stades 19 et 20, seule la partie apicale des bourgeons (400 à 500 µm) est prélevée. Pour chaque stade, les bourgeons postérieurs présentent un certain retard de développement par rapport aux ébauches antérieures (Planches I, II, III). Les explants de chaque type sont divisés en deux lots identiques. Le premier ne subit aucun traitement particulier et constitue le lot d'explants intacts ou "Ecto +". Le second est lavé dans une solution saline stérile

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES PLANCHES II ET III

C : Ceinture

S : Stylopede

Z : Zeugopode

B : Basipode

M : M6tapode

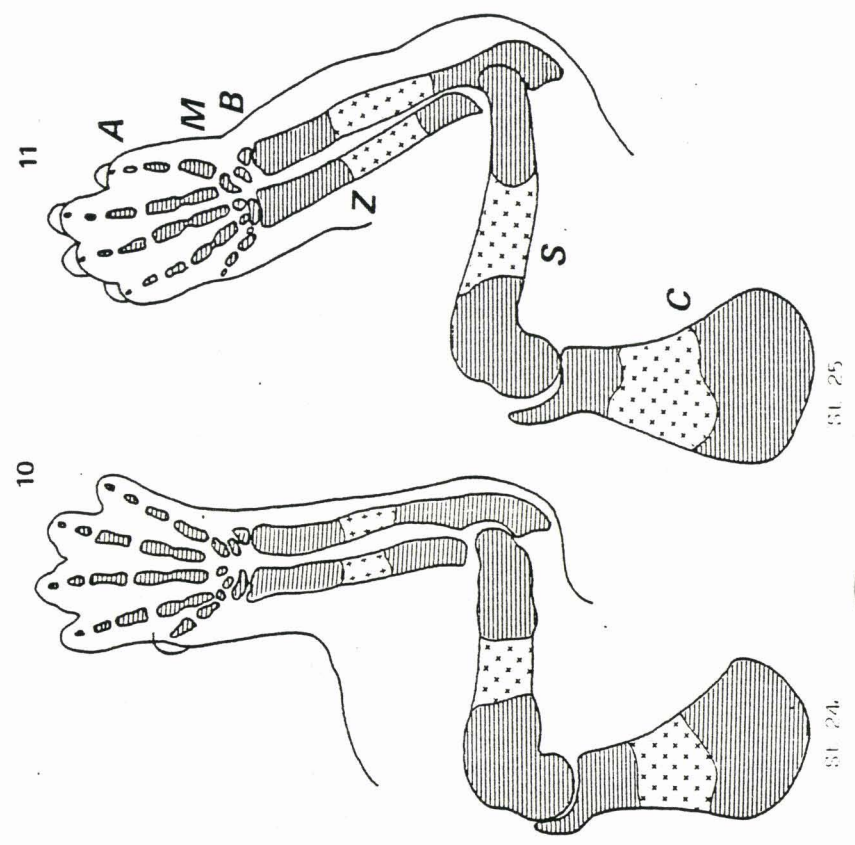
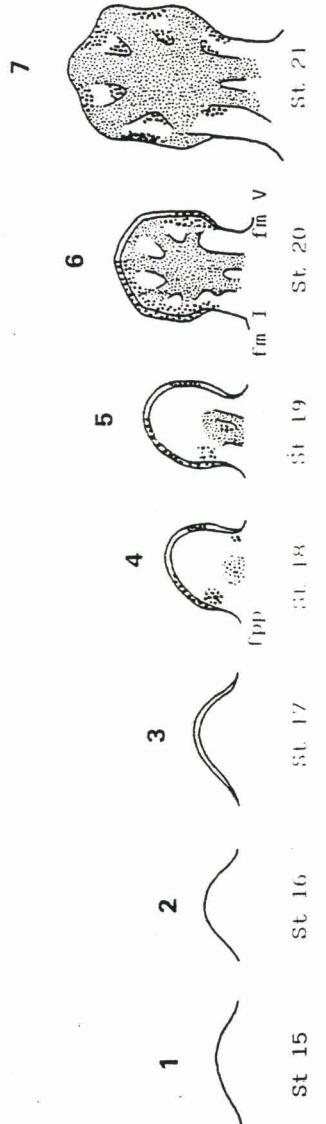
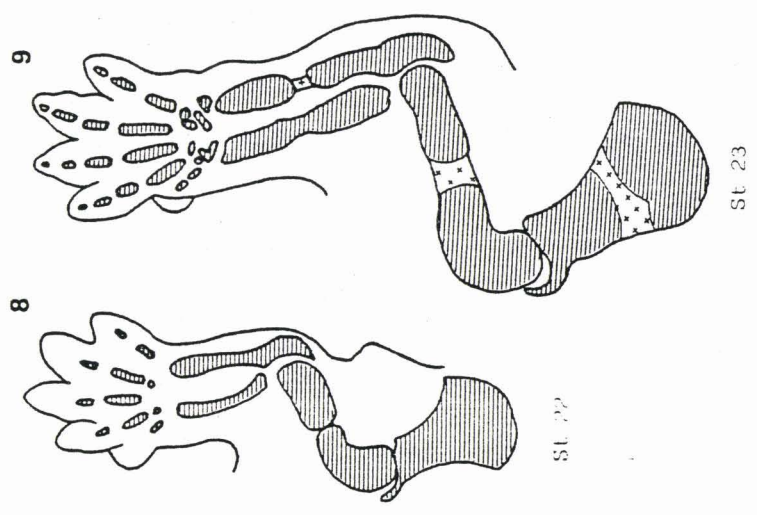
A : Acropode

fpp : foyer pr6axial primaire





fm I : foyer marginal pr6axial

fm V : foyer marginal postaxial

PLANCHE II : Développement d'un bourgeon de membre antérieur droit de souris, observé par sa face dorsale.



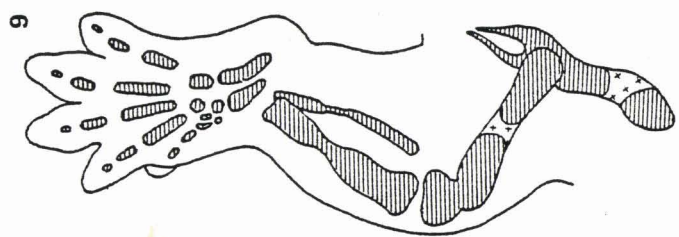
Développement d'un bourgeon antérieur droit observé par sa face dorsale.

 Foyers de dégénérescence
 Condensations précartilagineuses
 Cartilage
 Zone d'ossification

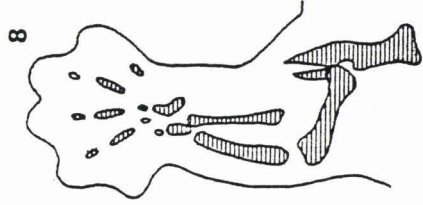
1 mm



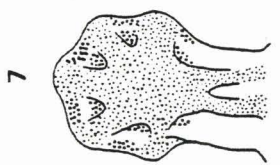
PLANCHE III : Développement d'un bourgeon de membre postérieur droit de souris, observé par sa face dorsale.



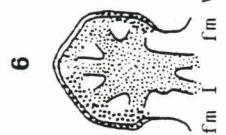
St. 23



St. 22



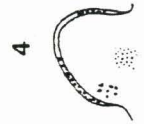
St. 21



St. 20



St. 19



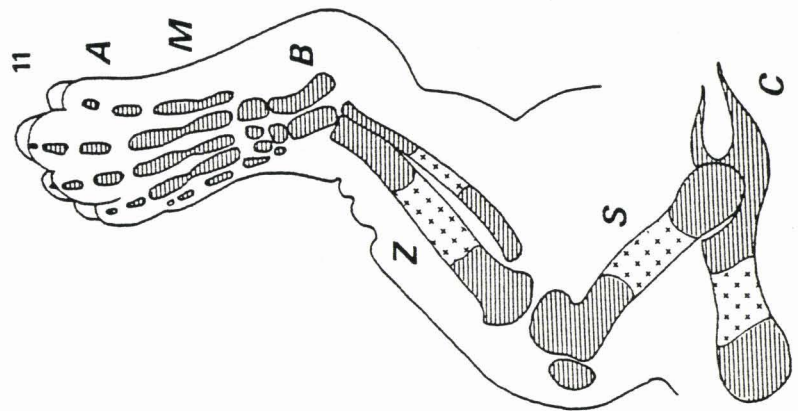
St. 18



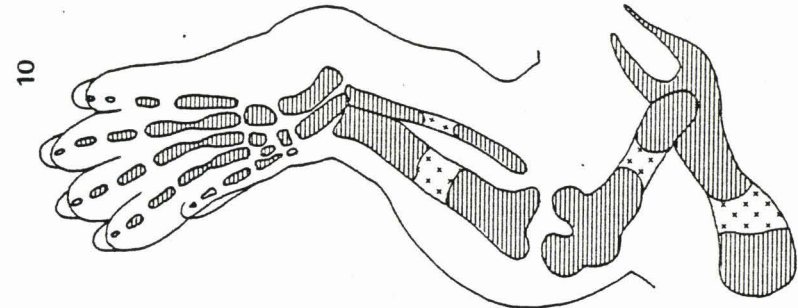
St. 17



St. 16







St. 25



St. 24

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

-  Foyers de dégénérescence
-  Condensations précartilagineuses
-  Cartilage
-  Zone d'ossification

1 mm



dépourvue de calcium :

NaCl 8 g

KCl 0,2 g

Na₂HPO₄ 1,15 g

KH₂PO₄ 0,2 g

MgCl₂, 6H₂O 0,1 g

Rouge de Phénol 0,01 g

Eau bidistillée 1 l

Antibiotiques : Pénicilline 50 UI/ml

Streptomycine 50 µg/ml

Après lavage, les explants sont soumis à l'action de la trypsine à 2 % (Difco) dans la solution saline stérile précédente afin de séparer l'ectoderme du mésoderme. Selon l'âge des bourgeons, la digestion dure de 8 à 12 mn à 37°C. L'action enzymatique est stoppée par immersion des explants dans du sérum de veau où l'ectoderme est éliminé à l'aide d'aiguilles et de pincettes fines. Les massifs mésodermiques isolés (explants dénudés ou "Ecto -") sont ensuite lavés dans le milieu de culture.

2) Système de culture

La culture est menée selon un procédé dérivé de celui de TROWELL (1954). Les explants antérieurs et postérieurs "Ecto +" et "Ecto -" d'un stade donné sont déposés par deux sur un même fragment de filtre Millipore (porosité 1,22 µm) en évitant qu'ils soient au contact l'un de l'autre. Les filtres sont disposés, par deux ou trois, à la surface de grilles en acier inoxydable reposant sur le fond d'une boîte de Pétri en matière plastique de 3,5 cm de diamètre (Corning). Le niveau du milieu de culture est ajusté au ras de la surface de la grille de façon à mouiller les filtres sans les submerger. Les explants sont donc cultivés à l'interface gaz-liquide.

3) Conditions de culture

Le milieu de culture est constitué de MEM (minimum essential medium) avec sels de Earle additionné de 10 % de sérum de veau foetal (Gibco) et d'antibiotiques (pénicilline 50 UI/ml, Streptomycine 50 µg/ml). Les boîtes de Pétri sont placées en incubateur à 37° C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂. La moitié du milieu est renouvelée toutes les 24 h.

a) Traitements au dibutyryl adénosine monophosphate cyclique (db AMPc)

Le milieu de culture contient 1 mM de N⁶,0²-dibutyryl adénosine 3'5' monophosphate cyclique (sel de sodium, Serva). Ce milieu est utilisé soit 24 h. après le début de la culture pendant une durée de 48 h., soit pendant une durée de 24 h. coïncidant avec chacun des trois premiers jours de la culture.

b) Incubation en présence de 5 Bromodéoxyuridine (5-BrdU)

Le milieu de culture contient 50 µM de 5-BrdU (Sigma) et une quantité équimolaire de déoxycytidine. Les cultures sont incubées dans ce milieu pendant 24 h., soit de 4 h. à 28 h. ; soit de 28 h. à 52 h. ; soit enfin de 52 h. à 76 h.

IV. - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

1) Mesures d'incorporation de sulfate de sodium radioactif dans les glycosaminoglycannes sulfatés.

Le marquage radioactif est assuré en apportant au milieu du sulfate de sodium (Na₂³⁵SO₄, Amersham, activité spécifique 100 mCi/mmol), à raison de 1 µCi/ml de façon continue au cours de la culture. Après 24 h. et 72 h. de culture, les explants d'une même catégorie sont homogénéisés par deux à l'appareil de Potter et soumis 30 secondes aux ultrasons (MSE, 150 Watt Ultrasonic Desintegrator). Des fractions aliquotes des homogénats sont prélevées pour effectuer les dosages de DNA alors que le reste est soumis à une digestion protéolytique à 37°C. Celle-ci est assurée par

l'action d'une solution (Tampon Tris/HCl 0,2 M, avec acétate de calcium 0,1 M, pH 8) contenant 400 µg/ml de pronase (Calbiochem) ajoutée au broyat afin d'obtenir un rapport enzyme-substrat de 1/50 (la teneur en protéines a été déterminée au préalable par la méthode de LOWRY modifiée par MARKWELL *et al.*, 1978). Après 48 h., les glycosaminoglycannes sont précipités pendant 3 h. à température ambiante par du chlorure de cétypyridinium (CPC) 1 % dans le NaCl 0,02 M (SAARNI et TAMMI, 1977). Le précipité est recueilli sur filtre Millipore (porosité 0,45 µm) après filtration sous vide partiel. Les filtres lavés au CPC sont ensuite séchés à l'étuve à 37°C puis dissous dans 6 ml de liquide scintillant (Lipofluor, J.T. Baker Chemicals). La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (LKB Wallac 1215). La radioactivité exprimée en coups par minutes (Cpm) est rapportée à la teneur en DNA.

La teneur en DNA est déterminée par la technique de BRUNK *et al.* (1979). Le principe de cette méthode est basé sur la propriété du 4,6 diamidino 2 phénylindole (DAPI) de se combiner spécifiquement aux paires de bases adénine-thymine pour donner un complexe fluorescent dont les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont respectivement 360 nm et 450 nm. La gamme étalon est réalisée dans une solution tampon pH7 (NaCl 100 mM, Tris 10 mM, EDTA 10 mM) à partir de DNA de thymus de veau . Les mesures sont effectuées à l'aide d'un spectrofluorimètre (Perkin Elmer, LS 3).

2) Caractérisation des protéoglycannes

Les explants sont incubés pendant 3 jours dans un milieu de culture contenant 10 µCi/ml de sulfate de sodium ($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, New England Nuclear, activité spécifique 500mCi/mmol).

a) Extraction des protéoglycannes

A l'issue de la culture, des explants (50 d'une même série expérimentale) sont rincés dans la solution saline de Earle puis placés dans 2 ml d'une solution de chlorure de guanidine 4 M (GuHCl, Sigma), tamponnée à pH 5,8 par de l'acétate de sodium 0,05 M (Merck) et contenant des inhibiteurs de protéases : de l'EDTA 0,01 M, sel disodique (Sigma), de l'acide 6-aminohexanoïque 0,1 M (Sigma), du chlorure de benzamidine 0,005 M (Sigma) (OVADIA *et al.* , 1980).

Dans ces conditions dites "dissociantes", les protéoglycannes présents dans la matrice

cartilagineuse sous forme d'agrégats multimoléculaires sont dissociés en monomères. L'extraction a lieu sous agitation pendant 48 h. à 4°C. L'extrait est ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes (Beckman, Microfuge 12).

La moitié de cet extrait est ensuite dialysée à 4°C pendant 24 h. (membrane Spectrapor 3, Spectrum Medical Industries) contre 2 bains d'acétate de sodium 0,5 M en présence d'inhibiteurs de protéases. Dans ces conditions, dites "associatives", les protéoglycannes reforment des agrégats (HASCALL et KIMURA, 1981) et l'on peut déterminer le pourcentage de monomères capables d'interagir avec l'acide hyaluronique et les protéines de liaison endogènes présents dans l'extrait.

b) Tamisage moléculaire

Le tamisage moléculaire est une technique chromatographique qui permet de séparer des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. La séparation est réalisée dans des colonnes sur des granules de gels poreux. Le diamètre des pores est une caractéristique de chaque type de gel. Les molécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores sont exclues du gel et éluées les premières, les molécules moyennes et petites sont éluées plus tardivement car leur migration est freinée par leur diffusion dans le gel. La séparation est donc réalisée par le fait que les solutés sont élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. La taille d'un soluté donné peut être caractérisée par son coefficient de partage dont la valeur est fournie par l'expression :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

où V_o , V_t , et V_e représentent respectivement le volume mort de la colonne, son volume total et le volume d'éluion du soluté.

Dans la présente étude, les protéoglycannes sont fractionnés selon leur taille sur des colonnes (Pharmacia, 0,9 cm X 60 cm) de Sépharose 2B. En fonction des conditions, dissociantes ou associatives, les éluions sont pratiquées respectivement par du GuHCl 4 M ou par de l'acétate de sodium 0,5 M, à une vitesse de 10 ml/h. Dans le second cas, le gel est au préalable saturé en sérumalbumine bovine (Sigma, 1 mg/ml) afin de limiter les adsorptions non spécifiques des protéoglycannes. Les fractions recueillies ont un volume de 0,8 ml. La radioactivité contenue dans chaque fraction est déterminée après addition de 10 ml de liquide scintillant (ACS, Amersham). Les

mesures, exprimées en Cpm sont effectuées pendant une durée de 4 mn dans un compteur à scintillation (Intertechnique, SL 4000).

V. - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

1) Fixation et coloration des cultures

Les explants sont fixés pendant 24 h. dans du Bouin Hollande acétique. Après lavage, une première coloration au bleu Alcian 0,5 %, pH 1, spécifique des groupements sulfatés (LEV et SPICER, 1964) est effectuée *in toto*. Après lavage et déshydratation, les explants sont éclaircis par le mélange salicylate de méthyle (4 parties) benzoate de benzyle (1 partie) afin de pouvoir apprécier l'étendue de la chondrogenèse. Ceux-ci sont ensuite rincés à l'éthanol absolu puis placés dans le butanol avant leur inclusion dans la paraffine. Les blocs sont débités en coupes de 6 µm d'épaisseur. Les lames sont colorées à nouveau au bleu Alcian 0,5 %, pH1, puis à l'hématoxyline de Groat afin d'examiner l'étendue et la localisation de la matrice extracellulaire, la fréquence et la localisation des mitoses et, lorsqu'il est présent, l'étendue et l'aspect de l'ectoderme.

2) Immunofluorescence

Les cultures préalablement incubées en présence de 5-BrdU sont fixées au Bouin Hollande acétique, lavées, déshydratées et incluses dans la paraffine. La 5-BrdU incorporée dans le DNA des cellules au cours de l'incubation est révélée sur coupes histologiques par une technique d'immunofluorescence indirecte selon les indications du laboratoire Partec : les coupes histologiques de 6 µm d'épaisseur sont traitées à température ambiante pendant 20 mn par de l'HCl 1,5 N puis rincées 2 fois pendant 10 mn dans du tampon phosphate pH 7,4 (Na₂ HPO₄ 10 mM, Na H₂ PO₄ 10 mM, NaCl 100 mM). Les coupes sont ensuite incubées pendant 1 h. à 37°C en présence de l'anticorps anti BrdU, fabriqué chez la souris, dilué au 1/100 dans le tampon contenant 0,5 % de Tween 20 et 0,5 % de séralbumine bovine. Après deux rinçages de 10 mn dans le

tampon phosphate, les coupes sont recouvertes pendant 45 mn à 37°C d'une solution au 1/100 d'anti IgG de souris, fabriquées chez le lapin, marquées au fluoroisothiocyanate (FITC). Après deux derniers rinçages dans le tampon, les coupes sont colorées pendant 10 mn au bleu Evans (1/10000) et les lames sont montées dans le glycérol. Les coupes sont observées avec un microscope à fluorescence (OLYMPUS, BH2 RFL). Après observation, les coupes sont reprises par la double coloration au bleu Alcian et à l'hématoxyline de Groat afin de compléter le repérage des cellules à l'intérieur des bourgeons.

CHAPITRE I

EFFETS D'UN TRAITEMENT AU dbAMPc SUR LA CHONDROGENESE DE BOURGEONS DE MEMBRES DE SOURIS A DIFFERENTS STADES DE DEVELOPPEMENT

INTRODUCTION

Au cours du développement embryonnaire du membre de Vertébré, une augmentation du taux intracellulaire d'AMPc a été mesurée au début de la chondrogenèse *in vitro* dans le bourgeon de membre de souris (HO *et al.*, 1982) et de poulet (SOLURSH *et al.*, 1979). Par ailleurs, en dépit de différences au niveau des modèles biologiques étudiés, des stades de développement des bourgeons de membres et des conditions d'administration des nucléotides, un apport exogène d'un dérivé d'AMPc provoque une induction ou une stimulation de la différenciation cartilagineuse à la fois dans des cultures cellulaires de mésoderme de membres (AHRENS *et al.*, 1977 ; OWENS et SOLURSH 1981 ; SOLURSH *et al.*, 1981 a) et dans des cultures organotypiques (MERKER et GÜNTHER, 1979 ; KOSHER *et al.*, 1979 b ; KOSHER et SAVAGE, 1980).

Toutefois, le mécanisme par lequel l'AMPc agit sur la différenciation cartilagineuse et sur la morphogenèse est encore mal connu. Ce nucléotide pourrait soit stimuler la synthèse des composants de la matrice cartilagineuse dans les chondrocytes différenciés (DREZNER *et al.*, 1976 ; MERKER et GÜNTHER, 1979 ; MILLER *et al.*, 1979) soit augmenter le nombre des cellules chondrogènes par l'un des trois mécanismes suivants :

1. - Les cellules apicales et périnodulaires, entourant les condensations dans lesquelles les cellules sont déjà engagées dans la chondrogenèse, pourraient arrêter leur prolifération et se déterminer au cours d'un blocage transitoire du cycle cellulaire (HERKEN, 1975 ; SOLURSH et REITER, 1975 ; MILLER *et al.*, 1979).

2. - Inversement, les cellules déterminées, qui ne sont pas encore différenciées, pourraient continuer de proliférer : pour certains auteurs la sortie du cycle des cellules mésodermiques n'est pas nécessaire pour qu'elles se différencient en chondrocytes (GEORGE *et al.*, 1983). En effet,

bien que l'AMPc soit considéré comme un inhibiteur de la division cellulaire (SOLURSH et REITER, 1975), le dbAMPc qui augmente le taux intracellulaire d'AMPc stimule la synthèse de DNA dans des cultures de régénérats d'amphibien (FORET et BABICH, 1973, CARLONE et FORET, 1979).

Ces deux mécanismes augmenteraient le nombre de cellules chondrogènes potentielles avant leur différenciation .

3. - La stimulation de la prolifération pourrait concerner les chondrocytes différenciés. Normalement, l'élongation proximo-distale des ébauches squelettiques a lieu après l'établissement du patron squelettique (SUMMERBELL, 1976 ; LEWIS, 1977). Cette croissance pourrait être stimulée par des dérivés de l'AMPc.

Tous ces mécanismes ne sont pas exclusifs. L'AMPc pourrait à la fois augmenter le nombre de cellules chondrogènes et stimuler la synthèse de la matrice cartilagineuse. En résumé, l'AMPc pourrait agir sur les cellules avant ou après leur différenciation en chondrocytes.

L'objet de ce travail est d'approfondir la connaissance des rôles de l'AMPc et de l'ectoderme dans la croissance et la différenciation de cultures organotypiques de bourgeons de membres de souris à plusieurs stades de développement. Les mesures de la teneur en DNA et l'analyse de l'incorporation de sulfate radioactif dans les glycosaminoglycannes (GAG) sulfatés de la matrice cartilagineuse ont montré que la réponse des cultures au nucléotide varie en fonction de l'âge des bourgeons. La chondrogenèse est stimulée dans les bourgeons de membres de stades 17 et 19 (table de THEILER, 1972) alors qu'au stade 20, la différenciation cartilagineuse est inhibée. Par ailleurs, l'ectoderme réduit l'effet activateur du nucléotide sur la chondrogenèse.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les bourgeons de membres antérieurs et postérieurs âgés de 10 à 12 jours sont mis en culture en présence ou non de leur couverture ectodermique, pendant une durée de 3 jours. Puisque AHRENS *et al.* (1977) ont signalé que de jeunes cellules mésodermiques traitées au dbAMPc dès le début de la culture, ne se différencient pas en cartilage, le milieu contenant le dbAMPc n'est utilisé

que 24 h. après le début de la culture et renouvelé par moitié à 48 h.

Les explants sont incubés pendant toute la durée de la culture en présence d'1 $\mu\text{Ci/ml}$ de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (Amersham, activité spécifique 100 mCi/mmol). La chondrogenèse est estimée par les mesures d'incorporation de sulfate dans les glycosaminoglycannes sulfatés. Tous les résultats expriment des valeurs moyennes calculées à partir de mesures correspondant à 2 explants. Le nombre de mesures figure à côté de chaque valeur. La significativité des résultats a été contrôlée à l'aide du test t de Student ($p < 0,05$). Dans chaque série expérimentale, des explants sont fixés et colorés à l'issue des 3 jours de culture.

RESULTATS

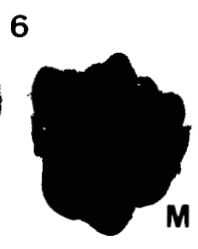
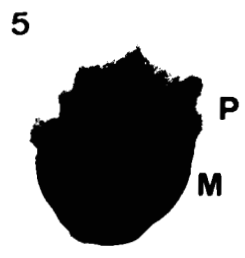
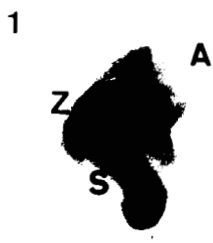
1) Bourgeons de membres de stade 17

a) Etude macroscopique et microscopique

- Aspect des cultures non traitées

Au moment du prélèvement, les bourgeons de membres de stade 17 sont constitués d'un mésenchyme lâche et homogène. En fin de culture, les aspects *in toto* des bourgeons intacts sont le reflet d'une bonne chondrogenèse : dans les meilleurs cas, les ébauches squelettiques des bourgeons antérieurs sont identifiables (Planche IV, Fig. 1). Les explants antérieurs intacts présentent du cartilage hypertrophique dans le tiers proximal et des cellules mésenchymateuses dans le tiers distal où les figures de mitoses sont nombreuses. Leur partie intermédiaire est occupée par des condensations cellulaires. Dans certains cas, un fin liseré bleuté situé entre ces cellules, témoigne du démarrage de la synthèse des constituants de la matrice. En général, l'ectoderme ne recouvre pas plus de la moitié de l'explant, la partie proximale est toujours dénudée en fin de culture (Planche IV, Fig 7). les bourgeons postérieurs quant à eux, sont constitués de nodules cartilagineux dans la moitié proximale et de cellules mésenchymateuses dans la moitié distale.

Tous les bourgeons dénudés sont le siège d'une chondrogenèse anarchique et sont aplatis sur



BU
LILLE

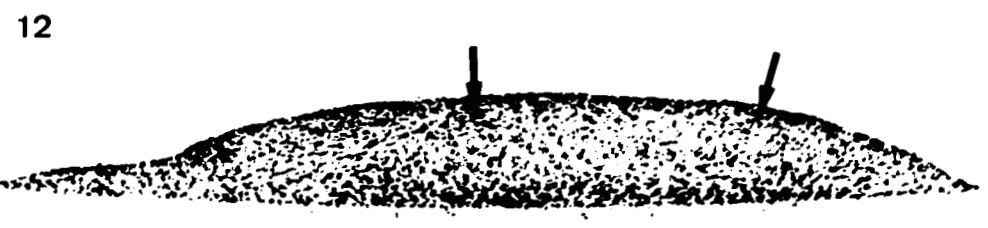
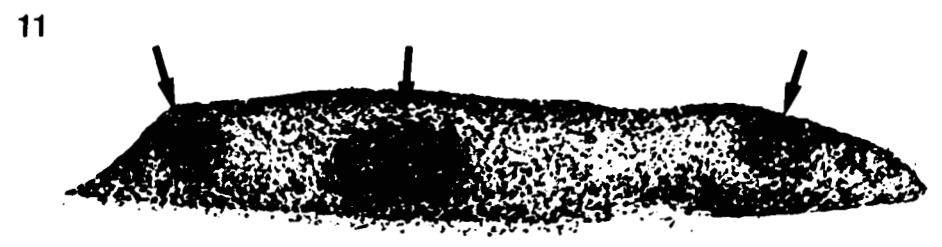
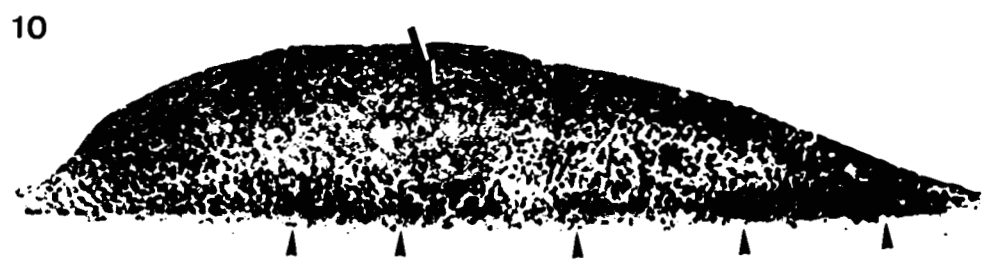
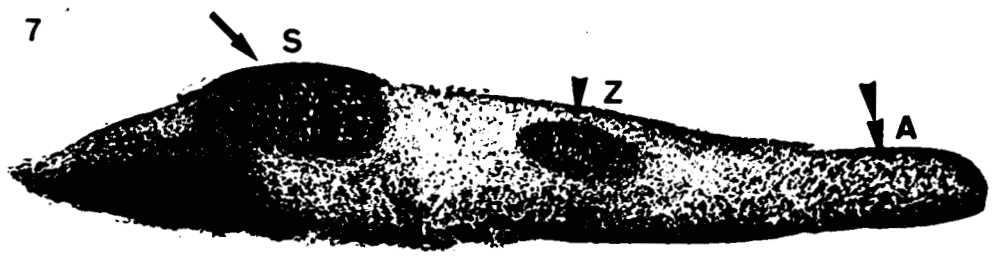


PLANCHE IV : Effets d'un traitement long (48h.) et tardif (après 24h. de culture) au dbAMPc (1 mM) sur des bourgeons de membres de souris de stades 17, 19 et 20.

Les figures 1 à 6 représentent l'aspect macroscopique des bourgeons de membres de souris de stades 17, 19, 20 cultivés 72 h. et colorés au bleu Alcian à pH 1.

Fig. 1 et 2 : Bourgeons de membres antérieurs intacts de stade 17, non traité (1) et traité au dbAMPc (2).

L'explant non traité (1) montre un zeugopode (Z) et un stylopede (S) nettement identifiables. La palette autopodiale (A) ne contient pas d'ébauches squelettiques. Dans l'explant traité le stylopede est nettement plus développé que dans l'explant non traité. (X 20)

Fig. 3 et 4 : Bourgeons de membres antérieurs dénudés de stade 19, non traité (3) et traité au dbAMPc (4).

Dans l'explant non traité, de nombreux nodules sont distribués au hasard (3) et les zones internodulaires ne sont pas colorées au bleu Alcian. Au contraire, dans l'explant traité, on observe encore des nodules cartilagineux, mais les zones internodulaires sont fortement colorées. (X 40)

Fig. 5 et 6 : Bourgeons de membres antérieurs intacts de stade 20, non traité (5) et traité au dbAMPc (6).

Le métapode (M) et la rangée de phalanges proximales (P) apparaissent distinctement dans l'explant non traité (5). Au contraire, après traitement, les métacarpiens (M) sont tronqués et de petits nodules faiblement colorés au bleu Alcian se substituent aux phalanges. (5 : X 30 ; 6 : X 35)

Les figures 7 à 12 représentent des coupes histologiques colorées au bleu Alcian pH 1 et à l'hématoxyline de Groat effectuées dans des bourgeons de membres de souris de stades 17, 19 et 20 cultivés 72 h.

Fig. 7 et 8 : Bourgeons de membres antérieurs intacts de stade 17, non traité (7) et traité au dbAMPc (8).

Dans l'explant non traité (7), le stylopede (flèche) est constitué de cartilage hypertrophique. La partie distale présente de nombreuses mitoses (double tête de flèche). Un nodule cartilagineux (tête de flèche) est présent dans la zone du zeugopode. Dans l'explant traité (8), la partie proximale est occupée par un nodule de cartilage hypertrophique (flèche) de plus grande taille que celui de l'explant non traité. Toutefois, l'épaisseur de la matrice cartilagineuse semble comparable. Dans cet explant, le zeugopode est bien développé (tête de flèche). (X 100)

Fig. 9 et 10 : Bourgeons de membres antérieurs dénudés de stade 19, non traité (9) et traité au dbAMPc (10).

L'explant non traité (9) présente des nodules cartilagineux constitués par des cellules entourées d'une matrice épaisse et par des chondrocytes hypertrophiés (flèches). Les zones internodulaires présentent des cellules indifférenciées (têtes de flèches). Dans l'explant traité (10), il existe encore des nodules cartilagineux (flèche) mais le reste de l'explant est occupé par une nappe continue de jeunes chondrocytes. Des cellules indifférenciées (astérisque) sont dispersées et les constituants de la matrice sont très abondants dans le filtre support (têtes de flèches). (X 150)

Fig. 11 et 12 : Bourgeons de membres antérieurs dénudés de stade 20, non traité (11) et traité au dbAMPc (12).

Dans l'explant non traité (11) on observe trois rudiments squelettiques riches en matrice (flèches). Des cellules indifférenciées entourent ces régions. Dans l'explant traité (12), les nodules cartilagineux sont totalement absents. On observe deux zones de condensation cellulaire (flèches) entourées par de nombreuses cellules indifférenciées. (X 120)

le filtre support. Les explants antérieurs sont essentiellement constitués de nodules cartilagineux, présentant une matrice plus ou moins épaisse, entourés par des cellules indifférenciées. Les explants postérieurs présentent plusieurs couches de cellules différenciées.

- Aspect des cultures traitées au dbAMPc

Que les explants soient recouverts ou non par leur ectoderme, le dbAMPc provoque dans tous les cas une augmentation de la taille et de l'affinité au bleu Alcian des zones cartilagineuses. Les ébauches squelettiques sont plus grandes et le diamètre des nodules non identifiables plus important (Planche IV, Fig. 2). Cependant, des coupes transversales effectuées dans des bourgeons de membres intacts cultivés 72 h. ne montrent que de petites différences lorsqu'elles sont comparées à celles des bourgeons traités au dbAMPc : la taille des nodules cartilagineux est légèrement augmentée après le traitement bien que l'épaisseur de la matrice, l'aspect et l'étendue de l'ectoderme semblent identiques (Planche IV, Fig. 8). Les explants dénudés, traités dans les mêmes conditions, sont constitués d'une nappe continue de jeunes chondrocytes.

b) Analyse de la teneur en DNA (Tableau 1)

Le contenu en DNA des explants non traités augmente significativement entre 24 h. et 72 h. de culture, sauf dans le cas des explants postérieurs dénudés. Après traitement, les explants présentent tous un contenu en DNA réduit par rapport à celui des témoins à 72 h. de culture. Cependant, les différences observées ne sont significatives que dans le cas des explants antérieurs dénudés.

c) Evolution de l'accumulation des GAG sulfatés (Tableau 4 ; Planche V, Fig. 1)

Entre 24 h. et 72 h. de culture, les explants intacts présentent une augmentation de l'accumulation de sulfate radioactif. La présence du nucléotide pendant les dernières 48 h. de culture accentue l'augmentation : les valeurs des explants traités sont supérieures à celle des explants non traités à 72 h de culture. Les différences observées sont significatives exceptées dans le cas des bourgeons postérieurs intacts. Les analyses biochimiques corroborent les résultats des observations macroscopiques et microscopiques.

Tableau 1 : Teneur en DNA (μg) des bourgeons de membres de stade 17.

	EXPLANTS ANTERIEURS		EXPLANTS POSTERIEURS	
	Ecto +	Ecto -	Ecto +	Ecto -
EXPLANTS TEMOINS A 24 H.	2,25 \pm 0,52 n = 6	0,76 \pm 0,14 n = 5	1,31 \pm 0,09 n = 4	1,74 \pm 0,34 n = 4
EXPLANTS NON TRAITES A 72 H.	3,57 \pm 1,03 n = 5 *	1,37 \pm 0,26 n = 5 **	2,82 \pm 0,7 n = 5 **	1,47 \pm 0,33 n = 2
EXPLANTS TRAITES A 72 H.	2,58 \pm 0,81 n = 7	0,93 \pm 0,34 n = 7 •	2,34 \pm 0,54 n = 4	1,07 \pm 0,43 n = 4

Tableau 2 : Teneur en DNA (μg) des bourgeons de membres de stade 19.

	EXPLANTS ANTERIEURS		EXPLANTS POSTERIEURS	
	Ecto +	Ecto -	Ecto +	Ecto -
EXPLANTS TEMOINS A 24 H.	3,26 \pm 0,55 n = 6	1,58 \pm 0,21 n = 5	2,66 \pm 0,45 n = 6	1,75 \pm 0,60 n = 3
EXPLANTS NON TRAITES A 72 H.	2,35 \pm 0,26 n = 5 **	2,16 \pm 0,19 n = 6 **	3,97 \pm 1,58 n = 5	1,33 \pm 0,48 n = 3
EXPLANTS TRAITES A 72 H.	2,04 \pm 0,16 n = 5	1,48 \pm 0,23 n = 6 ••	3,16 \pm 0,58 n = 5	0,89 \pm 0,36 n = 5

Tableau 3 : Teneur en DNA (μg) des bourgeons de membres de stade 20.

	EXPLANTS ANTERIEURS		EXPLANTS POSTERIEURS	
	Ecto +	Ecto -	Ecto +	Ecto -
EXPLANTS TEMOINS A 24 H.	3,89 \pm 0,79 n = 6	2,9 \pm 0,12 n = 6	3,89 \pm 0,64 n = 6	2,65 \pm 0,36 n = 5
EXPLANTS NON TRAITES A 72 H.	4,40 \pm 1,18 n = 6	2,23 \pm 0,43 n = 6 **	3,20 \pm 0,67 n = 6	2,18 \pm 0,40 n = 6
EXPLANTS TRAITES A 72 H.	2,88 \pm 0,39 n = 6	1,79 \pm 0,24 n = 6	2,96 \pm 0,32 n = 6	2,23 \pm 0,21 n = 6

- Explants témoins, à 24 h. : explants cultivés 24 h. sans dbAMPc
- Explants non traités, à 72 h. : explants cultivés 72 h. sans dbAMPc
- Explants traités, à 72 h. : explants cultivés 24 h. sans dbAMPc puis traités 48 h. avec 1 mM de dbAMPc.

n = Nombre d'échantillons mesurés dans chaque série. Un échantillon correspond à un homogénat de deux explants.

Le test t de Student est calculé pour comparer les valeurs du contenu en DNA :

- 1) entre les explants témoins, à 24 h. et les explants non traités à 72 h. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)
- 2) entre les explants non traités et traités, à 72 h. (• = $p < 0,05$; •• = $p < 0,01$).



Tableau 4 : Accumulation des GAG sulfatés (Cpm/ μ g DNA) dans les bourgeons de membres de stade 17.

	EXPLANTS ANTERIEURS		EXPLANTS POSTERIEURS	
	Ecto +	Ecto -	Ecto +	Ecto -
EXPLANTS TEMOINS A 24 H.	104 \pm 20 n = 6	165 \pm 41 n = 5	111 \pm 12 n = 4	68 \pm 23 n = 4
EXPLANTS NON TRAITES A 72 H.	308 \pm 37 n = 5 **	1552 \pm 278 n = 5 **	370 \pm 76 n = 5 **	769 \pm 92 n = 2 **
EXPLANTS TRAITES A 72 H.	725 \pm 138 n = 7 ••	2740 \pm 326 n = 5 ••	450 \pm 111 n = 4	1210 \pm 197 n = 4 •

Tableau 5 : Accumulation des GAG sulfatés (Cpm/ μ g DNA) dans les bourgeons de membres de stade 19.

	EXPLANTS ANTERIEURS		EXPLANTS POSTERIEURS	
	Ecto +	Ecto -	Ecto +	Ecto -
EXPLANTS TEMOINS A 24 H.	48 \pm 16 n = 6	67 \pm 14 n = 5	61 \pm 16 n = 6	73 \pm 10 n = 3
EXPLANTS NON TRAITES A 72 H.	192 \pm 52 n = 5 **	278 \pm 43 n = 6 **	175 \pm 110 n = 5 *	367 \pm 59 n = 3 **
EXPLANTS TRAITES A 72 H.	268 \pm 67 n = 5	398 \pm 59 n = 6 ••	196 \pm 53 n = 5	503 \pm 73 n = 5 •

Tableau 6 : Accumulation des GAG sulfatés (Cpm/ μ g DNA) dans les bourgeons de membres de stade 20.

	EXPLANTS ANTERIEURS		EXPLANTS POSTERIEURS	
	Ecto +	Ecto -	Ecto +	Ecto -
EXPLANTS TEMOINS A 24 H.	93 \pm 16 n = 6	119 \pm 12 n = 6	68 \pm 12 n = 6	113 \pm 25 n = 5
EXPLANTS NON TRAITES A 72 H.	344 \pm 78 n = 6 **	482 \pm 153 n = 6 **	256 \pm 68 n = 6 **	540 \pm 77 n = 6 **
EXPLANTS TRAITES A 72 H.	175 \pm 47 n = 6 ••	312 \pm 46 n = 6 •	231 \pm 55 n = 6	258 \pm 52 n = 6 ••

- Explants témoins, à 24 h. = Explants cultivés 24 h. sans dbAMPc
- Explants non traités, à 72 h. = Explants cultivés 72 h. sans dbAMPc
- Explants traités, à 72 h. = Explants cultivés 24 h. sans dbAMPc puis traités 48 h. avec 1 mM de dbAMPc.

n = Nombre d'échantillons mesurés dans chaque série. Un échantillon correspond à un homogénat de deux explants.

Le test t de Student est calculé pour comparer les valeurs d'incorporation de sulfate radioactif :

- 1) entre les explants témoins, à 24 h. et les explants non traités à 72 h. (* = p < 0,05 ; ** = p < 0,01)
- 2) entre les explants non traités et traités à 72 h. (• = p < 0,05 ; •• = p < 0,01)



- 28 -
PLANCHE V : Accumulation des GAG sulfatés (Cpm/ μ g DNA) dans des bourgeons de membres de souris de stades 17, 19 et 20 après traitement long (48 h.) et tardif (après 24 h. de culture) au dbAMPc

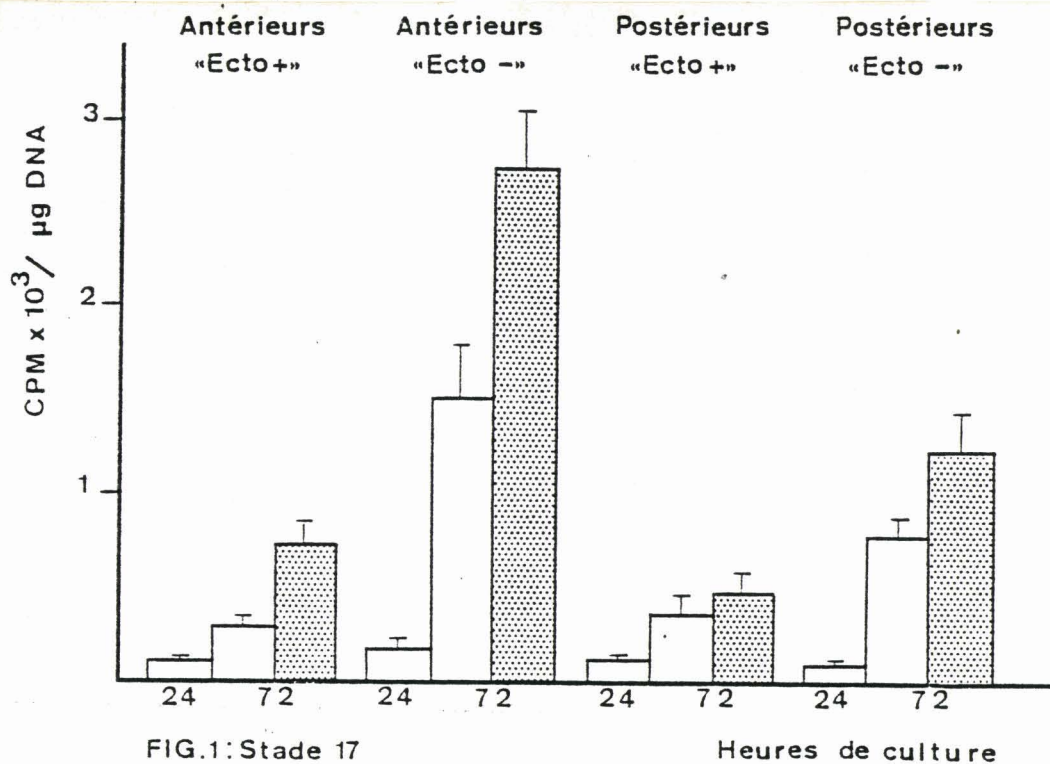


FIG. 1: Stade 17

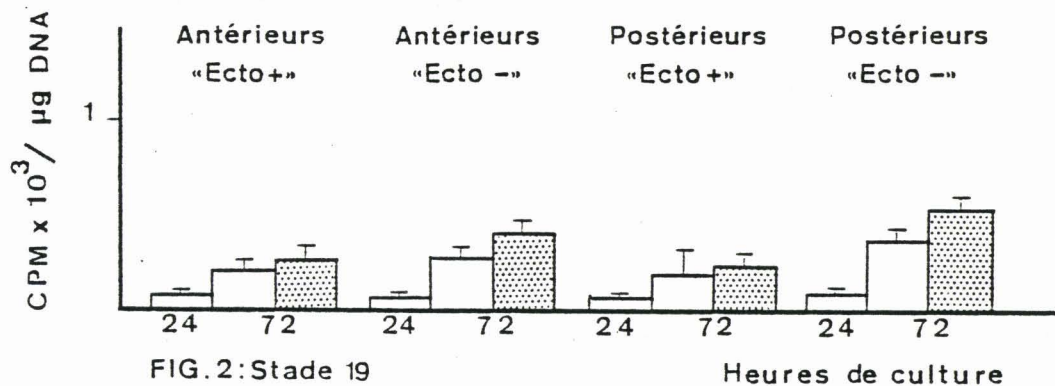


FIG. 2: Stade 19

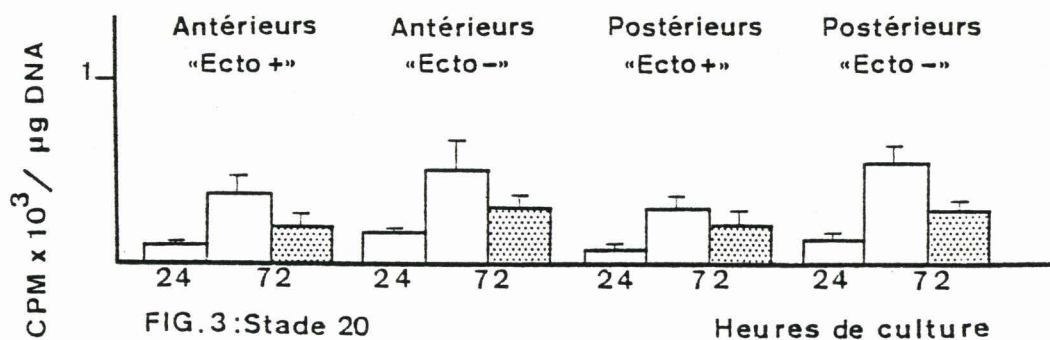


FIG. 3: Stade 20



En clair : explants cultivés 24 h. ou 72 h. sans dbAMPc.

En pointillés : explants cultivés 24 h. sans dbAMPc puis traités 48 h. avec 1 mM de dbAMPc

Les barres indiquent l'écart-type.

2) Bourgeons de membres de stade 19

a) Etude macroscopique et microscopique

- Aspect des cultures non traitées

Tout comme leurs homologues de stade 17, les apex intacts de stade 19 sont le siège d'une morphogenèse squelettique organisée. Les parties distales du zeugopode et le métapode apparaissent clairement dans les explants antérieurs. Les apex postérieurs quant à eux ne présentent pas de morphogenèse autopodiale. L'étude histologique, effectuée après trois jours de culture, révèle que la zone proximale des explants antérieurs intacts, qui correspond à l'extrémité du zeugopode, est constituée de chondrocytes hypertrophiés et que la zone distale, qui correspond au métapode, présente de petits nodules cartilagineux entourés de nombreuses cellules mésenchymateuses. Parfois, la partie distale présente des agrégats cellulaires qui correspondent à une rangée de phalanges. Dans les bourgeons postérieurs, les ébauches squelettiques, présentes dans la zone proximale des explants, sont constituées de chondrocytes hypertrophiés. L'ectoderme ne recouvre que les 2/3 distaux des explants.

Les apex antérieurs dénudés présentent une chondrogenèse anarchique. Les nodules cartilagineux sont entourés de zones non colorées au bleu Alcian (Planche IV, Fig. 3). En coupe, les nodules cartilagineux sont constitués de chondroblastes à matrice épaisse ou de chondrocytes hypertrophiés tandis que les zones internodulaires sont occupées par des cellules indifférenciées (Planche IV, Fig. 9). Les explants postérieurs dénudés présentent une évolution similaire.

- Aspect des cultures traitées au dbAMPc

L'étendue de la chondrogenèse dans les explants intacts témoins et traités est identique en fin de culture. Au contraire, dans les explants dénudés, l'étendue de la coloration au bleu Alcian est plus importante lorsque le nucléotide est présent : les zones internodulaires des explants traités sont plus fortement colorées (Planche IV, Fig. 4). Les études histologiques ont révélé que dans les explants intacts, l'aspect de l'ectoderme, le nombre et la taille des nodules cartilagineux, l'étendue et l'épaisseur de la matrice cartilagineuse ne semblent pas modifiés par le traitement au dbAMPc. Dans les explants dénudés, le traitement provoque une différenciation généralisée de l'explant mais

le cartilage est rarement constitué de chondrocytes hypertrophiés. Quelques cellules indifférenciées éparses persistent dans certaines zones (Planche IV, Fig. 10).

b) Analyse de la teneur en DNA (Tableau 2)

La teneur en DNA des bourgeons de membres de stade 19 témoins évolue comme dans le cas des bourgeons de stade 17 sauf pour les bourgeons antérieurs intacts dont la croissance est faible. Le traitement au dbAMPc provoque une baisse du contenu en DNA qui n'est toutefois significative que dans le cas des explants antérieurs dénudés.

c) Evolution de l'accumulation des GAG sulfatés (Tableau 5, Planche V, Fig. 2)

L'accumulation des GAG sulfatés augmente dans les explants témoins entre 24 h. et 72 h. de culture. Par ailleurs, l'absence d'ectoderme renforce cette tendance. Dans les apex intacts, les différences observées, entre les témoins et les explants traités en fin de culture, ne sont pas significatives. Au contraire, lorsque l'ectoderme est absent, le traitement au dbAMPc stimule fortement l'incorporation de sulfate radioactif.

3) Bourgeons de membres de stade 20

a) Etude macroscopique et microscopique

-Aspect des cultures non traitées

En fin de culture, les explants antérieurs et postérieurs, intacts ou dénudés, montrent un squelette autopodial correspondant au métapode et à la rangée proximale de phalanges (Planche IV, Fig. 5). Dans les quatre types d'explants, les études histologiques révèlent la présence de trois ou quatre rudiments squelettiques séparés par du mésenchyme lâche (Planche IV, fig. 11). Le mésenchyme est plus abondant dans les explants couverts d'ectoderme.

-Aspect des cultures traitées au dbAMPc.

Après addition de dbAMPc, les explants sont constitués dans leur partie distale de petits nodules faiblement colorés alors que la partie proximale montre des métacarpiens tronqués (Planche IV, Fig. 6). En coupe histologique, la partie distale des explants présente une ou deux zones de condensations entourées de cellules mésenchymateuses (Planche IV, Fig. 12). Les cellules des agrégats, sont entourées d'une matrice très discrète mise en évidence par le bleu Alcian.

b) Analyse de la teneur en DNA (Tableau 3)

Dans les explants témoins, il n'y a pas de différence frappante entre la teneur en DNA à 24 h. et à 72 h. de culture. Le traitement au dbAMPc semble provoquer une diminution du contenu en DNA bien qu'en aucun cas cette différence ne soit statistiquement significative.

c) Evolution de l'accumulation des GAG sulfatés (Tableau 6, Planche V, Fig. 3)

Les valeurs augmentent significativement dans les quatre types d'explants témoins entre le début et la fin de la culture. Le dbAMPc provoque une diminution significative de l'accumulation des GAG sulfatés excepté dans le cas des explants postérieurs intacts.

DISCUSSION




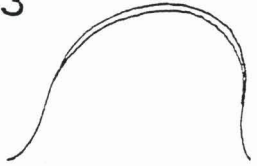
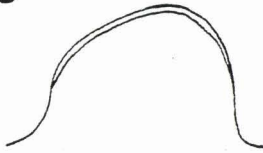

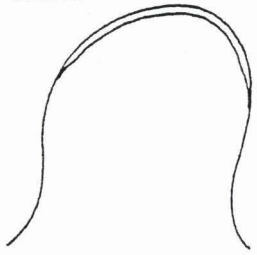
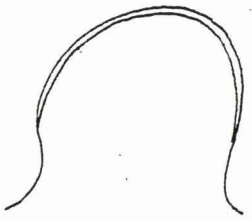
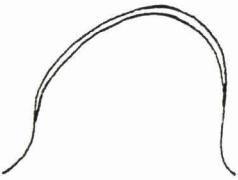
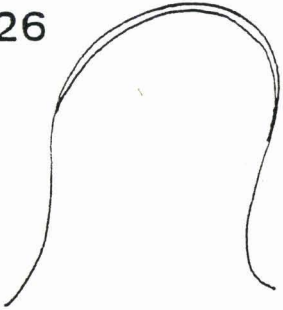
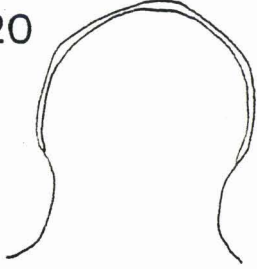
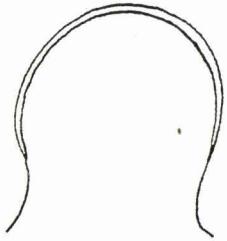
L'ensemble de ces résultats montrent que le dbAMPc augmente la chondrogenèse *in vitro* dans les bourgeons de membres de souris de stade 17 et de stade 19 bien qu'à ce stade la stimulation n'ait lieu que si la couverture ectodermique est absente. Dans les apex de bourgeons de stade 20, le dbAMPc semble au contraire jouer un rôle inhibiteur de la différenciation cartilagineuse. Cette discussion a pour objet d'analyser les événements qui ont lieu en présence de dbAMPc dans les bourgeons de membres de souris, à différents stades de développement et de les comparer à ceux qui se déroulent dans les bourgeons de membres de poulet.

Dans les bourgeons de membres de stade 17, l'incorporation de sulfate radioactif est augmentée que l'ectoderme soit présent ou non. Cependant, dans le cas des bourgeons postérieurs, l'incorporation n'est stimulée que lorsque l'ectoderme est absent. Il est à noter qu'une chondrogenèse de faible importance a été observée *in vitro* dans des bourgeons de membres postérieurs de souris, même à des stades plus âgés (MILAIRE et MULNARD, 1984 ; DESBIENS *et al.*, 1985). Puisque la chondrogenèse est stimulée par le dbAMPc dans les bourgeons de membres antérieurs couverts ou non d'ectoderme et dans les bourgeons postérieurs dénudés, des populations cellulaires sensibles au dbAMPc étaient donc présentes dès le début de la culture, ou sont apparues au cours des premières 24 h. *in vitro*. L'hypothèse selon laquelle le dbAMPc

induirait une prolifération spécifique des cellules chondrogènes ne semble pas devoir être retenue puisque l'étude histologique ne révèle pas de prolifération accrue dans les blastèmes presque letiques . D'autre part, une augmentation de la synthèse de DNA n'a jamais été observée. Une autre hypothèse, qui tiendrait compte de l'absence d'augmentation de la teneur globale en DNA, serait de supposer que le dbAMPc favoriserait la prolifération des cellules chondrogènes et augmenterait ainsi les surfaces occupées par le cartilage tout en provoquant la destruction des cellules mésenchymateuses apicales indifférenciés ou des cellules appartenant aux lignées donnant le tissu conjonctif ou la musculature. N'ayant pas observé de nécrose cellulaire dans les explants traités au dbAMPc , cette hypothèse semble pouvoir être écartée. Il paraît plus probable qu'une population de cellules mésenchymateuses soit devenue sensible au dbAMPc et se soit engagée par la suite dans la différenciation cartilagineuse.

Nos résultats semblent être en accord avec le recrutement , sous l'effet du dbAMPc, de cellules mésenchymateuses dont l'engagement vers la chondrogenèse explique l'augmentation de l'incorporation de sulfate. Des cultures de cellules mésodermiques de membres d'embryons de poulet de stade 19 (Planche VI) (AHRENS *et al.*, 1977 ; SOLURSH *et al.*, 1981a) ou de membres d'embryons de souris de stades équivalents (OWENS et SOLURSH, 1981) ont conduit à des conclusions identiques : le dbAMPc favorise la chondrogenèse du mésoderme. Le recrutement important des zones internodulaires dans des cultures de cellules en micromasse et leur engagement dans la chondrogenèse est comparable à l'apparition d'une nappe continue de cartilage dans les explants dénudés. En outre, puisque des explants de stade 17 cultivés 24 h. ne présentent pas, en coupe histologique, de chondrocytes, il semble que le dbAMPc provoque un recrutement de cellules nouvellement déterminées. L'identification de ces cellules reste hypothétique. Si les cellules somitiques envahissent le bourgeon de membre de souris (Houben, 1976 ; Milaire, 1976 ; Agnish et Kochhar, 1977) pour établir la lignée myogène comme cela se passe dans le bourgeon de membre de poulet (revue de Brand *et al.*, 1985) il est raisonnable de considérer que la partie proximale des explants utilisés dans cette étude est constituée de plusieurs lignées cellulaires tandis que leur partie distale est formée d'une population assez homogène de cellules indifférenciées d'origine somatopleurale comme elle existe dans des bourgeons plus âgés

PLANCHE VI : Développement comparatif des bourgeons de membres de poulet (HAMBURGER et HAMILTON, 1951) et de souris (THEILER, 1972).

POULET Bourgeon Antérieur Table de Hamburger et Hamilton	SOURIS Bourgeon Antérieur Bourgeon Postérieur Table de Theiler	
21 	17 	
23 	18 	
24.25 	19 	
26 	20 	



(NEWMAN *et al.*, 1981, GAY et KOSHER 1984). Un recrutement sous l'influence du dbAMPc implique la transformation de cellules appartenant soit à la lignée myogène, soit à la lignée conjonctive. Dans des conditions expérimentales particulières des cellules myogènes issues des somites peuvent se transformer en chondroblastes et s'intégrer aux éléments squelettiques (NATHANSON et HAY, 1980 ; KIENY *et al.*, 1981 ; SEARLS et SMITH, 1982 ; SEARLS, 1983). D'autres chercheurs affirment que les cellules d'origine somatopleurale et somitique ne peuvent s'échanger (WACHTLER *et al.*, 1981, 1982). Pourtant, dans le bourgeon de membre de poulet, le mésenchyme somatopleural prélevé dans des zones non chondrogènes peut former du cartilage au moins jusqu'au stade 26 (WACHTLER *et al.* 1981), du mésenchyme interdigital de bourgeons de stade 29 peut former des nodules de cartilage entre les phalanges (HURLE et GAÑAN, 1986). Bien que les cellules du mésenchyme d'origine somatopleurale paraissent plus aptes à se transformer que les cellules d'origine somitique, nous ne pouvons pas exclure totalement un recrutement dans ces 2 catégories cellulaires. Les taux abaissés de DNA dans les explants traités pourraient traduire la sortie du cycle de ces cellules, première étape de leur différenciation.

La comparaison des résultats obtenus au stade 17 et au stade 19 sur les bourgeons de membres de souris met en évidence une différence majeure. Contrairement aux bourgeons intacts de stade 17, le traitement au dbAMPc est sans effet sur les bourgeons intacts de stade 19. Il est possible que l'ectoderme devienne imperméable au dbAMPc, mais l'étude histologique révèle que la région proximale des explants n'est pas couverte par l'ectoderme et peut donc permettre la pénétration du milieu de culture. De plus, la partie distale des bourgeons de stade 20 entourée par l'ectoderme réagit fortement au traitement. Il semble donc que la perméabilité de l'ectoderme ne soit pas en cause. Toutefois, ces résultats ne sont pas en accord avec ceux qui ont été obtenus par ailleurs sur des bourgeons de membres de poulet à un stade de développement équivalent. KOSHER et SAVAGE (1980) ont traité des apex d'aile de stade 25 au dbAMPc et à la théophylline et ils ont observé la différenciation cartilagineuse de la totalité de la population cellulaire c'est à dire que même les cellules mésenchymateuses situées juste sous la crête apicale se sont différenciées en chondrocytes. En ce qui concerne la présente étude, nous n'avons jamais observé de chondrogenèse dans la région distale des explants intacts. Il semble donc qu'un traitement au

dbAMPc appliqué dès le premier jour de culture sur des bourgeons de ce stade joue un rôle décisif dans l'expression de la chondrogénèse distale.

D'un autre côté, nos résultats obtenus sur les bourgeons de membres dénudés de stade 19 traités au dbAMPc sont en accord avec de nombreuses études effectuées sur des cultures de bourgeons d'aile de poulet (KOSHER *et al.*, 1979 b) sur des cultures de cellules de mésoderme de membre de souris (OWENS et SOLURSH 1981) et de poulet (AHRENS *et al.* 1977, SOLURSH *et al.* 1981 a, HATTORI et IDE 1985).

Dans le système de culture en micromasse (AHRENS *et al.*, 1977 ; OWENS et SOLURSH, 1981) les cellules périnodulaires qui n'appartiennent pas aux régions chondrogènes, se différencient en cartilage sous l'influence du dbAMPc. De la même façon, nous observons une population importante de petits chondrocytes à la suite du traitement au dbAMPc, contrastant avec les chondrocytes hypertrophiés présents dans les nodules cartilagineux des explants non traités. Tous ces résultats suggèrent que la stimulation de la chondrogénèse implique la différenciation des cellules mésenchymateuses périnodulaires en chondrocytes plutôt qu'une augmentation du dépôt de matrice extracellulaire autour de jeunes chondrocytes déjà présents au début du traitement. Ces conclusions sont différentes de celles de MERKER et GÜNTHER (1979). Ces auteurs ont observé une augmentation de la taille des ébauches cartilagineuses de l'ordre de 40 % par rapport aux explants non traités au dbAMPc. Cette différence est due à une accumulation de matrice extracellulaire. Toutefois, il faut signaler que le traitement a duré 6 jours dans leur expérience et 2 jours dans la nôtre. Il est possible que la durée de la culture ne nous ait pas permis d'observer cette augmentation de dépôt de matrice cartilagineuse dans les chondrocytes différenciés.

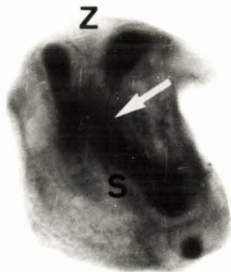
Au stade 20, le traitement a été appliqué sur des apex contenant du cartilage proximal riche en matrice extracellulaire et des condensations cellulaires distales où la matrice extracellulaire est peu épaisse et juste visible. Le traitement n'a jamais augmenté la différenciation cartilagineuse comme c'est le cas dans les bourgeons de stade plus jeunes. Il semble au contraire être défavorable à la différenciation cartilagineuse puisqu'il provoque une diminution de l'incorporation de sulfate radioactif par rapport aux témoins. Ce traitement paraît inhiber plus particulièrement l'évolution des jeunes chondroblastes. Parallèlement, des cultures de parties proximales de

bourgeons de membres antérieurs de stade 20 ont été effectuées. Après 24 h. *in vitro*, l'humérus, le radius et le cubitus apparaissent distinctement, mais la zone articulaire du coude n'est pas encore visible (Planche VII, Fig. 1). Les explants cultivés trois jours sans dbAMPc élaborent une zone articulaire normale entre l'humérus et l'ébauche du zeugopode (Planche VII, Fig. 2) alors que dans les explants traités la zone articulaire est absente (Planche VII, Fig. 3). En outre, des apex de stade 20 traités au dbAMPc ont été cultivés trois jours supplémentaires en absence de dbAMPc. Dans ce cas, les métacarpiens sont tronqués (Planche VII, Fig. 4 et 5). Ces résultats démontrent que le dbAMPc agit sur les bourgeons de stade 20 au niveau des jeunes chondroblastes et que son effet est inhibiteur. Toutefois, cette inhibition demeure jusqu'alors inexplicée. SOLURSH *et al.* (1982) et SWALLA *et al.* (1983) ont remarqué que, chez le poulet, les cellules mésodermiques de stade 26 et les cellules proximales de stade 23 forment des agrégats de chondrocytes "protodifférenciés" qui contiennent de faibles quantités de collagène de type II détectable immunologiquement. De tels agrégats se différencient lorsqu'ils sont traités au dbAMPc ou mélangés avec des cellules plus jeunes. Cependant, SOLURSH *et al.* (1982) ont également noté que le traitement au dbAMPc devient inefficace sur les stades plus âgés. D'autres rapports concernent les effets du dbAMPc sur des chondrocytes plus âgés. DREZNER *et al.* (1976) sur des cultures de chondrocytes d'embryons de poulet et MILLER *et al.* (1979) sur des cultures de chondrocytes de rat foetal ont obtenu une stimulation de l'incorporation de sulfate dans les constituants de la matrice cartilagineuse.

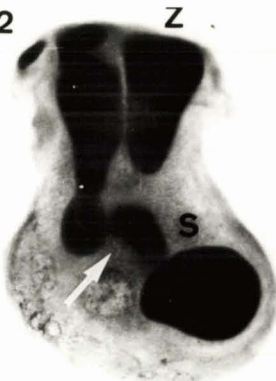
En absence de traitement, la destinée des cellules mésenchymateuses de bourgeons de stade 20 est fixée même lorsque l'ectoderme est absent (DESBIENS *et al.*, 1985). Le dbAMPc n'a plus d'effet sur la différenciation cartilagineuse des cellules périphériques. OWENS et SOLURSH (1981) ont montré qu'un traitement au dbAMPc de cultures en micromasse de cellules mésenchymateuses de bourgeons de membres de souris aux stades 20 et 21 n'active la chondrogenèse que dans les condensations cellulaires ; les zones internodulaires ont perdu la capacité de répondre au traitement. Des résultats comparables ont été obtenus sur des bourgeons de membres de poulet de stade 25-26 dans lesquels les cellules périphériques ne se différencient pas en chondrocytes même à la suite d'un traitement au dbAMPc (SOLURSH *et al.*, 1981 a).

La réponse des bourgeons de membres de souris vis-à-vis d'un traitement au dbAMPc est

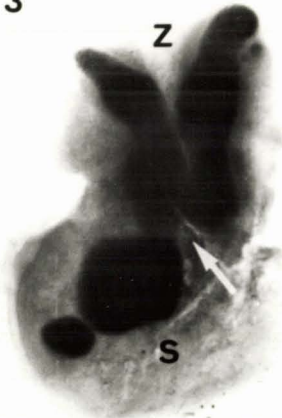
1



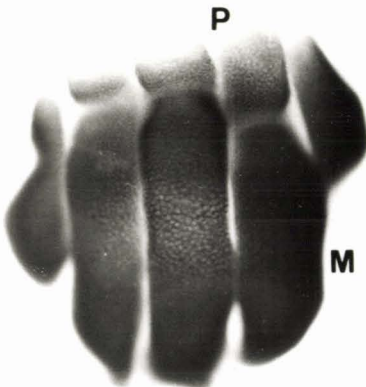
2



3



4



5

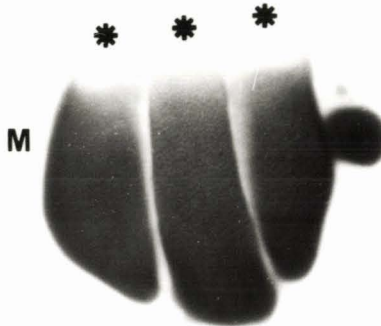


PLANCHE VII : Effet inhibiteur du dbAMPc (1 mM) sur la chondrogenèse de bourgeons de membres de souris de stade 20.

Toutes les figures de cette planche représentent l'aspect macroscopique de bourgeons de membres de souris mis en culture au stade 20, colorés au bleu Alcian à pH 1.

Fig. 1 : Partie proximale d'un bourgeon de membre antérieur, fixée après 24 h. de culture.

Le stylopode (S) et le zeugopode (Z) sont bien différenciés mais la région articulaire n'est pas encore visible (flèche). (X 30)

Fig. 2 : Partie proximale d'un bourgeon de membre antérieur, fixée après 72 h. de culture.

La région articulaire est nettement visible (flèche). Stylopode (S) et zeugopode (Z) sont très développés. (X 30)

Fig. 3 : Partie proximale d'un bourgeon de membre antérieur, traitée au dbAMPc (1 mM) entre 24 h. et 72 h. de culture et fixée à l'issue du traitement.

Stylopode (S) et zeugopode (Z) sont comparables à ceux des témoins (Fig. 2). L'articulation fait défaut (flèche). (X 30)

Fig. 4 : Partie distale d'un bourgeon de membre antérieur, fixée après 6 jours de culture.

Les métacarpiens (M) et une première rangée de phalanges (P) se sont développés. (X 45)

Fig. 5 : Partie distale d'un bourgeon de membre antérieur, traitée au dbAMPc (1mM) entre 24 h. et 72 h. et fixée après 3 jours de culture supplémentaires.

Les métacarpiens (M) apparaissent tronqués. Aucune phalange n'est visible (astérisques). (X 45)

directement reliée à leur stade de développement. Les bourgeons de stade 17, qui contiennent probablement le plus grand nombre de cellules potentiellement chondrogènes (OWENS et SOLURSH, 1981), incorporent plus de sulfate dans les GAG après traitement au dbAMPc que les explants témoins. La stimulation de la chondrogenèse est moins prononcée aux stades plus âgés. Au stade 20, le traitement devient inhibiteur de la différenciation cartilagineuse. La stimulation de la chondrogenèse semble être en rapport avec un recrutement de cellules initialement non chondrogènes puisque l'on n'a observé ni augmentation significative de la teneur en DNA des explants, ni nécrose cellulaire. Enfin la comparaison du comportement des explants couverts ou non d'ectoderme confirme que l'ectoderme contrôle le patron squelettique du membre en évitant la détermination chondrogène des cellules périphériques et distales.

CHAPITRE II

RECHERCHE DE LA DISTRIBUTION TEMPORELLE ET SPATIALE DES POPULATIONS CELLULAIRES RECEPTIVES AU dbAMPc

INTRODUCTION

La capacité des cellules de mésenchyme de membre à répondre à un traitement au dbAMPc est limitée à la fois dans le temps et dans l'espace. Le stimulus produit par le dbAMPc n'est perçu que par certaines populations cellulaires en des sites et à des moments très précis. En effet, chez le Poulet, SOLURSH *et al.* (1981 a) ont mis en évidence l'existence de quatre sous-populations cellulaires différentes, présentes dans des cultures en micromasse établies à partir de mésoderme de bourgeons alaires des stades 19 à 26 (HAMBURGER et HAMILTON, 1951) : des cellules non chondrogènes, situées hors des agrégats et incapables de se chondrifier soit spontanément, soit sous l'influence du dbAMPc (stades 19 et 26) ; des cellules des agrégats potentiellement chondrogènes qui ne se différencient en cartilage que sous l'effet du dbAMPc (stades 19 et 26) ; des cellules chondrogènes formant des agrégats capables de se différencier spontanément en nodules cartilagineux (stades 20 à 25) ; des cellules non agrégées, potentiellement chondrogènes qui se différencient en présence de dbAMPc (stades 20 à 24). Chez la souris, des stades 16 à 21 (THEILER, 1972), un traitement au dbAMPc appliqué sur des cultures en micromasse de membres antérieurs provoque à tous les stades une augmentation de la surface occupée par le cartilage (OWENS et SOLURSH, 1981). Toutefois, alors que dans les cultures établies à partir d'un mélange de cellules de stades 16 et 17, la majorité des zones internodulaires se chondrifie, au stade 20, le traitement n'induit qu'une légère augmentation de la taille des nodules cartilagineux, tandis que les zones internodulaires ne répondent plus au traitement.

En culture organotypique, nous avons montré que la réceptivité des bourgeons de membres de souris vis-à-vis du dbAMPc est directement liée au stade de développement auquel l'ébauche est parvenue au moment du traitement (Chapitre I). La chondrogenèse des plus jeunes bourgeons (stade 17) est stimulée par le dbAMPc. Au stade 19, la présence de l'ectoderme est un facteur limitant pour cette activation. Au stade 20, le traitement provoque une diminution de la

chondrogenèse. Afin de compléter cette première série de résultats nous avons voulu savoir si des traitements de plus courte durée, échelonnés au cours de la culture, nous permettaient de mieux situer les cellules réceptives au dbAMPc à la fois dans le temps mais aussi dans l'espace et éventuellement de cerner davantage le mécanisme d'action du nucléotide.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Nous avons choisi d'utiliser des apex de bourgeons de membres de stade 19 :

- les explants couverts d'ectoderme, notamment les apex antérieurs présentent *in vitro* une morphogenèse squelettique caractéristique (élaboration d'un autopode rayonné et de la partie distale du zeugopode).

- les explants dénudés survivent bien en culture, contrairement à leur homologues de stade 17, et répondent à l'effet stimulateur du dbAMPc sur la chondrogenèse.

Tout d'abord, afin d'étudier leur réceptivité dans le temps, les explants ont été soumis à des traitements au dbAMPc, appliqués pendant une durée de 24 h., coïncidant avec les jours 1, 2 et 3 de la culture. Parallèlement, certains explants ont été traités au dbAMPc après 24 h. de culture, pendant une durée de 48 h., afin de comparer les effets de chaque type de traitement. Dans tous les cas la réceptivité des apex a été estimée par des mesures d'incorporation de sulfate radioactif dans les glycosaminoglycannes sulfatés ($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, 1 $\mu\text{Ci/ml}$, fourni de façon continue au cours de la culture) et par leur aspect histologique. Ces deux paramètres ont été analysés après 72 h. de culture. Les résultats obtenus nous ont conduits dans un second temps à sélectionner les bourgeons antérieurs pourvus d'ectoderme afin de localiser les cellules réceptives mises en évidence lors des traitements journaliers. Considérant que l'engagement vers la chondrogenèse est précédé par un blocage transitoire du cycle cellulaire (HERKEN, 1975 ; SOLURSH et REITER, 1975 ; MILLER *et al.*, 1979) avec agrégation des cellules (THOROGOOD et HINCHLIFFE, 1975) nous avons recherché si, sous l'influence du dbAMPc, certaines populations cellulaires sortaient du cycle et s'agrégeaient. Les cultures ont été incubées en présence d'un analogue de la thymidine, la 5 Bromodéoxyuridine (5-BrdU) pendant une durée de 24 h., supérieure à celle de la phase G1

estimée à 22,9 h. (HERKEN, 1975) dans les cellules de mésenchyme de membre de souris *in vitro*. Afin de limiter son interférence avec le dbAMPc et de permettre à ce dernier de commencer à agir, la BrdU est fournie aux cultures 4 h. après le dbAMPc selon le protocole représenté Planche VIII. La présence de la 5-BrdU dans les noyaux des cellules a été révélée sur coupes histologiques grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre cette substance. En outre, afin de tenter de connaître le devenir des cellules n'ayant pas incorporé la BrdU et notamment de savoir si elles se différenciaient en cartilage, pour chaque type de traitement, des explants ont été fixés et colorés à l'issue de 3 jours de culture supplémentaires dans un milieu ne contenant ni dbAMPc, ni BrdU.

RESULTATS

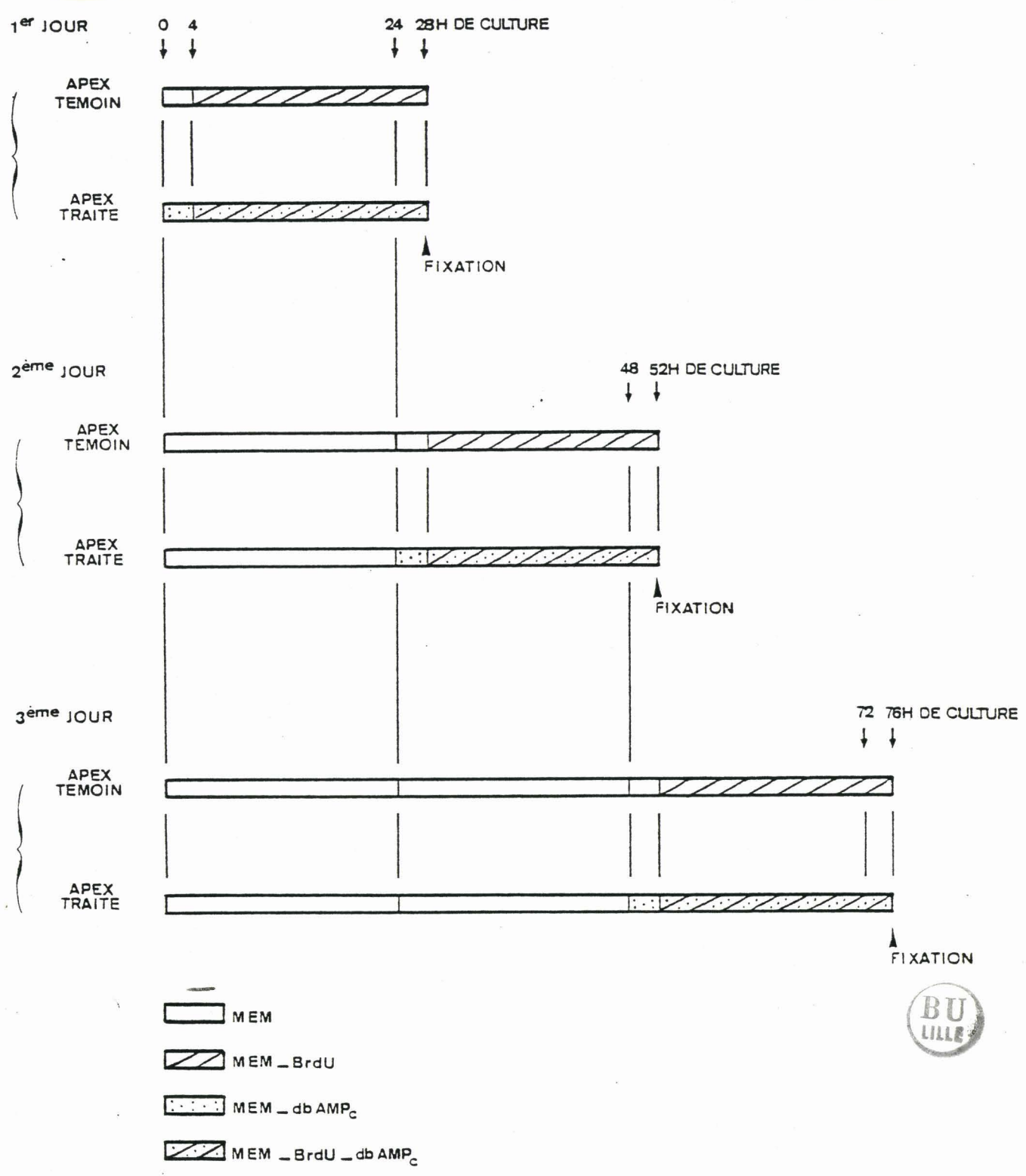
Afin d'en clarifier la présentation, nous exposerons d'abord les résultats relatifs à la réceptivité temporelle de cultures d'apex de stade 19, antérieurs et postérieurs, munis ou non d'ectoderme, puis les résultats relatifs à la localisation des cellules réceptives, ne concernant que les apex antérieurs pourvus d'ectoderme.

I. - RECEPTIVITE TEMPORELLE

Tous les résultats expriment des valeurs moyennes calculées à partir de mesures correspondant à deux explants. Le nombre de mesures figure à côté de chaque valeur. La significativité des résultats ($p < 0,05$) a été contrôlée à l'aide du test t de Student.

Les cultures d'apex témoins sont fixées et colorées toutes les 24 h. afin de connaître l'état des bourgeons au moment de l'addition du dbAMPc. Les apex traités sont, quant à eux, fixés et colorés à l'issue des 3 jours de culture. L'examen macroscopique a apporté peu de données précises : l'aspect des explants témoins est conforme à celui que nous avons décrit précédemment (Chapitre I) et celui des explants traités est comparable à celui des témoins. Nous ne décrivons donc que l'aspect

PLANCHE VIII : Protocole expérimental mis en oeuvre lors de l'incubation en présence de 5-bromodéoxyuridine de bourgeons de membres de souris de stade 19.



Après 4 h., 28 h. ou 52 h. de culture, les apex antérieurs témoins et traités au dbAMPc sont incubés en présence de BrdU pendant une durée de 24 h..Les apex traités au dbAMPc (1 mM) reçoivent le nucléotide 4 h. avant le début de l'incubation avec la BrdU et sont ensuite cultivés pendant 24 h. en présence de dbAMPc et de BrdU. Tous les explants sont fixés à l'issue de la période d'incubation avec la BrdU.

histologique des explants qui a permis de constater de légères différences entre les apex témoins et traités.

1) Explants antérieurs "Ecto +"

a) Etude microscopique (Planche IX, Fig. 1)

Au moment de la mise en culture, la partie du bourgeon prélevée ne présente aucune condensation cellulaire. Après 24 h. *in vitro*, les explants sont constitués d'une zone proximale, où des cellules viennent de commencer le dépôt de matrice, et de rayons autopodiaux représentés par des zones de forte densité cellulaire. Après 48 h., une matrice plus nette est observée du côté proximal tandis qu'un mince liseré entoure les cellules des rayons autopodiaux. Après 72 h., des nodules de cartilage hypertrophique occupent la base de l'explant ainsi que la partie proximale des rayons antipodiaux dont l'extrémité distale a accumulé une matrice épaisse. Des condensations distales représentant la rangée proximale des phalanges apparaissent dans certains cas.

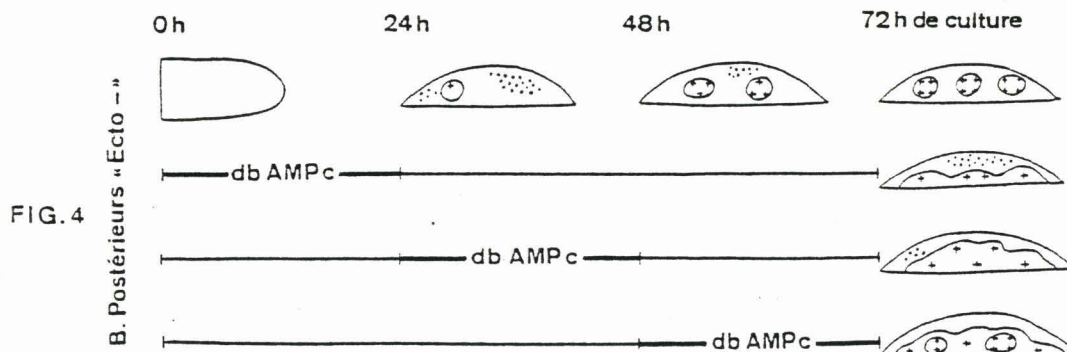
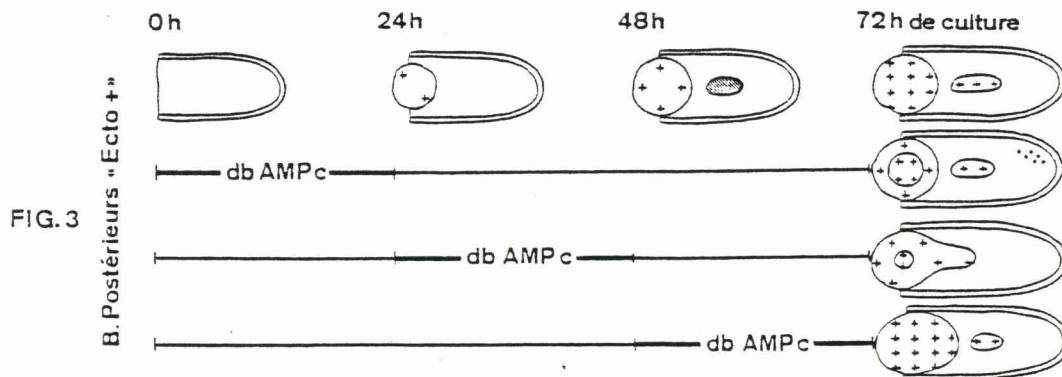
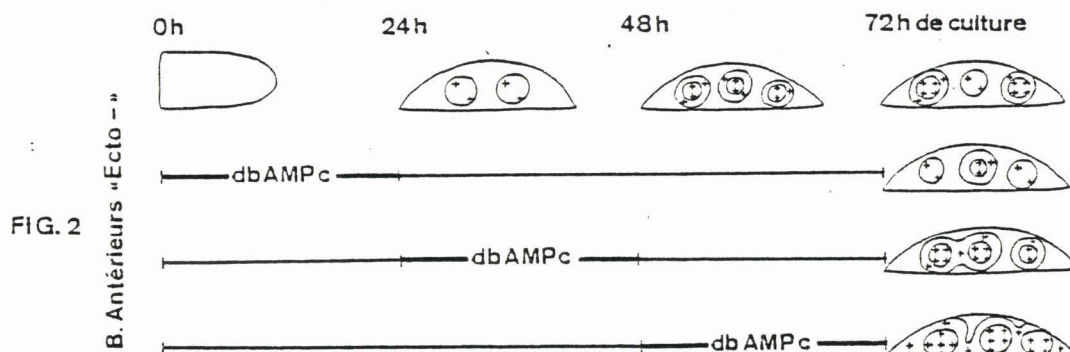
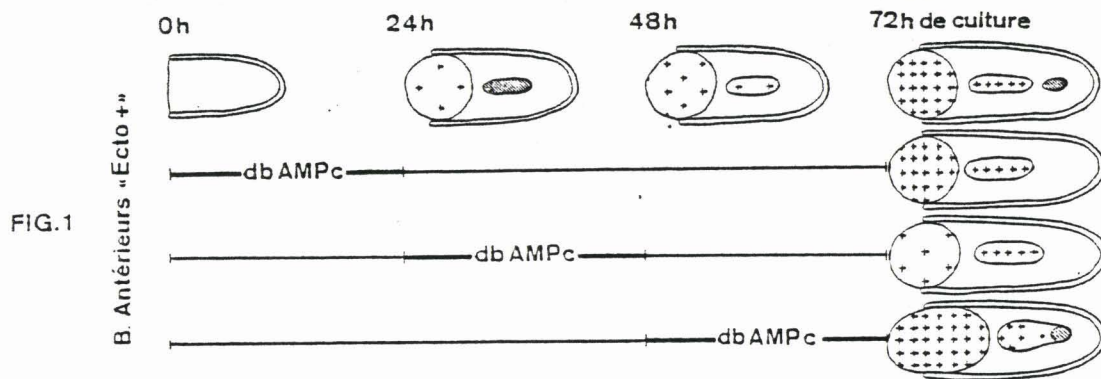
Après 72 h. de culture, les apex traités pendant les 24 premières heures sont plus courts que les témoins et déformés. Du cartilage hypertrophique est présent au niveau de la base des explants ainsi que dans la région des métacarpiens. Les explants traités au jour 2 présentent une zone proximale où les chondrocytes abondants paraissent ne pas avoir atteint le stade de maturité présenté par les nodules de la région moyenne qui ont atteint le stade hypertrophique. Si le db AMPc est administré en fin de culture, les nodules proximaux constitués de chondrocytes hypertrophiés sont très développés, les métacarpiens sont formés du côté proximal de chondrocytes hypertrophiés, mais la matrice s'amenuise rapidement vers leur extrémité distale qui n'est le plus souvent formée que de cellules agrégées. La rangée de phalanges parfois observée chez les témoins, n'apparaît pas .

b) Analyse de la teneur en DNA (Tableau 7)

En absence de traitement, la teneur en DNA des apex antérieurs intacts diminue entre 24 h. et 72 h. de culture. Dans les apex traités, le contenu en DNA est plus faible que celui des témoins lorsque le dbAMPc est placé dans le milieu au cours des 24 premières heures de culture.

45
PLANCHE IX : Récapitulation de l'aspect histologique d'apex de bourgeons de membres de souris de stade 19, traités ou non au dbAMPc pendant une durée de 24 h. coïncidant avec chacun des 3 jours de culture.

Les apex témoins sont fixés toutes les 24 h. de culture. Les apex traités au dbAMPc (1 mM) sont fixés à l'issue des 3 jours de culture.



mésenchyme lâche
 condensation précartilagineuse
 + + + + + maturation cartilagineuse
 dégradation cellulaire



Tableau 7 : Teneur en DNA (μg) et accumulation des GAG sulfatés (Cpm par μg DNA) dans des apex "ecto +" de bourgeons antérieurs de stade 19.

	Témoin 24 h.	Non traité 72 h.	Traité 0 - 24 h.	Traité 24 - 48 h.	Traité 48 - 72 h.	Traité 24 - 72 h.
$\mu\text{g DNA}$	3,26±0,55 n = 6	2,35±0,26 n = 5 **	1,65±0,15 n = 5 ••	1,95±0,38 n = 5	2,25±0,10 n = 5	2,04±0,16 n = 5
Cpm/ $\mu\text{g DNA}$	48 ±16 n = 6	192±52 n = 5 **	322±95 n = 5 •	198±40 n = 5	258±64 n = 5	268±67 n = 5

Tableau 8 : Teneur en DNA (μg) et accumulation des GAG sulfatés (Cpm par μg DNA) dans des apex "ecto -" de bourgeons antérieurs de stade 19.

	Témoin 24 h.	Non traité 72 h.	Traité 0 - 24 h.	Traité 24 - 48 h.	Traité 48 - 72 h.	Traité 24 - 72 h.
$\mu\text{g DNA}$	2,23±0,62 n = 4	3,02±0,83 n = 5	0,9±0,63 n = 5 ••	1,76±1,11 n = 5	2,08±0,67 n = 5	1,95±0,65 n = 5
Cpm/ $\mu\text{g DNA}$	79 ±15 n = 4	149±35 n = 5 **	344±198 n = 5	390±239 n = 5	313±42 n = 5 ••	397±99 n = 5 ••

Tableau 9 : Teneur en DNA (μg) et accumulation des GAG sulfatés (Cpm par μg DNA) dans des apex "ecto +" de bourgeons postérieurs de stade 19.

	Témoin 24 h.	Non traité 72 h.	Traité 0 - 24 h.	Traité 24 - 48 h.	Traité 48 - 72 h.	Traité 24 - 72 h.
$\mu\text{g DNA}$	2,66±0,45 n = 6	3,97±1,58 n = 5	3,88±0,58 n = 5	3,49±0,58 n = 5	3,80±1,01 n = 5	3,16±0,58 n = 5
Cpm/ $\mu\text{g DNA}$	61 ±16 n = 6	175±110 n = 5 *	125±30 n = 5	161±27 n = 5	202±77 n = 5	196±53 n = 5

Tableau 10 : Teneur en DNA (μg) et accumulation des GAG sulfatés (Cpm par μg DNA) dans les apex "ecto -" de bourgeons postérieurs de stade 19.

	Témoin 24 h.	Non traité 72 h.	Traité 0 - 24 h.	Traité 24 - 48 h.	Traité 48 - 72 h.	Traité 24 - 72 h.
$\mu\text{g DNA}$	1,75±0,60 n = 3	1,33±0,48 n = 3	1,46±0,15 n = 3	1,29±0,38 n = 4	1,38±0,45 n = 4	0,89±0,36 n = 5
Cpm/ $\mu\text{g DNA}$	73 ±10 n = 3	367±59 n = 3 **	231±39 n = 3 •	313±74 n = 4	625±59 n = 4 ••	503±73 n = 5 ••

- Explants témoin à 24 h : explants cultivés 24 h. sans dbAMPc
 - Explants non traités à 72 h. : explants cultivés 72 h. sans dbAMPc
 - Explants traités : explants cultivés 72 h., traités soit 24 h. le 1er, 2nd ou 3ème jour de culture avec 1 mM de dbAMPc, soit cultivés 24 h. sans dbAMPc puis traités 48h.
- n = Nombre d'échantillons mesurés dans chaque série. Un échantillon correspond à un homogénat de deux explants.

Le test t de Student est calculé pour comparer les valeurs du contenu en DNA et d'incorporation de sulfate radioactif :

- a) entre les explants témoins à 24 h. et les explants non traités à 72 h. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)
- b) entre les explants non traités à 72 h. et traités (• = $p < 0,05$; •• = $p < 0,01$)



- 47 -

PLANCHE X : Accumulation des GAG sulfatés dans des bourgeons de membres de souris de stade 19 après un traitement de 24 h. au dbAMPc (1 mM) appliqué au début de chacun des 3 jours de culture ou pendant 48 h. après 1 jour de culture.

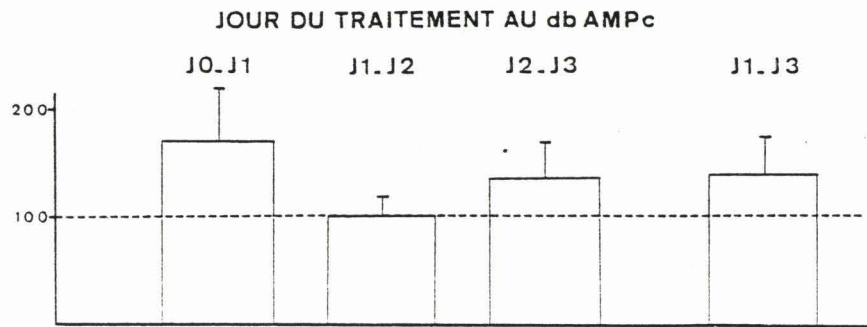


FIG. 1: BOURGEONS ANTERIEURS "ECTO +"

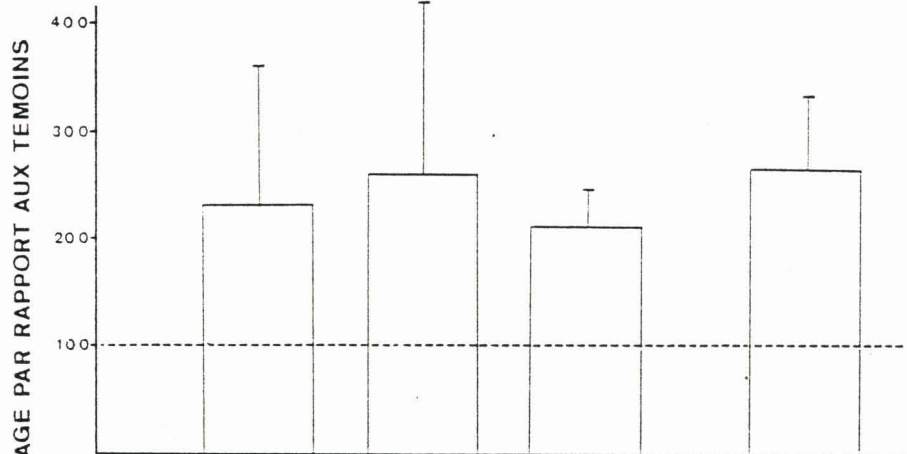


FIG. 2: BOURGEONS ANTERIEURS "ECTO -"

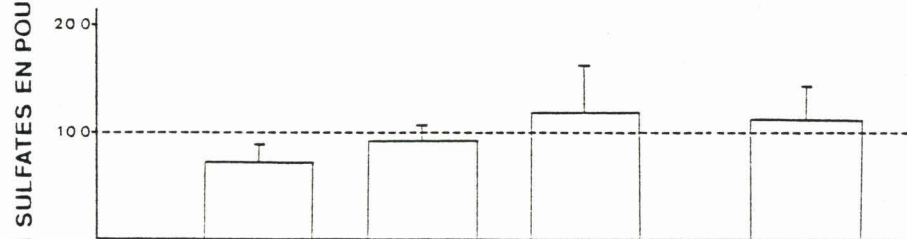


FIG. 3: BOURGEONS POSTERIEURS "ECTO +"

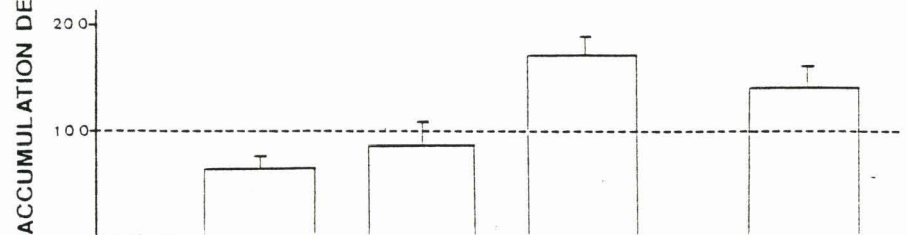


FIG. 4: BOURGEONS POSTERIEURS "ECTO -"



La valeur des explants traités, mesurée après 72 h. de culture, est exprimée en pourcentage par rapport à celle des explants témoins, cultivés 72 h. en absence de dbAMPc, fixée arbitrairement à 100 %.

Chaque expérience a été dupliquée.

Les barres indiquent l'écart-type.

c) Evolution de l'accumulation des GAG sulfatés (Tableau 7, planche X, Fig. 1)

Afin de faciliter la visualisation des variations d'incorporation de sulfate radioactif, les mesures d'accumulation des GAG dans les explants traités ont été converties en pourcentage par rapport aux mesures obtenues en fin de culture dans les explants non traités.

L'incorporation de radiosulfate dans les GAG augmente dans les apex témoins entre 24 h. et 72 h. de culture. Le traitement au dbAMPc provoque une augmentation de l'incorporation lorsqu'il a lieu au cours du premier jour de culture. Appliqué au second ou au troisième jour, le nucléotide n'a pas d'effet sur l'incorporation : les valeurs des explants traités de 24 h. à 48 h. sont identiques à celles des témoins ; celles des explants traités de 48 h. à 72 h. bien que légèrement supérieures ne présentent pas de différence significative avec les valeurs des explants témoins.

2) Explants antérieurs "Ecto -"

a) Etude microscopique (Planche IX, Fig. 2)

Le mésoderme indifférencié lors du prélèvement donne des nodules où les cellules sont entourées d'un liseré matriciel après 24 h. de culture. La proportion de cellules indifférenciées qui sépare les nodules est encore importante. Après 48 h., les nodules sont formés d'une zone centrale où la matrice est épaisse et de chondrocytes périphériques plus jeunes, eux-mêmes entourés par des cellules mésenchymateuses. En fin de culture, des nodules de cartilage hypertrophique côtoient des nodules où les cellules sont pourvues d'une matrice d'épaisseur variable. Il subsiste des travées étroites de cellules non différenciées situées entre les nodules.

L'examen d'explants traités au cours du premier jour révèle la mise en place de petits nodules à cartilage hypertrophique constitués de chondrocytes matures séparés par des travées de cellules mésenchymateuses. Si le traitement a lieu entre 24 h. et 48 h., il apparaît une matrice colorable au bleu Alcian entre les nodules à cartilage hypertrophique. Les travées de cellules mésenchymateuses sont étroites. Les explants traités en fin de culture donnent de gros nodules coalescents, les chondrocytes y sont hypertrophiés, les zones internodulaires présentent une matrice abondante, il ne subsiste qu'un nombre limité de cellules mésenchymateuses.

b) Analyse de la teneur en DNA (Tableau 8)

La teneur en DNA des explants antérieurs dénudés non traités au dbAMPc ne présente pas de différence statistiquement significative entre 24 h. et 72 h. de culture. En présence du nucléotide, seul un traitement appliqué au cours des premières 24 h. induit une diminution du contenu en DNA.

c) Evolution des GAG sulfatés (Tableau 8, planche X, Fig. 2)

Dans les explants antérieurs dénudés témoins, l'incorporation de sulfate radioactif augmente entre 24 h. et 72 h. de culture. Lorsque les explants sont traités au dbAMPc, l'incorporation de sulfate augmente si le nucléotide est administré au cours du troisième jour de culture ou s'il est placé dans le milieu pendant 48 h. en fin de culture.

3) Explants postérieurs "Ecto +"

a) Etude microscopique (Planche IX, Fig. 3)

Après 24 h. de culture, les explants postérieurs intacts ont mis en place de petites condensations proximales où commence le dépôt de matrice. Leur partie distale ne contient aucune zone de condensation. Après 48 h., *in vitro*, les cellules de la zone proximale ont accumulé les composés colorables au bleu Alcian, une ou deux zones de condensations cellulaires apparaissent au coeur de l'explant. En fin de culture, la partie proximale contient des nodules dont le cartilage est hypertrophique tandis que la matrice apparaît dans les condensations axiales.

L'examen des explants postérieurs "Ecto +" traités au premier jour de culture ne révèle pas de grandes différences par rapport aux témoins. Il semble cependant que le nombre de chondrocytes hypertrophiés proximaux soit plus faible. Par ailleurs, le mésenchyme distal présente des zones de dégénérescence. Le même examen pratiqué sur des apex traités entre 24 h. et 48 h. met en évidence une chondrogenèse diffuse dans toute la partie proximale. Enfin un traitement appliqué pendant le dernier jour de culture conduit à un aspect histologique comparable à celui des témoins au coeur de l'explant. La quantité de cartilage proximal hypertrophique semble plus importante chez les traités.

b) Analyse de la teneur en DNA (Tableau 9)

Bien que la teneur en DNA des explants postérieurs intacts fluctue entre 24 h. et 72 h.

de culture de même qu'à la suite des différents traitements au dbAMPc, les différences observées ne sont statistiquement pas significatives.

c) Evolution des GAG sulfatés (Tableau 9, planche X, Fig. 3)

Les valeurs d'incorporation de sulfate radioactif augmentent dans les explants postérieurs intacts entre 24 h. et 72 h. de culture. La présence de dbAMPc dans le milieu provoque des variations de l'incorporation mais les différences ne sont pas significatives par rapport aux valeurs des explants témoins.

4) Explants postérieurs "Ecto -"

a) Etude microscopique (Planche IX, Fig. 4)

Dans les apex témoins après 24 h. de culture, nous avons observé une dégénérescence cellulaire importante mais il existe aussi quelques rares centres de différenciation pourvus d'une matrice très discrète. Des apex témoins fixés après 48 h. montrent encore quelques zones de dégénérescence et une extension de la chondrogenèse. Après 3 jours, plusieurs nodules où les chondrocytes ont accumulé des quantités variables de matrice, sont présents et séparés par des cellules mésenchymateuses.

Traités au cours des 24 premières heures, les explants montrent en fin de culture une matrice d'épaisseur variable déposée irrégulièrement. De nombreuses cellules sont en dégénérescence. Un traitement effectué au jour 2 conduit à une meilleure différenciation dans la mesure où la matrice s'étend à une grande partie de l'explant même si elle reste fine. Il subsiste quelques foyers de dégénérescence. Le traitement des explants pendant le dernier jour de la culture conduit à une chondrogenèse générale: quelques groupes de chondrocytes hypertrophiés sont entourés de cellules à matrice épaisse. On n'observe pas de nodules franchement individualisés comme chez les témoins.

b) Analyse de la teneur en DNA (Tableau 10)

La teneur en DNA des explants postérieurs dénudés se maintient entre 24 h. et 72 h. de culture. Dans les explants traités, quels que soient le moment et la durée d'application du dbAMPc, la valeur de la teneur en DNA oscille autour de celle des apex témoins.

c) Evolution des GAG sulfatés (Tableau 10, Planche X, Fig. 4)

Dans les explants témoins, l'incorporation de sulfate radioactif augmente entre 24 h. et 72 h. de culture. Dans les apex traités, on note une diminution de l'incorporation lorsque le db AMPc est administré aux cultures entre 0 h. et 24 h. Au contraire, si le nucléotide est placé dans le milieu au cours du troisième jour ou pendant les dernières 48 h. de la culture, l'incorporation est augmentée. Dans les explants traités de 24 h. à 48 h., l'incorporation est comparable à celle des explants témoins.

Les résultats montrent que dans les apex dénudés de bourgeons de membres antérieurs et postérieurs de souris de stade 19, la stimulation de la chondrogenèse estimée par l'augmentation d'incorporation de radiosulfate, n'a lieu que si le dbAMPc est présent dans le milieu lors du troisième jour de culture. En outre, dans les bourgeons postérieurs, le nucléotide provoque une diminution de l'incorporation lorsqu'il est administré au cours des premières 24 h. Dans les bourgeons antérieurs intacts, l'augmentation d'incorporation n'a lieu que si le dbAMPc est présent au cours du premier jour de culture. Les bourgeons postérieurs intacts quant à eux ne paraissent pas réceptifs.

Ces résultats mettent particulièrement en évidence la spécificité de la réponse des bourgeons vis-à-vis de traitements au dbAMPc échelonnés au cours de la culture. Cette spécificité semble être liée à deux paramètres : a) les conditions expérimentales définies par la présence ou non de l'ectoderme ; b) l'état de maturation des bourgeons : les bourgeons postérieurs sont physiologiquement plus jeunes que les bourgeons antérieurs, bien que prélevés au même moment (Planche I). Dans les apex dénudés, l'effet activateur du dbAMPc sur la chondrogenèse ne se manifeste qu'en fin de culture, lorsque les bourgeons sont constitués d'un mélange de cellules mésenchymateuses et de chondrocytes différenciés. Au contraire, dans les apex antérieurs intacts, cet effet n'est perçu qu'au cours du premier jour de culture quand la majorité des cellules est encore indifférenciée.

La complexité des ces résultats nous a amenés à compléter cette étude en analysant la distribution dans l'espace des cellules impliquées dans les modifications du métabolisme des

bourgeons. Bien que fortement réceptifs à l'effet stimulateur du dbAMPc sur la différenciation cartilagineuse (Chapître I) les apex dénudés, de par leur chondrogenèse anarchique ne permettent pas d'étudier la situation topographique des cellules. Nous avons donc utilisé des apex antérieurs intacts dont la morphogenèse squelettique est caractéristique et qui présentent une certaine réceptivité vis-à-vis du dbAMPc.

II. - RECEPTIVITE SPATIALE

1) Incorporation de 5-BrdU

a) Traitement au dbAMPc appliqué au cours du premier jour de culture (Planche XI)

Les explants témoins cultivés en absence de dbAMPc et fixés après 28 h. *in vitro* présentent des rayons autopodiaux bien distincts constitués de cellules agrégées (Fig. 1) dont les noyaux n'ont pas incorporé de BrdU (Fig. 3). La fluorescence se trouve localisée dans le mésenchyme périphérique et entre les métacarpiens (Fig. 3). La taille des explants diminue lorsqu'ils sont traités au dbAMPc au cours du premier jour de culture. En outre, la quasi totalité de l'explant est occupée par des cellules agrégées (Fig. 2). On n'observe plus la disposition rayonnée des explants témoins. La BrdU n'est incorporée que par un petit nombre de cellules périphériques et les cellules situées de part et d'autre du sinus marginal. La plupart des cellules composant l'amas central n'est pas marquée par l'anticorps (Fig. 2).

b) Traitement au dbAMPc appliqué au cours du deuxième jour de culture (Planches XII et XIII)

Après deux jours de culture, les explants témoins montrent des rayons autopodiaux où a commencé le dépôt d'une matrice colorable au bleu Alcian (Planche XII, Fig. 1). Une zone de condensation occupe la partie proximale des explants. L'anticorps monoclonal anti-BrdU ne se fixe que sur quelques noyaux des métacarpiens. La partie proximale des explants n'est pas marquée mais tout le mésenchyme périphérique et apical a fortement incorporé la BrdU. Des zones non marquées apparaissent entre les métacarpiens (Planche XII, Fig. 3). Certains explants traités

diffèrent peu des témoins : de larges zones non marquées (Fig. 4) s'intercalent entre les métacarpiens dans lesquels s'accumule par ailleurs la matrice cartilagineuse (Fig. 2). Dans d'autres cas, la disposition autopodiale rayonnée est complètement perdue chez les traités : autour de foyers nodulaires en chondrogenèse, on observe l'agrégation de nombreuses cellules (Planche XIII, Fig. 2). L'examen après marquage par l'anticorps révèle que la plupart de ces cellules n'ont pas incorporé la BrdU (Planche XIII, Fig. 4) alors que chez les témoins les noyaux des cellules situées en dehors des rayons autopodiaux ont fortement fixé l'anticorps (Planche XIII, Fig. 3).

c) Traitement au dbAMPC appliqué au cours du troisième jour de culture (Planches XIV, XV)

Les apex témoins observés après trois jours de culture présentent du cartilage hypertrophique à la fois dans les nodules proximaux (Planche XV, Fig. 1) et dans les rayons autopodiaux (Planches XIV et XV, Fig. 1). Quelques chondrocytes hypertrophiés ont incorporé de la BrdU (Planches XIV, XV, Fig. 3). Les cellules périphériques et distales sont pratiquement toutes marquées par l'anti BrdU. Les espaces situés entre les métacarpiens sont réduits et les noyaux des cellules n'y sont pas marqués. Une petite calotte de cellules aux noyaux non fluorescents coiffe l'extrémité des métacarpiens. Lorsque les apex ont été traités pendant le troisième jour de culture, l'examen du squelette ne révèle que quelques fusions proximales des métacarpiens (Planche XIV, Fig. 2). L'examen en immunofluorescence met en évidence des zones interdigitales élargies, en continuité avec les cellules non marquées de l'extrémité des métacarpiens (Planches XIV - XV, Fig. 4). Ces coiffes distales paraissent elles-mêmes plus importantes.

2) Aspect macroscopique après 6 jours de culture (Planche XVI)

Fixés après 6 jours de culture, les apex de bourgeons antérieurs intacts de stade 19 présentent des rayons autopodiaux bien individualisés formés de métacarpiens et d'une première rangée de phalanges. Des nodules proximaux ont fusionné (Fig. 1 à 4).

Les bourgeons traités au premier jour de culture montrent après 6 jours des fusions très importantes au niveau des rayons autopodiaux. Les métacarpiens fusionnés intègrent les phalanges pour former des squelettes où les distorsions sont très importantes. Les nodules proximaux

paraissent plus petits que dans les apex témoins (Fig. 5 à 8).

Lorsque le traitement a lieu au second jour de culture, les explants sont petits. Les différents éléments squelettiques ne sont plus identifiables et sont dispersés au hasard dans l'ensemble de l'apex. La quantité de cartilage formé semble réduite (Fig. 9 à 12).

Les explants traités au troisième jour de culture mettent en place un squelette organisé bien que des fusions proximales des métacarpiens apparaissent. D'autre part, il faut noter dans de nombreux cas un développement important de la partie proximale des explants représentant l'extrémité du zeugopode et le basipode (Fig. 13 à 16).

L'ensemble de ces résultats montre une corrélation assez étroite entre la distribution, dans les apex, des cellules n'ayant pas incorporé de BrdU à l'issue du traitement et les prestations squelettiques fournies par des explants traités qui ont pu évoluer 6 jours en culture.

Dans les explants traités au cours du troisième jour de culture, les métacarpiens sont entourés d'un grand nombre de cellules agrégées n'incorporant pas la BrdU. L'examen après 6 jours de culture révèle la présence de métacarpiens très larges, fusionnés du côté proximal. Un autre fait à noter dans ces explants concerne le développement très important des nodules les plus proximaux. Un traitement appliqué au cours du second jour se traduit après 6 jours de culture par l'apparition d'un squelette fortement désorganisé. Il existe bien des nodules cartilagineux dans la partie moyenne des explants, mais on peut difficilement les assimiler aux métacarpiens qui devaient être ébauchés au début du traitement et qui apparaissent chez les témoins. La présence de condensations cellulaires observées à l'issue du traitement et situées en dehors des zones normales de chondrogenèse pourrait être liée à l'apparition des nodules non identifiables observés à 6 jours. Enfin, dans les explants traités au premier jour, la quasi totalité des cellules, situées au coeur du bourgeon dans la zone présomptive des métacarpiens, n'incorpore pas la BrdU. Après 6 jours de culture, les rayons autopodiaux présents dans ces explants ont fusionné.

PLANCHE XI à PLANCHE XV : Apex de bourgeons de membres antérieurs "Ecto +" de stade 19, incubés 24 h. avec la BrdU (50 μ mM) et traités ou non au dbAMPc (1mM) pendant une durée de 28 h. coïncidant avec le premier, second ou troisième jour de culture. (X 105)

Quatre heures avant le début de l'incubation avec la BrdU, les explants sont mis en présence de db AMPc. Les explants témoins sont cultivés en présence de BrdU seule. Tous les apex, témoins et traités, sont fixés et inclus à la fin de l'incubation avec la BrdU. Les coupes histologiques sont traitées avec un anticorps monoclonal dirigé contre la BrdU fabriqué chez la souris. Le complexe antigène-anticorps est révélé en immunofluorescence indirecte par une solution de gammaglobulines fabriquées chez le lapin, marquées au FITC et dirigées contre les anticorps de souris (Fig. 3 et 4). Après examen, les mêmes coupes sont lavées et colorées au bleu Alcian à pH 1, puis à l'hématoxyline (Fig. 1 et 2).

ABREVIATIONS

- P : région proximale du bourgeon
- D : région distale du bourgeon
- CA : cartilage
- co : condensation précartilagineuse

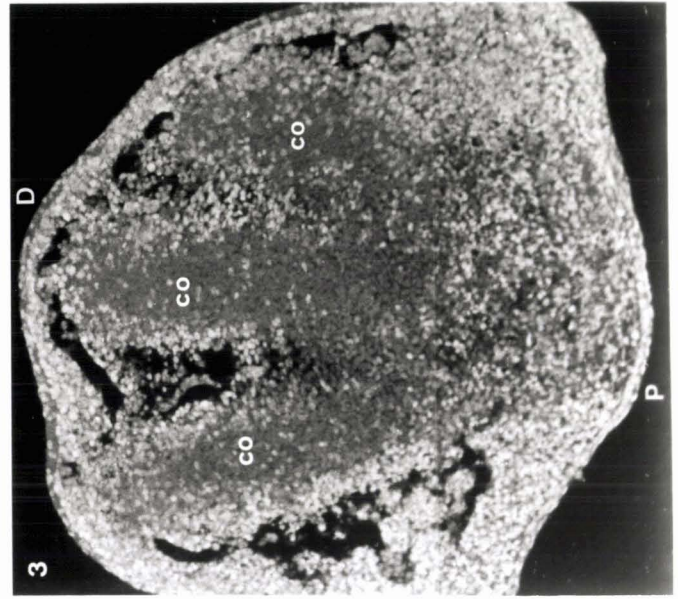
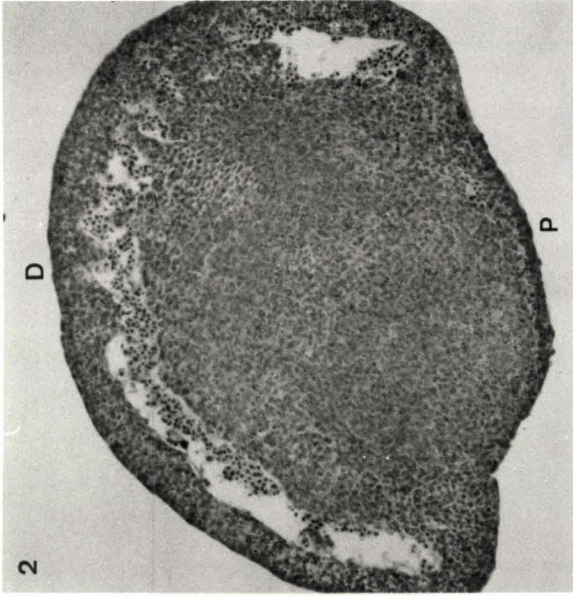
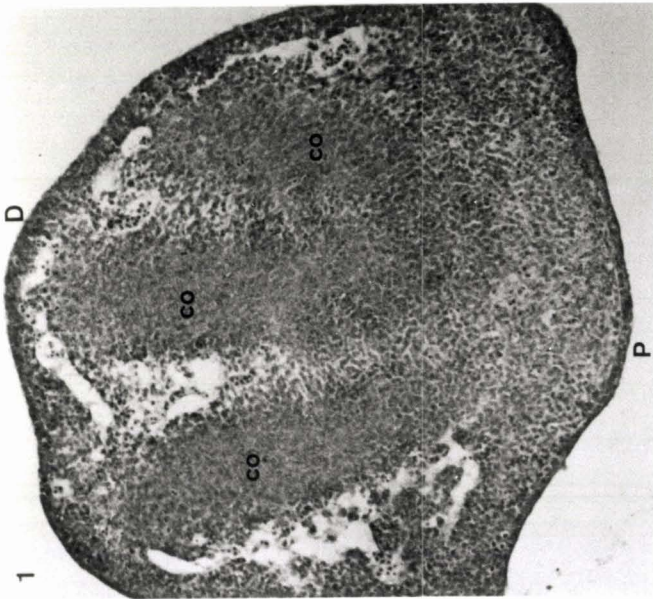


PLANCHE XI : Traitement au dbAMPc (1mM) appliqué au cours du premier jour de culture.

Fig. 1 et 3 : Coupe longitudinale dans un explant témoin après 28 h. de culture.

Les rayons autopodiaux apparaissent sous la forme de condensations cellulaires. La plupart des noyaux situés dans ces zones de forte densité cellulaire n'ont pas incorporé de BrdU (co).

Fig. 2 et 4 : Coupe longitudinale dans un explant traité de 0 h. à 28 h. de culture.

On ne distingue plus les rayons autopodiaux. Une zone centrale où la densité cellulaire est élevée apparaît. Un grand nombre de noyaux situés dans cette zone n'a pas incorporé la BrdU.

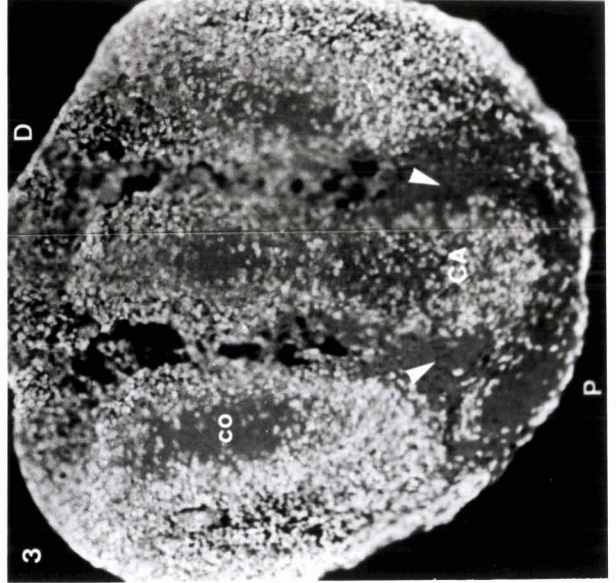
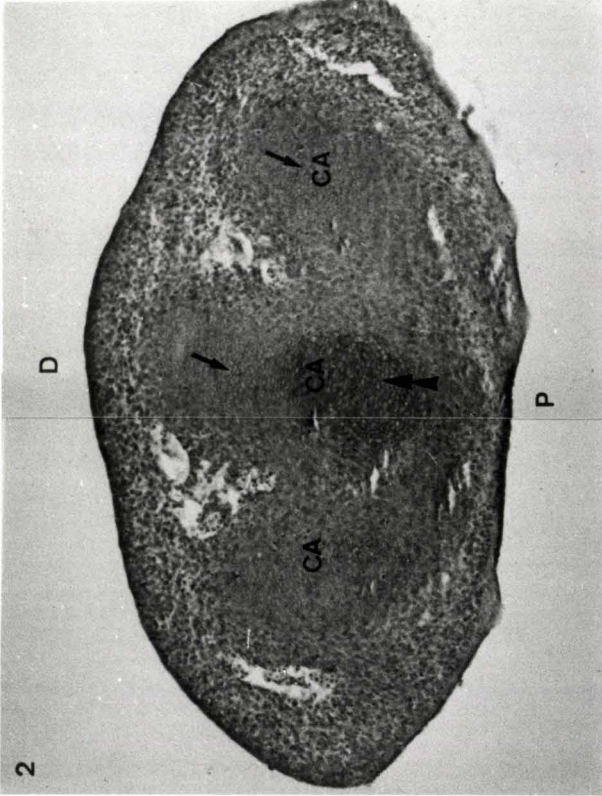
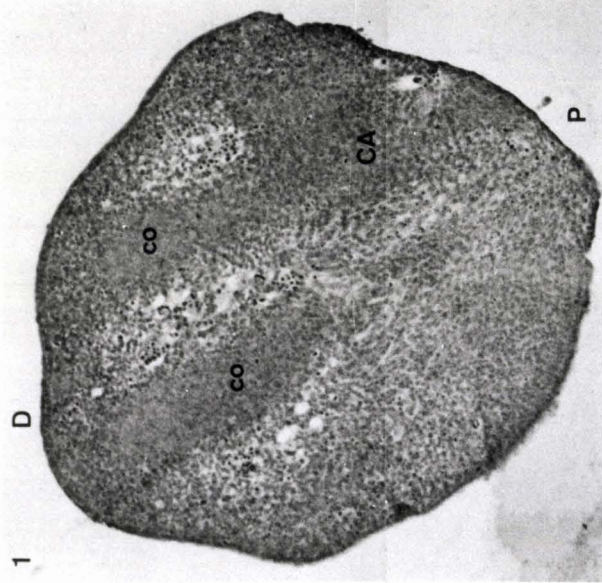


PLANCHE XII : Traitement au dbAMPc (1mM) appliqué au cours du deuxième jour de culture.

Fig. 1 et 3 : Coupe longitudinale dans un explant témoin après 52 h. de culture.

La matrice cartilagineuse apparaît dans la partie proximale des rayons autopodiaux (CA). La partie distale des rayons est encore constituée de cellules en phase de condensation (co). Des zones où les noyaux n'ont pas incorporé la BrdU apparaissent entre les métacarpiens (têtes de flèches).

Fig. 2 et 4 : Coupe longitudinale dans un explant traité de 24 h. à 52 h. de culture. La structure générale de l'explant est comparable à celle des témoins. On notera que les plus jeunes chondrocytes n'incorporent pas la BrdU (flèches) contrairement aux chondrocytes plus âgés (doubles têtes de flèches). Les régions non marquées situées entre les métacarpiens sont très nettes (tête de flèches).

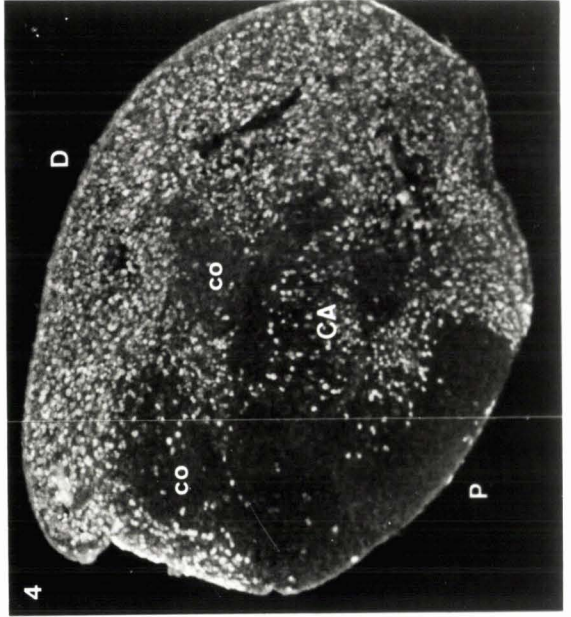
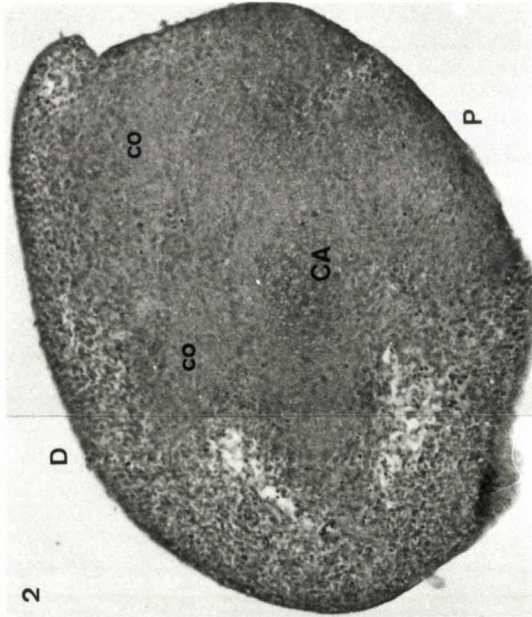
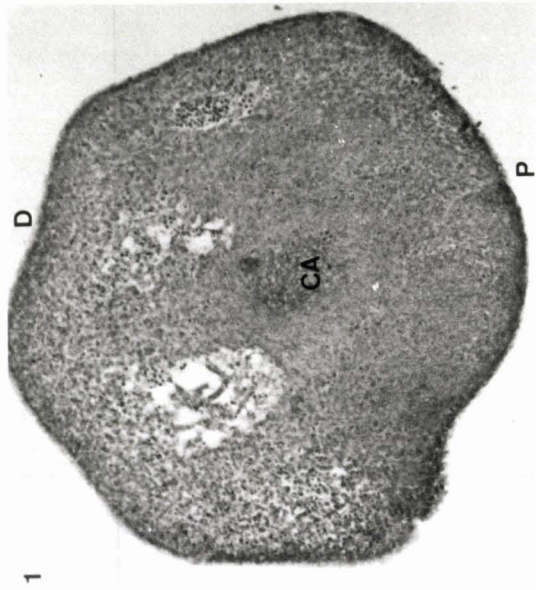


PLANCHE XIII : Traitement au dbAMPc (1mM) appliqué au cours du deuxième jour de culture.

Fig. 1 et 3 : Coupe longitudinale dans un explant témoin après 52 h. de culture.

Le plan de coupe situé tangentiellement par rapport aux rayons autopodiaux montre que les cellules périphériques incorporent activement la BrdU. La partie proximale de l'explant (P) est formée de cellules qui n'ont pas incorporé le précurseur mais qui ont commencé le dépôt de matrice.

Fig. 2 et 4 : Coupe longitudinale dans un explant traité de 24 h. à 52 h. de culture.

Des zones de forte densité cellulaire (co) sont situées à côté d'un nodule cartilagineux. Cet aspect n'évoque pas du tout la disposition rayonnée observée chez les témoins bien que la partie proximale de cet explant traité soit comparable.

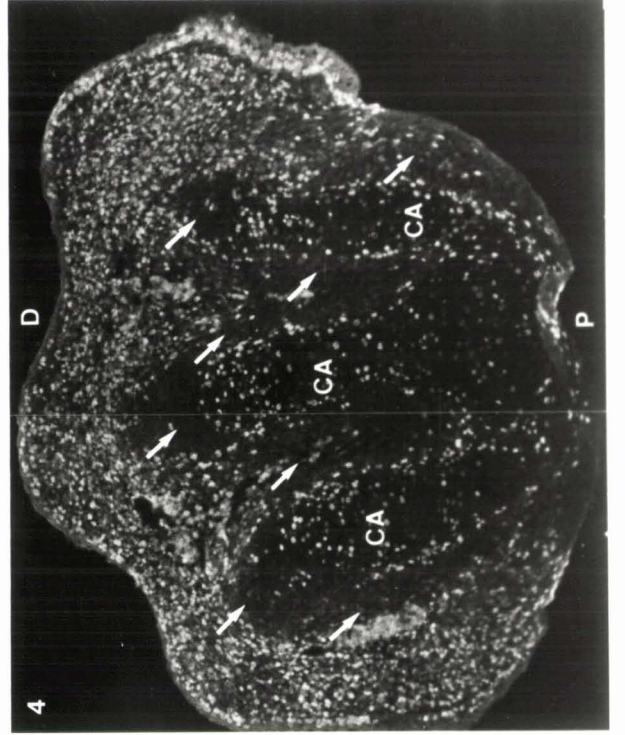
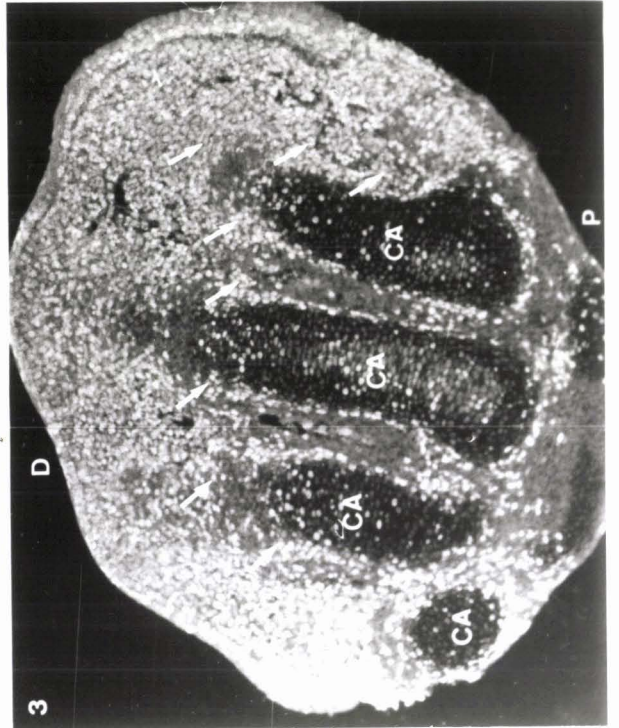
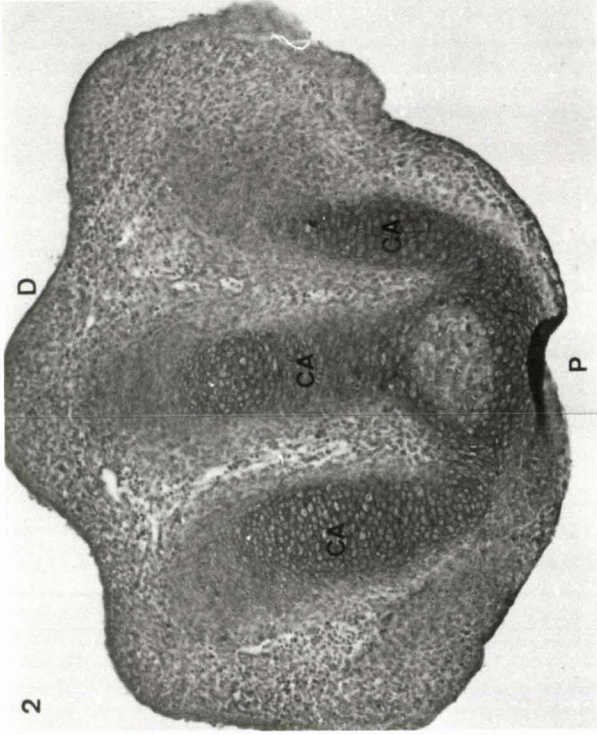
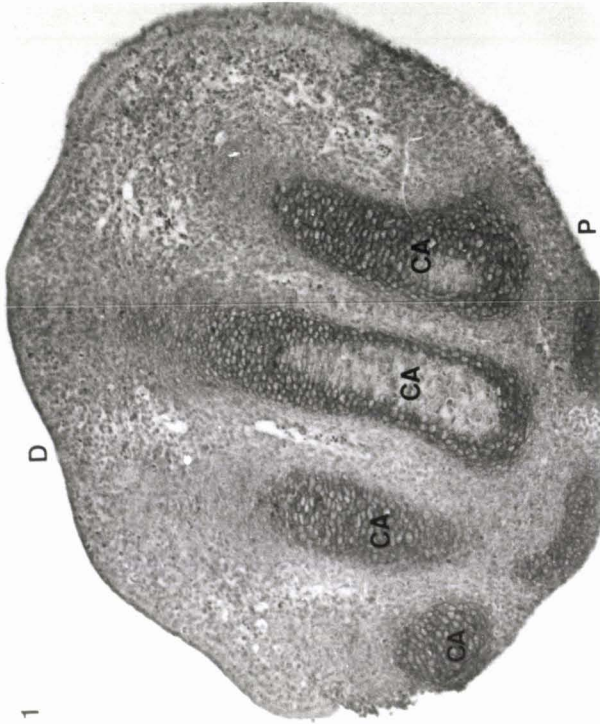


PLANCHE XIV : Traitement au dbAMPc (1mM) appliqué au cours du troisième jour de culture.

Fig. 1 et 3 : Coupe longitudinale dans la partie distale d'un explant témoin après 76 h. de culture.

Les rayons autopodiaux sont formé du côté proximal de chondrocytes à matrice épaisse dont certains ont incorporé la BrdU. Une calotte de jeune chondrocytes non marqués coiffe chaque rayon. Les cellules situées entre les rayons n'ont pas incorporé de BrdU. Néanmoins de nombreuses zones marquées apparaissent à proximité immédiate des éléments cartilagineux (flèches) ainsi qu'au niveau du périchondrium.

Fig. 2 et 4 : Coupe longitudinale dans la partie distale d'un explant traité de 48 h. à 76 h. de culture.

Si la coloration au bleu Alcian ne révèle pas de différences nettes par rapport au témoin, le marquage avec la BrdU révèle des synthèses de DNA dans les chondrocytes hypertrophiques des métacarpiens et dans le mésenchyme périphérique et distal de l'explant. Les jeunes chondrocytes distaux n'ont pas incorporé le précurseur. Des zones non marquées s'étendent autour des métacarpiens jusqu'à fusionner avec l'extrémité distale non marquée des rayons (flèches). Le périchondrium n'est pas souligné autant que chez le témoin.

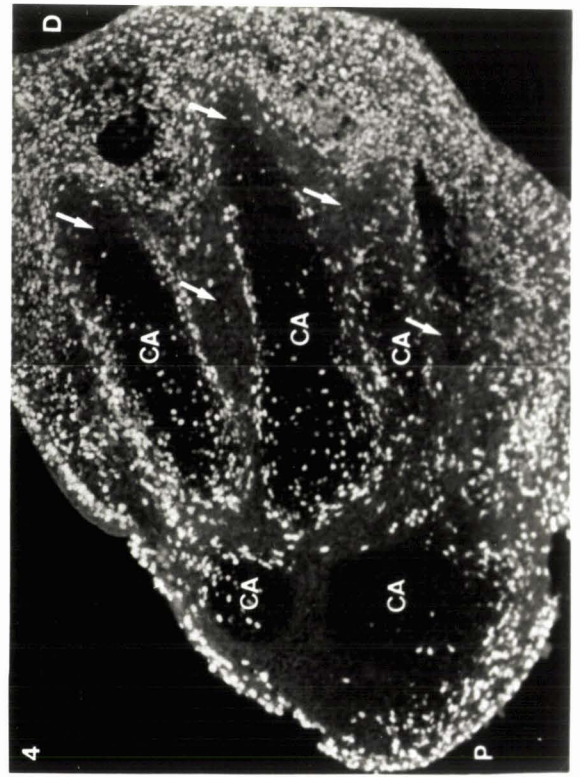
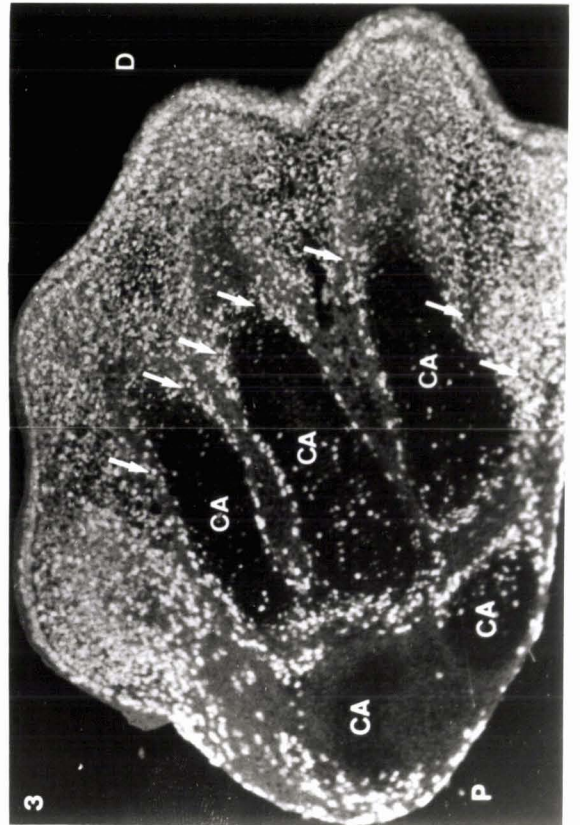


PLANCHE XV : Traitement au dbAMPc (1 mM) appliqué au cours du troisième jour de culture.

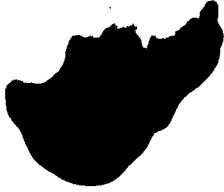
Fig. 1 et 3 : Coupe longitudinale montrant la partie proximale d'un explant témoin après 76 h. de culture.

La partie proximale de l'explant est constituée de chondrocytes à matrice épaisse dont la plupart n'a pas incorporé la BrdU. Les prestations squelettiques fournies au niveau des rayons autopodiaux sont identiques à celles qui ont été décrites planche XIV, Fig. 1 et 3.

Fig. 2 et 4 : Coupe longitudinale montrant la partie proximale d'un explant traité de 48 h. à 76 h. de culture.

Des chondrocytes à matrice épaisse sont présents dans la partie proximale des explants. La quasi totalité de ces chondrocytes n'est pas marquée par l'anticorps anti BrdU. Les métacarpiens ont un aspect comparable à celui qui a été décrit planche XIV, Fig. 2 et 4.

1



2



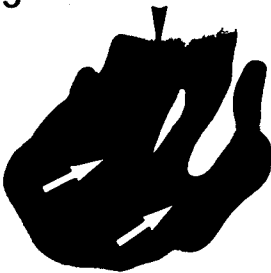
3



4



5



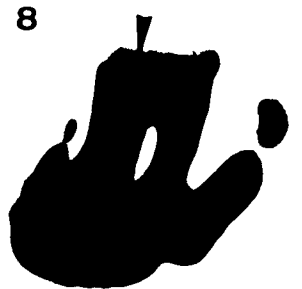
6



7



8



9



10



11



12



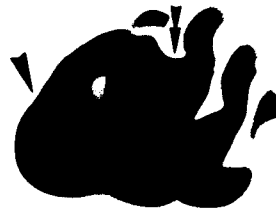
13



14



15



16

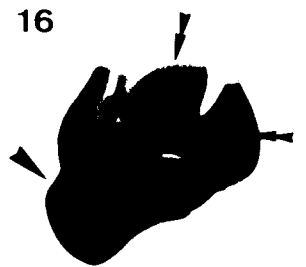


PLANCHE XVI : Récapitulation des prestations squelettiques fournies après 6 jours de culture par des bourgeons de membres antérieurs de stade 19, traités au dbAMPc (1 mM) pendant une durée de 24 h. coïncidant avec chacun des 3 premiers jours de culture.

Toutes les figures de cette planche représentent l'aspect macroscopique d'apex de bourgeons de membres antérieurs de souris de stade 19, colorés au bleu Alcian après 6 jours de culture.

Fig. 1 à 4 : Apex non traités au dbAMPc.

Les rayons autopodiaux apparaissent individualisés. Des fusions proximales discrètes apparaissent. (X 40)

Fig. 5 à 8 : Apex traités au dbAMPc (1mM) entre 0 h. et 24 h. de culture.

Des fusions importantes affectent les rayons autopodiaux tant du côté proximal (flèches) que du côté distal (têtes de flèches). (X 40)

Fig. 9 à 12 : Apex traités au dbAMPc (1mM) entre 24 h. et 48 h. de culture.

La quantité globale de cartilage paraît réduite. Les éléments formés sont peu reconnaissables. (X 40)

Fig. 13 à 16 : Apex traités au dbAMPc (1mM) entre 48 h. et 72 h. de culture.

Les métacarpiens sont très larges (doubles têtes de flèches), fusionnés du côté proximal. La partie distale du zeugopode et les carpiens visibles sont hypertrophiés (têtes de flèches). (X 40)

DISCUSSION

Nous discuterons successivement les interprétations que nous suggèrent les résultats des deux parties de cette étude.

Réceptivité temporelle

Il est clair que le comportement des cellules de bourgeons de membres de souris, vis-à-vis d'un traitement long (48 h.) et tardif (après 24 h. de culture) au dbAMPc dépend du stade de développement auquel l'ébauche est parvenue au moment du traitement (Chapître I). Les résultats de la présente étude apportent la certitude que pour un stade donné, l'effet globalement stimulateur du dbAMPc sur la chondrogenèse est en fait la résultante d'une suite d'événements beaucoup plus complexes qui semblent alterner ou se chevaucher dans le temps.

Bien que prélevés au même moment (11ème jour de gestation) les bourgeons antérieurs et postérieurs sont physiologiquement différents : les bourgeons postérieurs présentent un léger retard par rapport à leurs homologues antérieurs (Planche I). Il est vraisemblable que cette différence physiologique soit à l'origine de la spécificité de la réponse des bourgeons vis-à-vis du traitement au dbAMPc. Les fluctuations d'incorporation de sulfate radioactif dans les glycosaminoglycannes, mesurées à la suite de traitements au dbAMPc échelonnés au cours de la culture, suggèrent que le nucléotide a sur les bourgeons de membres des effets qui semblent liés à l'apparition et à la disparition de certaines populations cellulaires ainsi qu'à leur évolution dans le temps.

Dans les bourgeons postérieurs, physiologiquement les plus jeunes, un traitement au dbAMPc appliqué au cours du premier jour de culture sur des apex dénudés provoque une forte diminution d'incorporation de sulfate radioactif par rapport aux explants témoins. Ces valeurs d'incorporation sont rapportées à la quantité de DNA des explants. Les résultats tiennent donc compte d'une éventuelle diminution du nombre de cellules. Par ailleurs, la teneur en DNA des explants postérieurs traités au dbAMPc n'est pas significativement différente de celle des apex témoins. Il semblerait donc que cette diminution d'incorporation soit l'expression d'un effet inhibiteur du dbAMPc sur la chondrogenèse plutôt que celle d'un effet toxique ayant pour cible

préférentielle des cellules chondrogènes. Néanmoins, bien que la teneur en DNA des explants traités soit comparable à celle des témoins, l'examen histologique a révélé la présence d'importantes zones de dégénérescence dans les apex traités entre 0h. et 24 h. de culture. Nous ne pouvons donc exclure totalement la possibilité d'une destruction sélective de cellules sous l'effet du dbAMPc. Quoi qu'il en soit, ces deux processus traduisent un effet néfaste du dbAMPc sur la chondrogenèse des apex postérieurs dénudés traités au cours du premier jour de culture. Par ailleurs, nos expériences ont montré que si ces explants sont traités tardivement, au cours du troisième jour de culture, l'incorporation de radiosulfate est supérieure à celle obtenue dans les apex témoins. Cette augmentation pourrait traduire l'apparition d'une population cellulaire réceptive à l'effet stimulateur du dbAMPc sur la chondrogenèse. Il est possible que le comportement des apex postérieurs dénudés traités au cours du premier jour de culture soit lié à une maturation insuffisante des cellules présentes au moment de la mise en culture ; AHRENS *et al.* (1977) ont d'ailleurs signalé que des cultures en micromasse de mésenchyme de membre de poulet (stade 19) traitées dès leur mise en culture sont essentiellement constituées de fibroblastes mais ne contiennent pas les agrégats cellulaires présents dans les cultures témoins non traitées. Au contraire, si le dbAMPc est ajouté aux cultures après 24 h. il provoque la différenciation en nodules cartilagineux des agrégats qui se sont mis en place dans les cultures.

Les apex postérieurs munis de leur ectoderme semblent être insensibles à la présence du nucléotide. Quel que soit le jour où le dbAMPc est administré aux cultures, les valeurs d'incorporation de sulfate radioactif et de la teneur en DNA fluctuent autour des valeurs des témoins. L'ectoderme semble donc s'opposer aux effets du nucléotide. Il paraît toutefois exclu que la couverture ectodermique empêche la pénétration du dbAMPc dans les bourgeons par un simple rôle de barrière mécanique. En effet, en plus des raisons évoquées dans le chapitre I, même si elles n'ont pas été décelées lors des dosages de contenu en DNA, quelques zones pycnotiques ont été observées spécifiquement au niveau du mésenchyme distal des apex traités de 0 h. à 24 h. de culture.

Dans les bourgeons antérieurs, physiologiquement plus matures que les ébauches postérieures au moment du prélèvement, le dbAMPc provoque sur les apex dénudés, une

augmentation d'incorporation de radiosulfate s'il est appliqué de 48 h. à 72 h. lorsque les apex sont constitués de nodules cartilagineux entourés par des cellules encore indifférenciées (Planche IX, fig. 2). Rappelons que la diminution d'incorporation observée après un traitement au cours du premier jour, attribuée à un manque de maturité des bourgeons postérieurs dénudés, n'a pas lieu dans le cas des apex antérieurs. En présence d'ectoderme, le dbAMPc provoque une activation de l'incorporation s'il est appliqué dès la mise en culture lorsque les apex ne présentent pas encore de condensations cellulaires (Planche IX, Fig. 1). Ces résultats suggèrent que dans les apex antérieurs, l'activation de la chondrogenèse corrélative à la présence de dbAMPc serait liée à la réponse de types cellulaires différents : des cellules encore indifférenciées dans le cas des apex couverts d'ectoderme et des chondrocytes différenciés dans le cas des apex dénudés. Nous avons émis l'hypothèse que le db AMPc pourrait augmenter la chondrogenèse de ces deux types d'apex selon deux mécanismes différents :

1. Un recrutement de cellules non chondrogènes autour de foyers chondrogènes mis en place au cours du premier jour de culture dans les apex intacts ;
2. Une stimulation du dépôt de matrice cartilagineuse par les chondrocytes présents dans les apex dénudés. Notons que ces deux mécanismes ne sont pas exclusifs mais qu'ils pourraient, selon le type d'apex et le moment d'administration du dbAMPc, être exprimés de façon prépondérante.

L'examen histologique réalisé à 3 jours de culture a apporté peu de renseignements. Il n'a surtout pas permis de visualiser les variations des synthèses de matrice cartilagineuse mesurées par l'incorporation de sulfate dans les explants. Les fixations ont été réalisées entre 0 h. et 48 h. après la fin du traitement au dbAMPc, suivant le jour où les explants ont été traités. Or SOLURSH (1984 a) a signalé que, dans des cultures en micromasse de mésenchyme de membre de poulet de stade 24 (équivalant au stade 19 chez la souris) les protéoglycannes spécifiques du cartilage et le collagène de type II sont décelables respectivement après 16 h. et 24 h. de culture et que, la détection de la matrice extracellulaire par le bleu Alcian n'est possible qu'après 40 h. de culture. Il apparaît que le délai entre le traitement au dbAMPc et l'observation histologique est juste suffisant dans le cas des explants traités au premier jour. Pour cette raison, nous avons allongé le délai entre le traitement et l'examen des explants dans la seconde partie de cette étude.

Réceptivité spatiale

Dans cette seconde partie, nous avons cherché à préciser les résultats que nous avons obtenus dans le cadre de l'étude de la réceptivité temporelle, en utilisant un système expérimental caractéristique. Les bourgeons antérieurs dénudés, de par leur chondrogenèse généralisée, ainsi que les bourgeons postérieurs, trop immatures, ont été abandonnés au profit des bourgeons antérieurs couverts d'ectoderme. Nous avons cherché à établir des corrélations entre la morphogenèse squelettique et le métabolisme de la chondrogenèse en admettant que :

1 - Les durées des différentes phases du cycle cellulaire du mésenchyme de souris mesurées *in vitro* par HERKEN étaient respectées dans notre système ; 2 - La sortie du cycle cellulaire, en phase G1, précède la différenciation des cellules cartilagineuses (HERKEN, 1975 ; SOLURSH et REITER, 1975 ; MILLER *et al.*, 1979) bien que GEORGE *et al.* (1983) aient signalé que le blocage transitoire du cycle des cellules mésenchymateuses n'est pas nécessaire avant leur différenciation.

Nous avons qualifié de "hors cycle" les cellules n'ayant pas incorporé la BrdU fournie pendant 24 h. bien qu'il s'agisse d'une formulation un peu exagérée. En effet, cette durée est juste suffisante pour les cellules parvenue en fin de phase M au début de l'incubation avec la BrdU, puisque la phase G1 des cellules de mésenchyme de membre de souris dure 22,9 h. (HERKEN, 1975). Les autres phases du cycle S, G2 et M ont des durées respectives de 8 h., 1,85 h. et 1h. Il apparaît donc que des cellules en début de phase G2 au moment de l'addition de BrdU seront considérées comme des cellules hors cycle puisque environ 26 h. leur sont nécessaires avant d'entrer à nouveau en phase S. Les cellules, n'ayant pas incorporé la BrdU au cours de l'incubation, ne sont donc pas toutes sorties du cycle. Néanmoins les cellules en phase G2 échappant à un marquage ne représentent qu'une faible proportion.

A côté de cet inconvénient, l'administration de BrdU pendant 24 h. permettait de se placer dans des conditions expérimentale d'utilisation du dbAMPc les plus proches possible de celles mises en oeuvre lors de l'étude de la réceptivité des explants dans le temps. D'autre part, cette durée permettait d'éviter que la BrdU n'exerce son effet inhibiteur sur la chondrogenèse rapporté par de nombreux auteurs. HO *et al.* (1977) ont montré que l'addition de BrdU (32 μ M) à des cultures de cellules de mésenchyme de membre de poulet de stade 24 pendant les deux premiers jours de la

culture provoque l'inhibition de la synthèse du noyau protéique des protéoglycannes spécifiques du cartilage. Cet effet inhibiteur de la BrdU sur la chondrogenèse a également été décrit sur d'autres systèmes que le membre embryonnaire (PAWELEK, 1969 ; LASHER et CAHN, 1969 ; COLEMAN *et al.*, 1970 ; ABBOTT *et al.*, 1972). Dans la présente étude, l'aspect histologique des explants, non traités au dbAMPc, ayant été incubés en présence de BrdU, est comparable à celui d'explants cultivés en absence de BrdU. Ce résultat montre que, dans les conditions expérimentales mises en oeuvre, la BrdU ne paraît pas exprimer d'effet inhibiteur sur la chondrogenèse. Quand bien même cela aurait-il été le cas, nous avons pris la précaution de toujours comparer les explants, incubés avec la BrdU et traités au dbAMPc, avec des explants témoins incubés eux aussi en présence de BrdU.

L'ensemble des résultats montre une corrélation assez étroite entre la sortie du cycle de cellules situées dans certaines zones des bourgeons témoins et traités et les prestations squelettiques fournies par des bourgeons témoins et traités ayant pu évoluer 6 jours *in vitro*. La différenciation chondrogène révélée initialement par les mesures d'incorporations de sulfate a pu être mise en évidence, *in toto*, par une coloration au bleu Alcian effectuée après 6 jours de culture.

Le dbAMPc appliqué au jour 1 provoque :

- a) L'apparition, à l'issue du traitement, d'un amas central de cellules sorties du cycle qui se substitue aux cellules des rayons autopodiaux présents dans les apex non traités ;
- b) Une augmentation de l'incorporation de sulfate radioactif mesurée après 3 jours de culture ;
- c) L'apparition de rayons autopodiaux fusionnés dans la zone des métacarpiens et des phalanges après 6 jours de culture.

Le dbAMPc appliqué au jour 2 provoque :

- a) A l'issue du traitement l'apparition de zones de condensation anormales où les cellules sont bloquées ;
- b) Une stagnation de l'incorporation de sulfate radioactif mesurée après 3 jours de culture ;
- c) Une morphogenèse squelettique réduite et très perturbée après 6 jours de culture.

Le dbAMPc appliqué au jour 3 provoque :

- a) A l'issue du traitement, une extension des zones où les cellules sont bloquées ;

- b) Une stagnation de l'incorporation de sulfate radioactif après 3 jours de culture ;
- c) Une augmentation de la surface et sans doute du volume des éléments squelettiques proximaux formés après 6 jours de culture.

Cependant, le devenir de chacune des cellules hors cycle n'a pas pu être établi dans ce travail. Il subsiste donc un doute quant à la conversion d'une cellule hors cycle en chondrocyte. Dans le cas d'un bourgeon traité au jour 1, les fusions métacarpiennes observées à 6 jours pourraient résulter de deux processus différents : soit de la mort des cellules situées entre les métacarpiens, soit au contraire de l'engagement de ces mêmes cellules dans la différenciation cartilagineuse. Bien que la teneur en DNA des apex traités de 0 h. à 24 h. soit plus faible que celle des explants témoins, les contrôles histologiques dont nous disposons ne mettent pas en évidence les zones de nécrose correspondant au premier processus. En outre, les cellules hors cycle constituent un blastème préchondrogène homogène. Le processus de recrutement quant à lui est en accord avec les résultats de plusieurs études. SOLURSH *et al.* (1981 a) ont décrit dans des cultures en micromasse établies à partir de mésoderme de bourgeons alaires de poulet (stade 20 à 24), la présence, en dehors des agrégats, de cellules potentiellement chondrogènes capables de se différencier sous l'effet du dbAMPc. Chez la souris, OWENS et SOLURSH (1981) ont montré que les zones intermodulaires de cultures en micromasse de mésenchyme de membre (stade 16 à 21) se chondrifient sous l'influence du dbAMPc. GAY et KOSHER (1984) ont montré que des cellules de mésenchyme sous-apical de membre de poulet de stade 25 sont capables, en culture en micromasse, de former une nappe cartilagineuse uniforme. Chez le poulet, un travail récent de HURLE *et al.* (1986) montre que les zones interdigitales peuvent se différencier en petits nodules cartilagineux.

Un tel recrutement paraît encore possible dans des zones interdigitales et périphériques de bourgeons traités entre 24 h. et 48 h. de culture mais la morphogénèse engagée au début du traitement est perturbée comme si les métacarpiens regressaient sous l'effet du dbAMPc, cela rappelle les phénomènes d'inhibition observés dans certaines régions des bourgeons de stade 20. Après un traitement au jour 3, bien que l'augmentation des valeurs d'incorporation ne donnent pas lieu à des différences significatives par rapport aux valeurs des témoins, il se pourrait que le recrutement des cellules, situées en périphérie des métacarpiens, conduise à l'hypertrophie et à

l'apparition des fusions discrètes observées après 3 jours de culture supplémentaires. Les nodules les plus proximaux sont particulièrement développés. Dans ce cas le recrutement de nouvelles cellules chondrogènes au niveau du poignet et une éventuelle stimulation de la chondrogenèse au niveau des éléments distaux du zeugopode nous paraissent possibles. En effet, la stimulation du métabolisme des chondrocytes sous l'effet du dbAMPc a été montrée par de nombreux travaux (DREZNER *et al.*, 1976 ; MERKER et GÜNTHER, 1979 ; MILLER *et al.*, 1979 ; COPRAY et JANSEN, 1985).

Les traitements au dbAMPc provoquent des effets différents en fonction de l'état de maturation des bourgeons. Ces effets pourraient résulter d'un certain nombre de mécanismes faisant intervenir simultanément :

- un recrutement de cellules initialement non chondrogènes
- une stimulation du métabolisme des chondrocytes matures en place
- un blocage de l'évolution des jeunes chondroblastes
- la mort de certaines populations cellulaires.

CHAPITRE III

INFLUENCE DE L'ECTODERME ET DU dbAMPc SUR LES PROTEOGLYCANNES DE LA MATRICE CARTILAGINEUSE

INTRODUCTION

Le cartilage doit ses propriétés fondamentales, résistance à la traction et élasticité, aux macromolécules qui constituent la matrice extracellulaire: le collagène de type II et les protéoglycannes. Les protéoglycannes résultent de l'association covalente d'un squelette protéique avec des chaînes de glycosaminoglycannes (HASCALL et HASCALL, 1981) : chondroïtine sulfate (Planche XVII, Fig. 1), sulfate de kératane (Planche XVII, Fig. 2). Le noyau protéique du protéoglycanne peut être divisé en trois régions distinctes en fonction des variations qualitatives et quantitatives des glycosaminoglycannes auxquels il est lié :

1 - Une région étendue, située à une extrémité de la protéine, portant de nombreuses chaînes de chondroïtine sulfate (Planche XVIII, Fig. 1 a).

2 - A l'autre extrémité, une région globulaire, pratiquement exempte de chaînes de glycosaminoglycannes mais portant des N-oligosaccharides (Planche XVIII, Fig. 2) et possédant un site de fixation non covalente, hautement spécifique pour l'acide hyaluronique (Planche XVII, Fig. 3).

3 - Une région intermédiaire, où se greffent des chaînes de sulfate de kératane et des O-oligosaccharides (Planche XVIII, Fig. 1 b).

Les molécules monomériques de protéoglycannes (quelques centaines de milliers à 4 millions de daltons) s'associent à l'acide hyaluronique pour constituer des agrégats dont le poids moléculaire peut atteindre 100 millions de daltons (Planche XIX). Ces complexes multimoléculaires sont stabilisés par la présence de petites protéines de liaison qui consolident l'association. La formation de ce complexe ternaire stable est cruciale pour la rétention des protéoglycannes dans les tissus car les sous-unités libres peuvent diffuser hors de la matrice. La biosynthèse des protéoglycannes a donc lieu en deux temps: une phase intracellulaire au cours de laquelle le monomère est constitué, et une phase extracellulaire au cours de laquelle les monomères sécrétés interagissent avec l'acide

PLANCHE XVII : Unités disaccharidiques répétitives constituant les glycosaminoglycannes du cartilage.

FIG. 1

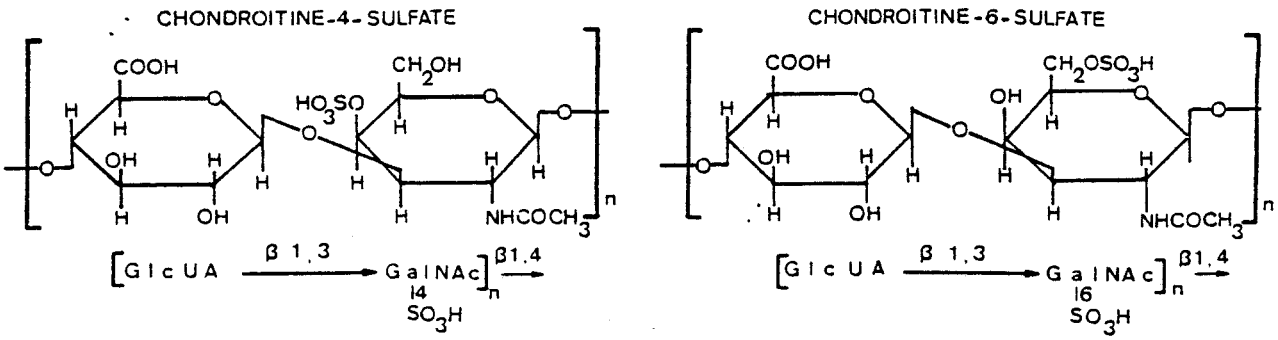


FIG. 2

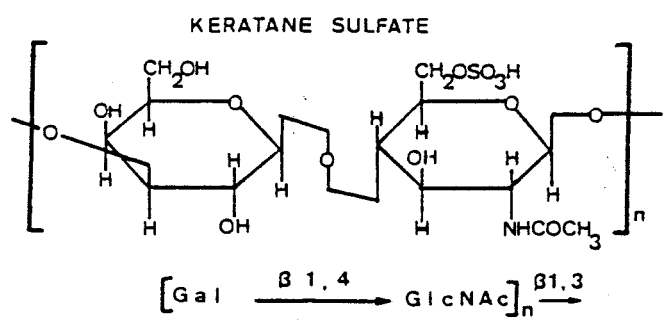
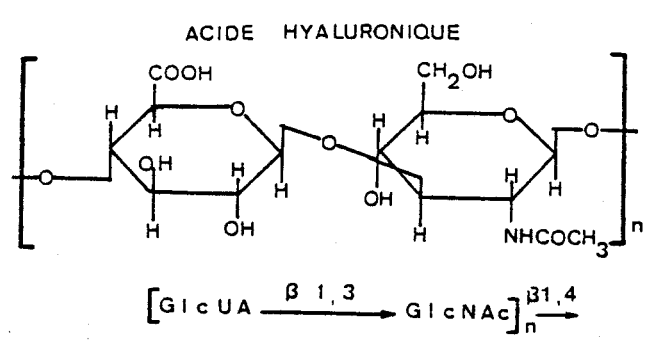


FIG. 3



et le noyau protéique des protéoglycannes (d'après CAPLAN, 1984).

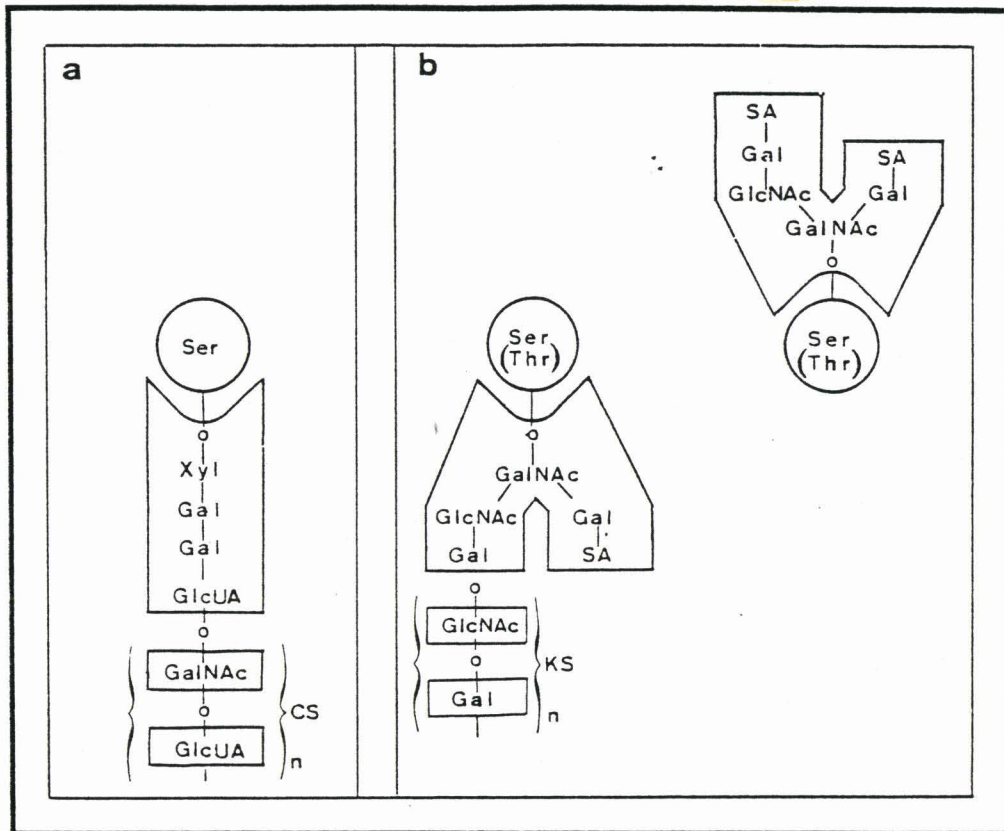


FIG. 1: O-oligosaccharide

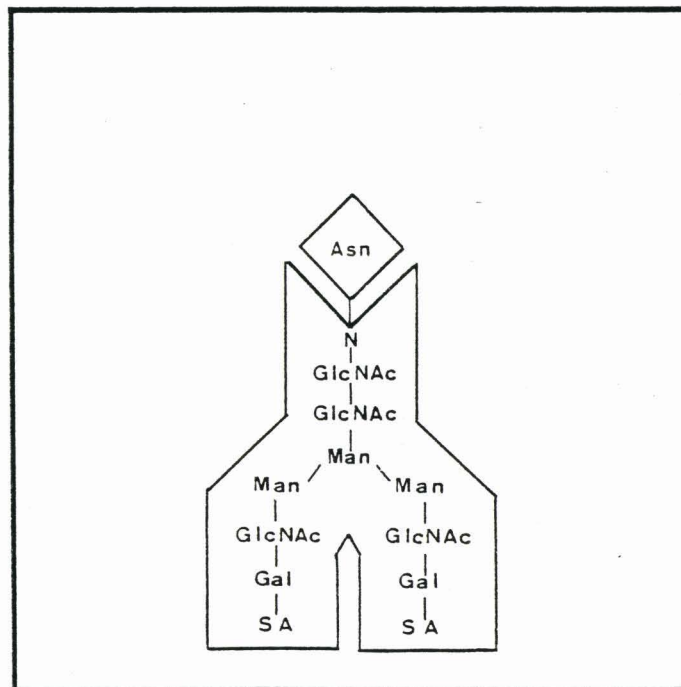
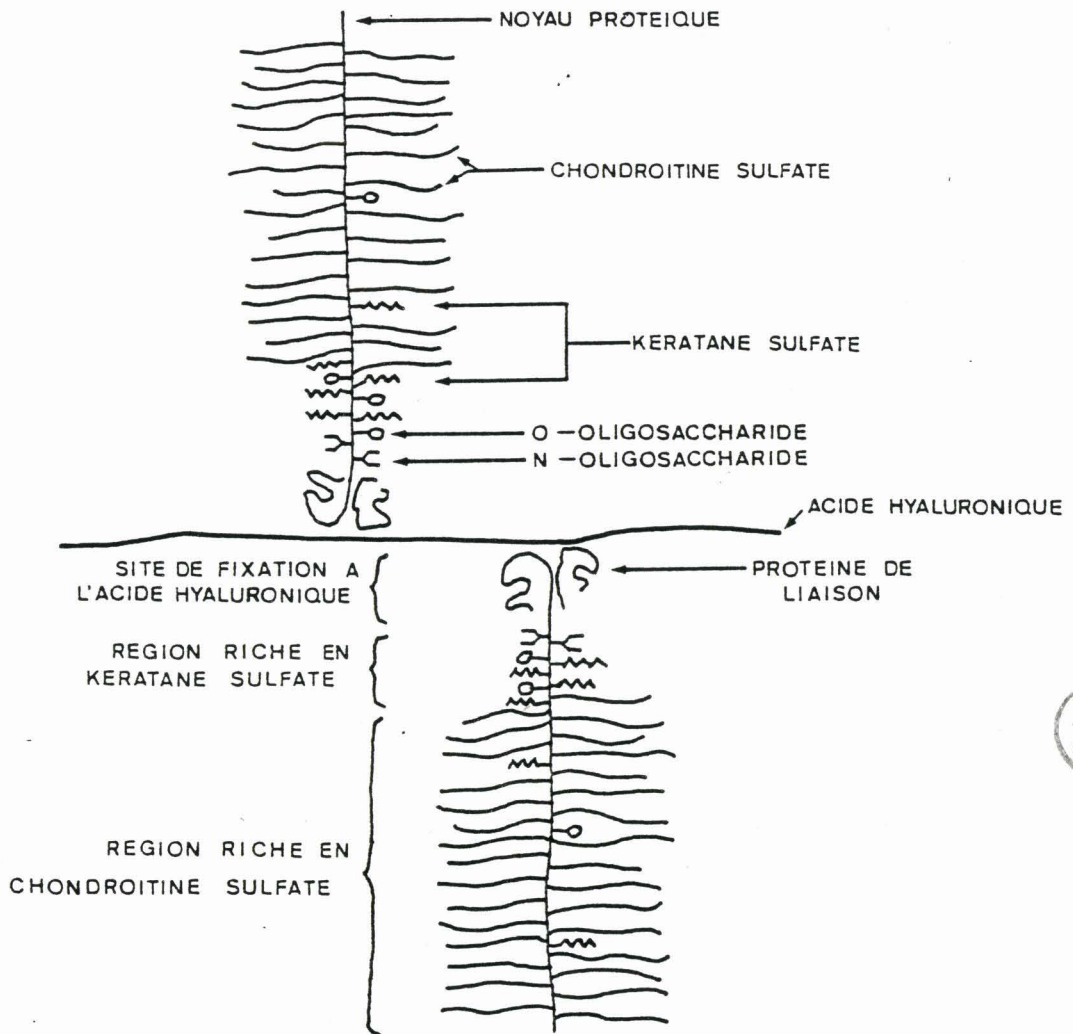


FIG. 2: N-oligosaccharide



- Asn ASPARAGINE
- Gal GALACTOSE
- GalNAc N-ACÉTYLGALACTOSAMINE
- GlcNAc N-ACÉTYLGLUCOSAMINE
- GlcUA ACIDE GLUCURONIQUE
- Man MANNOSE
- N ATOME D'AZOTE
- SA ACIDE SIALIQUE
- O ATOME D'OXYGÈNE
- Ser SÉRINE
- Xyl XYLOSE

PLANCHE XIX : Modèle schématique de la structure des protéoglycannes agrégés (d'après HASCALL et HASCALL, 1981).



hyaluronique et les protéines de liaison pour constituer les agrégats (DORFMAN, 1981 ; HANDLEY *et al.*, 1985).

L'étude de l'évolution de la structure des protéoglycannes au cours du vieillissement du cartilage a révélé que dans le membre embryonnaire de poulet, cultivé *in vitro*, la maturation des chondrocytes s'accompagne:

- d'une diminution de la taille des chaînes de chondroïtine sulfate,
- d'une diminution de la proportion de chondroïtine 6-sulfate et d'une augmentation de celle de chondroïtine 4-sulfate,
- d'une augmentation du nombre et de la taille des chaînes de sulfate de kératane
- d'une augmentation de la taille des monomères
- d'une augmentation de leur capacité à interagir avec l'acide hyaluronique
- d'une augmentation de la proportion de protéoglycannes agrégés par rapport à celle des monomères (HASCALL *et al.*, 1976 ; DE LUCA *et al.*, 1977 ; OVADIA *et al.*, 1980).

Dans les chapitres précédents, comme dans la plupart des travaux relatifs à la chondrogenèse, nous avons considéré que le sulfate radioactif fourni aux cultures était incorporé dans les glycosaminoglycannes de la matrice cartilagineuse. L'accumulation du précurseur dans les glycosaminoglycannes a été directement assimilée à l'activité chondrogène des explants. En effet, les examens cytochimiques montrent en général que l'incorporation de sulfate radioactif coïncide avec l'apparition d'une matrice cartilagineuse. Cependant, la corrélation entre données histologiques et mesures d'incorporation n'est pas toujours évidente. Par conséquent, le précurseur pourrait aussi être incorporé dans des glycosaminoglycannes non spécifiques de cette matrice. D'autre part, comme l'ont signalé SPEIGHT *et al.* (1981), il se pourrait que l'augmentation de l'incorporation de sulfate soit due à une hypersulfatation des chondroïtines sous l'action du dbAMPc et notamment à l'apparition d'un disulfate en positions 4 et 6. Il nous est donc apparu nécessaire de compléter notre travail par l'étude des modifications de la taille des protéoglycannes monomères ainsi que par l'étude des variations de la proportion d'agrégats.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Des bourgeons de membres antérieurs de stade 17, intacts ou dénudés, traités ou non au dbAMPc sont maintenus en culture pendant une durée de 3 jours. Le traitement au dbAMPc débute 24 h. après la mise en culture et se termine 48 h. plus tard. Les explants sont incubés pendant les 3 jours de culture dans un milieu contenant 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de sulfate de sodium ($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, New England Nuclear, activité spécifique 500 mCi/mM.). Les protéoglycannes extraits des cultures en conditions dissociantes (Gu HCl 4 M) sont fractionnés selon leur taille sur des colonnes de Sépharose 2B soit directement, en conditions dissociantes, soit en conditions associatives après dialyse (acétate de sodium 0,5 M). La radioactivité contenue dans chaque fraction est mesurée par comptage en scintillation liquide. Un nombre égal de bourgeons a été utilisé dans chaque condition expérimentale : bourgeons intacts ou dénudés, témoins ou traités.

RESULTATS

Les profils d'élution des différents extraits obtenus après fractionnement des protéoglycannes par chromatographie sur Sépharose 2 B sont représentés Planche XX (conditions dissociantes : Fig. 1 et 2 ; conditions associatives : Fig. 3 et 4). Les données chiffrées relatives à ces profils sont regroupées dans le tableau 11.

I. - CONDITIONS DISSOCIANTES (Gu HCl 4 M)

Qu'il s'agisse des extraits provenant des bourgeons de membres intacts ou dénudés, traités ou non au dbAMPc, les chromatogrammes obtenus en conditions dissociantes présentent tous 2 pics d'élution. L'un de ces pics, caractérisé par un K_{av} égal à 0,96, est présent sur tous les profils (Planche XX, Fig. 1 et 2). Le matériel élué dans ce pic est éliminé après dialyse des extraits contre l'acétate de sodium 0,5 M dans des membranes laissant passer les molécules dont le poids n'excède pas 3500 daltons et représente le sulfate libre présent dans l'extrait (CARRINO *et al.* , 1983).

PLANCHE XX : Profils d'élution des protéoglycannes fractionnés sur Sépharose 2B.

- Conditions dissociantes (Gu HCl 4 M) : Figures 1 et 2.
- Conditions associatives (acétate de sodium 0.5 M) : Figures 3 et 4.

et le noyau protéique des protéoglycannes (d'après CAPLAN, 1984).

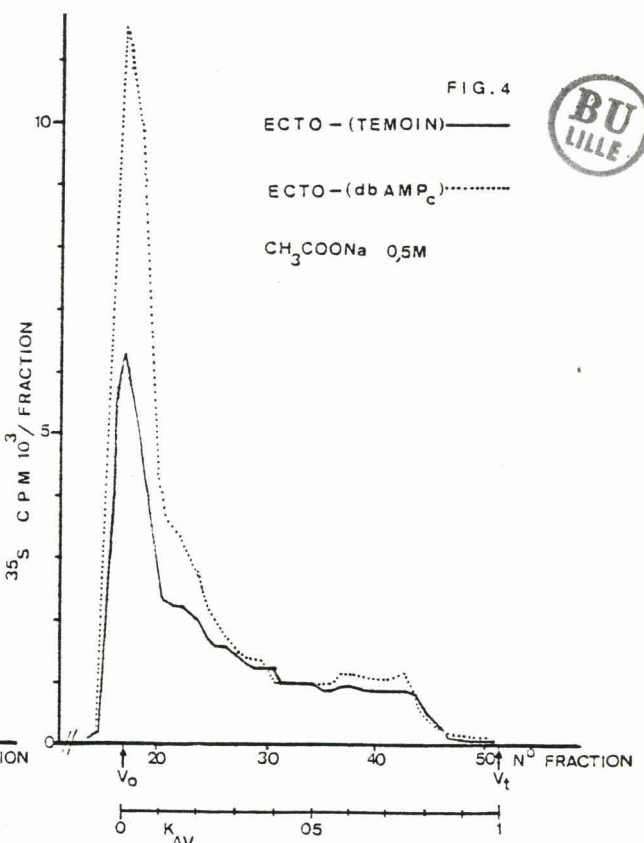
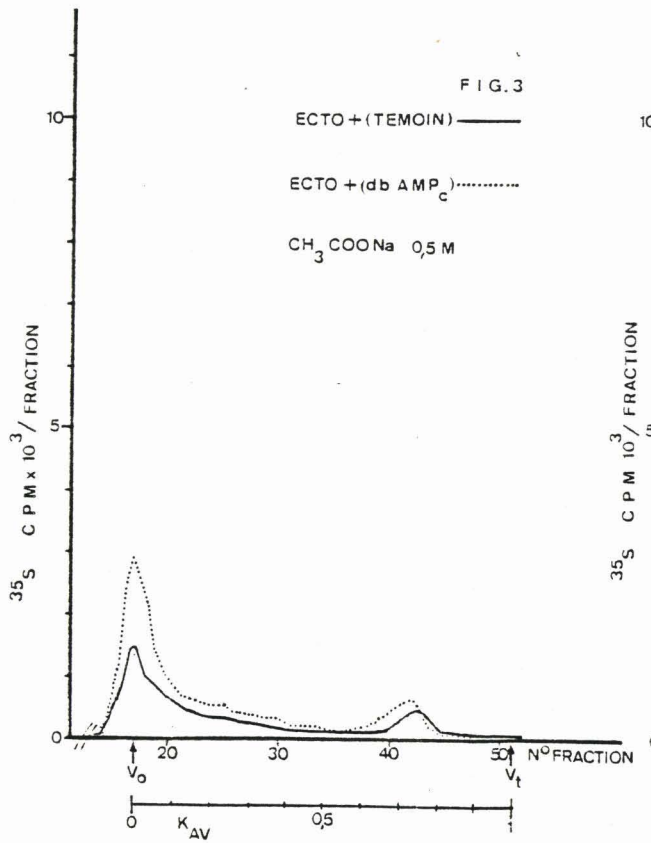
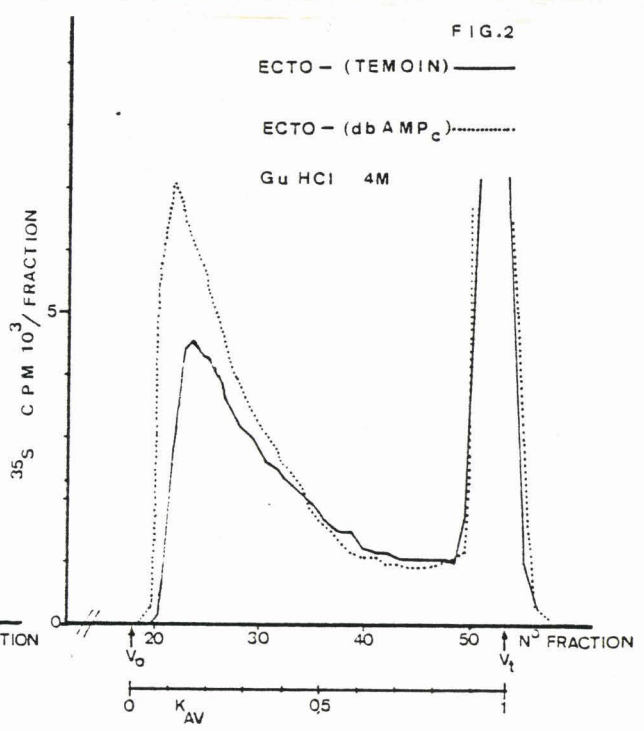
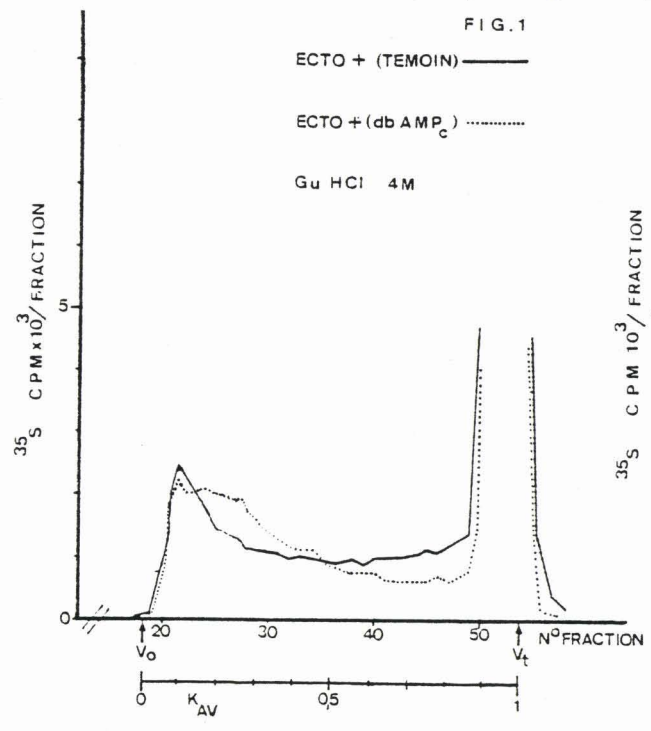


Tableau 11

	INFLUENCE DE L'ECTODERME		INFLUENCE DU dbAMPc	
	B. Antérieurs "Ecto +"	B. Antérieurs "Ecto -"	B. Antérieurs "Ecto +"	B. Antérieurs "Ecto -"
Taille des monomères "spécifiques du cartilage"	Kav = 0,11 Fractions 19 à 25	Kav = 0,16 Fractions 21 à 27	0,11 ≤ Kav ≤ 0,27 Fractions 19 à 28	0,11 Fractions 19 à 25
Proportion des monomères "spécifiques du cartilage"	37 %	32 %	45 %	31 %
Pourcentage d'agrégats (fractions 14 à 20)	31 %	39 %	43 %	45 %
Pourcentage des monomères "ubiquistes" (fractions 40 à 45)	17 %	7 %	15 %	5 %



L'autre pic, quant à lui, est caractéristique de chacun des extraits.

Dans le cas des bourgeons de membres intacts, non traités au dbAMPc (Planche XX, Fig. 1), ce pic caractérisé par un K_{av} égal à 0,11 représente 37% du matériel marqué non dialysable (Tableau 11). Il correspond à des protéoglycannes de très grande taille. Le reste de la radioactivité représente des protéoglycannes de taille très hétérogène répartis sur l'ensemble de la colonne.

Le profil d'élution de l'extrait de bourgeons dénudés, non traités au dbAMPc, diffère de celui de leurs homologues intacts par le fait que le premier pic, correspondant à 32% du matériel non dialysable, est légèrement décalé vers un K_{av} égal à 0,16 (Planche XX, Fig.2). Cette fois encore, le matériel élué du reste de la colonne est de taille très hétérogène.

Si les cultures de bourgeons de membres intacts subissent un traitement au dbAMPc, le chromatogramme présente un large pic d'élution dont le K_{av} est compris entre 0,11 et 0,27 (Planche XX, Fig. 1). La quantité de matériel éluée dans ce pic représente 45 % du matériel non dialysable (Tableau 11). Le reste du matériel élué est de taille très hétérogène.

Enfin, un traitement au dbAMPc appliqué à des bourgeons de membres dénudés se traduit par rapport au profil d'élution des bourgeons dénudés non traités par un décalage du premier pic vers un K_{av} légèrement inférieur égal à 0,11 (Planche XX, Fig.2). Le pourcentage de matériel élué dans ce pic correspond à 31% de la radioactivité non dialysable (Tableau 11).

L'élimination de l'ectoderme semble coïncider avec une légère diminution de la taille des protéoglycannes les plus grands (leur K_{av} augmente de la valeur 0,11 à la valeur 0,16). Le traitement des bourgeons intacts par le dbAMPc se traduit quant à lui par un élargissement important du pic d'élution des protéoglycannes les plus grands jusqu'à des valeurs de $K_{av} = 0,27$. Sur les bourgeons dénudés, le dbAMPc provoque une légère augmentation de la taille des protéoglycannes les plus grands dont le K_{av} passe de la valeur 0,16 à la valeur 0,11

II.- CONDITIONS ASSOCIATIVES (ACETATE DE SODIUM 0,5 M)

Dans l'extrait de bourgeons intacts non traités au dbAMPc, la fraction exclue sur Sépharose 2B correspondant aux agrégats, représente 31% de la radioactivité éluée de la colonne (Tableau 11).

Les 69% restants sont représentés par des molécules de taille hétérogène distribués tout le long de la colonne, mais dont le K_{av} n'excède pas la valeur de 0,8. Le quart de ce matériel (17%) est représenté par une population de monomères de petite taille caractérisés par un K_{av} égal à 0,75 (Planche XX, Fig 3).

En absence d'ectoderme, le pourcentage de molécules exclues de la colonne est égal à 39 % (Tableau 11). L'hétérogénéité du matériel retenu sur la colonne est encore plus marquée que dans le cas des explants couverts d'ectoderme. Les petits monomères élués avec un K_{av} égal à 0,75 ne s'individualisent plus (Planche XX, Fig. 4).

Lorsque les cultures de bourgeons intacts subissent un traitement au dbAMPc, le pourcentage d'agrégats atteint la valeur de 43%. Le traitement semble avoir peu d'effet sur la taille ($K_{av} = 0,73$) et la proportion (15%) des petits monomères présents dans les cultures non traitées bien que leur synthèse globale semble légèrement stimulée (Planche XX, Fig. 3 ; Tableau 11).

Le traitement au dbAMPc des cultures de bourgeons dénudés provoque une augmentation de la proportion d'agrégats (Planche XX, Fig. 4). Ils représentent 45% de la totalité du matériel au lieu de 39% en absence de nucléotide (Tableau 11). Le matériel retenu sur la colonne est toujours de taille très hétérogène. Alors qu'ils représentent une population bien distincte à côté des agrégats dans les bourgeons intacts (Planche XX, Fig. 3), les petits monomères, dont le K_{av} est compris entre 0,73 et 0,75, ne constituent plus une population individualisée dans les explants dénudés traités au dbAMPc et ne représentent plus que 5 % du matériel (Planche XX, Fig. 4).

L'élimination expérimentale de l'ectoderme et la présence de dbAMPc provoquent une augmentation de l'incorporation de sulfate et une augmentation du pourcentage d'agrégats présents dans les cultures. A côté de ces agrégats, les bourgeons intacts, traités ou non au dbAMPc, présentent une population distincte de molécules caractérisée par un K_{av} de l'ordre de 0,75. Au contraire, dans les explants dénudés, cette population ne s'individualise plus sur le chromatogramme, que les bourgeons soient traités ou non.

DISCUSSION

Dans la présente étude, nous avons montré que les protéoglycannes, extraits en conditions dissociantes à partir de cultures de bourgeons antérieurs intacts de membres de souris de stade 17, sont des molécules de taille hétérogène présentant toutefois une population prépondérante de très grande taille correspondant à 37% du matériel et caractérisée par un Kav égal à 0,11. En conditions associatives, 31% des protéoglycannes sont présents sous la forme d'agrégats. A côté de ces complexes multimoléculaires, le quart du matériel restant est représenté par de petits monomères caractérisés par un Kav (0,75) dont la valeur rappelle celle des monomères dits "ubiquistes" (VASAN et MILLER, 1985). Les monomères ubiquistes ne sont pas spécifiques du cartilage. Ils sont présents en grande quantité dans les tissus embryonnaires précoces, notamment au niveau des somites et du mésenchyme préchondrogène de bourgeons de membres où leur proportion diminue au fur et à mesure de l'expression du phénotype cartilagineux (GOETINCK *et al.*, 1974 ; ROYAL et GOETINCK, 1977 ; VASAN et LASH, 1979 ; OVADIA *et al.*, 1980 ; VASAN, 1982 ; CARRINO *et al.*, 1983).

En absence d'ectoderme, la taille des plus grands monomères extraits des cultures en conditions dissociantes, est légèrement inférieure à celle des molécules produites lorsque l'ectoderme est présent. Leur Kav a une valeur de 0,16 au lieu de la valeur 0,11. Ceci pourrait en fait traduire le léger retard dans la chondrogenèse des bourgeons dénudés mis en évidence à l'examen histologique. En effet, ces explants sont constitués, à l'issue des 3 jours de culture, d'un massif de cellules entourées d'une matrice épaisse colorable au bleu Alcian, mais ces cellules n'atteignent que rarement le stade de chondrocytes hypertrophiés observé couramment dans les explants couverts d'ectoderme (DESBIENS *et al.*, 1985). Néanmoins la proportion d'agrégats, recueillie après dialyse contre l'acétate de sodium, augmente de 31 % à 39 % ce qui montre que ces monomères, bien que légèrement moins grands, sont capables de s'agréger. D'autre part, les monomères ubiquistes ne s'individualisent plus, masqués semble-t-il par une quantité importante de molécules nouvelles de taille intermédiaire. En proportion, la famille de monomères dont le Kav est de 0,75 ne représente plus que 7 % de la totalité de l'extrait. Or l'examen microscopique des

bourgeons dénudés révèle qu'ils contiennent peu de cellules mésenchymateuses en fin de culture (DESBIENS *et al.*, 1985). L'ectoderme est en partie responsable du maintien d'une population cellulaire indifférenciée abondante dans les cultures de bourgeons intacts (KOSHER *et al.*, 1979 a ; SOLURSH *et al.*, 1981 b ; SOLURSH, 1984 b). Ces monomères ubiquistes pourraient donc être synthétisées par le mésoderme indifférencié, néanmoins nous ne pouvons exclure la possibilité que la couverture ectodermique elle-même participe à la synthèse de ces molécules.

DE LUCA *et al.* (1977) ont décrit les propriétés physicochimiques des protéoglycannes produits par des cellules de mésenchyme de membre de poulet de stade 23-24 cultivées 21 jours *in vitro*. Après 3 jours de culture, les premiers nodules cartilagineux apparaissent. Les protéoglycannes extraits de ces cultures sont caractérisés par un K_{av} compris entre 0,26 et 0,33 tandis que la proportion d'agrégats, trop faible et trop variable n'a pas été analysée. Après 8 jours de culture, l'ensemble de la boîte de culture est recouvert de nodules cartilagineux constitués de chondrocytes typiques entourés d'une matrice cartilagineuse. Les protéoglycannes sont alors de plus grande taille ($K_{av} = 0,24$) et les agrégats atteignent la proportion de 37%. La chondrogenèse, dans ces cultures, semble donc s'installer moins rapidement que dans les cultures organotypiques de bourgeons de membres de souris, bien que ces dernières soient établies à partir de bourgeons de stade plus précoce. Cette différence provient vraisemblablement de la faible densité à laquelle les cellules de mésenchyme de membre de poulet ont été mises en culture (50×10^6 cellules sur une boîte de Pétri de 100 mm de diamètre).

Quoi qu'il en soit, l'augmentation du pourcentage de molécules agrégées et la diminution de la proportion de petits monomères, observées dans les bourgeons dénudés, confirment l'effet inhibiteur de l'ectoderme sur la chondrogenèse.

En ce qui concerne le traitement au dbAMPc, les résultats ont montré que lorsque les bourgeons sont couverts d'ectoderme, la présence du nucléotide provoque une augmentation de la proportion de molécules dont le K_{av} est compris entre 0,11 et 0,27. Ces molécules pourraient provenir de la dégradation des plus grands protéoglycannes, dont le K_{av} est égal à 0,11. Cependant, il paraît plus probable qu'elles soient le résultat d'une néosynthèse puisque nous avons montré antérieurement que le dbAMPc provoque une augmentation globale de l'incorporation de

sulfate radioactif dans ce type de bourgeons (Chapître I). Néanmoins, SPEIGHT et al. (1981) ont montré que, dans des cultures de chondrocytes articulaires de veau foetal traitées pendant 4 heures avec 1mM de dbAMPc, cette augmentation d'incorporation de sulfate provient d'une augmentation du degré de sulfatation des glycosaminoglycannes: il apparaît dans ces cultures un chondroïtine sulfate hypersulfaté contenant de la N-acétylgalactosamine-4-6 disulfate. Dans ce type de culture, les protéoglycannes fractionnés sur Sépharose CL 2B, ont des profils d'élution identiques, que les cultures aient été ou non incubées en présence de dbAMPc. Dans notre étude, il faudrait envisager, puisque les chromatogrammes obtenus en présence ou non de dbAMPc sont différents, que si elle a lieu, l'hypersulfatation touche différemment les populations de protéoglycannes, ce qui semble à priori peu probable. Dans le contexte général de notre travail, nous pensons plutôt que les molécules, dont le K_{av} est compris entre 0,11 et 0,27, pourraient provenir d'une nouvelle génération de chondrocytes: en effet, nous avons émis l'hypothèse que le traitement de mésoderme jeune par le dbAMPc pouvait être suivi d'un recrutement cellulaire et de la différenciation cartilagineuse de cellules initialement non chondrogènes conduisant à l'augmentation générale de l'incorporation du sulfate dans les glycosaminoglycannes.

En conditions associatives, la proportion d'agrégats augmente dans les bourgeons traités ce qui confirme le rôle activateur du nucléotide. Parallèlement, le dbAMPc a peu d'effet sur la taille et la proportion des monomères ubiquistes, observation en accord avec les travaux de HIRAKI *et al.*, (1985). Comme l'a révélé notre étude histologique, il reste une quantité importante de cellules indifférenciées dans la partie distale des explants de stade 17 traités au dbAMPc (Planche IV, Fig. 8) et il est vraisemblable que ces cellules soient responsables de la production des 15% de monomères recueillis.

Dans les bourgeons dénudés, le dbAMPc provoque une légère augmentation de la taille des protéoglycannes cartilagineux mais ne provoque pas, comme dans les explants couverts d'ectoderme, l'augmentation de la proportion d'une population particulière de monomères. Tout se passe comme si les cellules chondrogènes évoluaient de façon synchrone et à un rythme soutenu puisque les monomères sont légèrement plus grands que dans les apex dénudés témoins. Nous avons évoqué précédemment un retard possible dans la différenciation des explants dénudés non

traités par rapport à leurs homologues intacts. Dans les explants traités, le début des synthèses pourrait coïncider avec l'application du nucléotide. L'étude histologique de ce type d'explant révèle la présence de "nappes" cartilagineuses où tous les chondrocytes paraissent avoir atteint le même état de maturité. HIRAKI *et al.* (1985) ont montré, sur des cultures de chondrocytes établies à partir de côtes de jeunes lapins traitées par le dbAMPc (0,5mM pendant 4 jours), que la taille des monomères spécifiques du cartilage augmentait. Parallèlement, nos résultats montrent que le dbAMPc augmente la proportion d'agrégats.

L'ensemble de nos résultats montrent que le sulfate radioactif fourni aux explants a bien été incorporé en grande majorité dans les protéoglycannes spécifiques du cartilage et que l'élimination expérimentale de l'ectoderme et la présence de dbAMPc provoquent une augmentation de la proportion d'agrégats produits par les cultures, ce qui confirme leur effet stimulateur sur la chondrogenèse des bourgeons de ce stade. Nous avons tenté d'établir des corrélations entre nos résultats histologiques et nos résultats biochimiques. Pour être totalement crédibles, les hypothèses avancées devront trouver une confirmation dans l'étude des protéoglycannes produits par des bourgeons plus âgés dont le comportement a été décrit antérieurement. Enfin, il serait intéressant de compléter notre étude par une analyse des isomères de chondroïtine sulfate (SAITO *et al.*, 1968) afin de savoir si dans notre système l'incorporation de sulfate consécutive à l'addition de dbAMPc provient effectivement d'une activation des synthèses ou d'un processus d'hypersulfatation. Des investigations destinées à mettre en évidence d'éventuelles modifications de la taille et du nombre des chaînes de glycosaminoglycannes entrant dans la constitution des protéoglycannes pourront également être envisagées.

CONCLUSION GENERALE

Les résultats obtenus dans la présente étude soulignent l'existence de l'antagonisme entre les effets respectifs de l'ectoderme et du dbAMPc sur la chondrogenèse *in vitro* du mésoderme de jeunes bourgeons de membres : l'ectoderme est indispensable à la morphogenèse squelettique mais ralentit la différenciation cartilagineuse alors que le dbAMPc stimule la chondrogenèse et freine la croissance des bourgeons de membres.

Par ailleurs, les résultats montrent que le dbAMPc affecte la chondrogenèse en fonction du stade de développement auquel l'ébauche est parvenue au moment du traitement . Le nucléotide, tout d'abord activateur de la différenciation cartilagineuse (stades 17 et 19) devient inhibiteur au fur et à mesure du vieillissement du bourgeon de membre (stade 20). De plus, au cours d'un séjour *in vitro* , la position des zones sensibles au dbAMPc et la réactivité des cellules varient au cours du temps.

D'après les résultats obtenus, différentes hypothèses essayant d'expliquer les effets tantôt activateur, tantôt inhibiteur, du dbAMPc sur la chondrogenèse ont pu être émises :

- une transformation de cellules non chondrogènes en cellules chondrogènes
- une stimulation du dépôt de matrice cartilagineuse par les chondrocytes matures en place
- une dégénérescence cellulaire
- un blocage de l'évolution de certains jeunes chondroblastes.

Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour essayer de préciser les parts respectives revenant à ces quatre processus. En outre, pour chacune de ces propositions, un certain nombre de problèmes restent posés tels que :

- définir l'origine des cellules recrutées sous l'effet du dbAMPc pour former du cartilage : lignée myogène ou lignée conjonctive
- préciser le devenir des cellules n'incorporant pas de BrdU en présence de dbAMPc : dégénérescence cellulaire ou engagement vers la chondrogenèse.
- déterminer la nature de l'inhibition de la différenciation cartilagineuse observée au stade 20 sous l'effet du dbAMPc. S'agit-il d'un effet ayant pour cible spécifique les jeunes chondroblastes de stade 20 ou bien tout jeune chondroblaste passe-t-il par une telle phase de

sensibilité au dbAMPc ?

Ces différents points devront faire l'objet d'investigations ultérieures.

En dernier lieu, cette étude a montré que l'élimination de l'ectoderme et la présence de dbAMPc sont des conditions expérimentales qui provoquent une augmentation de la proportion des agrégats de protéoglycannes, témoin de l'expression du phénotype cartilagineux. Nous envisageons de mener une étude plus poussée destinée à mettre en évidence les modifications éventuelles de la nature, de la proportion et de la taille des chaînes des différents types de glycosaminoglycannes apparus en présence de l'ectoderme et sous l'effet du dbAMPc.

Les résultats des études menées *in vivo* tendent à montrer que la phase d'agrégation des cellules mésodermiques précède et permet l'augmentation du taux intracellulaire d'AMPc responsable du déclenchement de la chondrogenèse. Par ailleurs, *in vitro*, en culture de cellules mésodermiques à faible densité, l'AMPc peut provoquer la chondrogenèse en l'absence d'agrégation. Dans nos cultures toutefois, la plupart des zones sensibles à l'effet d'une addition de dbAMPc passent par une phase de condensation cellulaire. On peut supposer que dans nos conditions, l'AMPc déterminerait cette condensation cellulaire qui permettrait la chondrogenèse et qu'une telle action interviendrait aussi *in vivo*.

BIBLIOGRAPHIE

- ABBOTT J., MAYNE R., HOLTZER H. (1972). Inhibition of cartilage development in organ cultures of chick somites by the thymidine analog, 5-Bromo-2'-deoxyuridine. *Dev. Biol.* 28, 430-442.
- AGNISH N.D., KOCHHAR D.M. (1977). The role of somites in the growth and early development of mouse limb buds. *Dev. Biol.* 56, 174-183.
- AHRENS P.B., SOLURSH M., REITER R.S. (1977). Stage related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev. Biol.* 50, 69-82.
- ARCHER C.W., ROONEY P., WOLPERT L. (1982). Cell shape and cartilage differentiation of early chick limb bud cells in culture. *Cell Diff.* 11, 245-251.
- BRAND B., CHRIST B., JACOB H.J. (1985). An experimental analysis of the developmental capacities of distal parts of avian leg buds. *Amer. J. Anat.* 173, 321-340.
- BRUNK C.F., JONES K.C., JAMES T.W. (1979). Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal. Biochem.* 92, 497-500.
- CAPLAN A.I. (1984). Le cartilage 104-113 ; *Pour la Science*, Décembre 1984.
- 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.
- CARRINO D.A., LENNON D.P., CAPLAN A.I. (1983). Extracellular matrix and the maintenance of the differentiated state : Proteoglycans synthesized by replated chondrocytes and nonchondrocytes. *Dev. Biol.* 99, 132-144.
- COLEMAN A.W., COLEMAN J.R., KANKEL D., WERNER I. (1970). The reversible control of animal cell differentiation by the thymidine analog, 5-bromodeoxyuridine. *Exp. Cell Res.* 59, 319-328.
- COPRAY J.C.V.M., JANSEN H.W.B. (1985). Cyclic nucleotides and growth regulation of the mandibular condylar cartilage of the rat *in vitro*. *Archs. Oral Biol.* 30, 749-752.

- DE LUCA S., HEINEGARD D., HASCALL V.C., KIMURA J.H., CAPLAN A.I. (1977). Chemical and physical changes in proteoglycans during development of chick limb bud chondrocytes grown *in vitro*, J. Biol. Chem. 252, 6600-6608.
- DESBIENS X. (1983). Etude expérimentale de l'effet de l'ectoderme sur la chondrification du mésoderme du membre embryonnaire de souris *in vitro*. Résultats d'une étude histologique. C.R. Acad. Sci. 296, 593-596.
- DESBIENS X., CARETTE F., MEUNIER L., BART A. (1985). Chondrogenèse dans le bourgeon de membre de souris *in vitro*. Effet de l'ectoderme. Biol. of the Cell 55, 113-124.
- DORFMAN A. (1981). Proteoglycan biosynthesis. Dans : E.D. HAY (Ed), Cell biology of extracellular matrix, 115-138, Plenum Press, New-York.
- DREZNER M.K., NEELON F.A., LEOVITZ H.E. (1976). Stimulation of cartilage macromolecule synthesis by adenosine 3'5' monophosphate. Biochim. Biophys. Acta 425, 521-531.
- ELMER A.W. (1982). Developmental cues in limb bud chondrogenesis. Collagen Rel. Res. 2, 257-279.
- FORET J.E., BABICH G.L. (1973). Effects of dibutyryl cyclic AMP and related compounds on newt limb regeneration blastemas *in vitro*. I. ³H-thymidine incorporation. Oncologie 88, 83-88.
- GAY S.W., KOSHER R.A. (1984). Uniform cartilage differentiation in micromass cultures prepared from a relatively homogeneous population of chondrogenic progenitor cells of the chick limb bud : effect of prostaglandins. J. Exp. Zool. 232, 317-326.
- GEORGE M., CHEPENIK P.K., SCHNEIDERMAN M.M. (1983). Proliferation of cells undergoing chondrogenesis *in vitro*. Differentiation 24, 245-249.
- GOETINCK P.F., PENNYPACKER J.P., ROYAL P.D. (1974). Proteochondroitin sulfate synthesis and chondrogenic expression Exp. Cell Res. 87, 241-248.

- GUMPEL-PINOT M. (1982). Differentiation du cartilage dans le membre de l'embryon de poulet. Observations ultrastructurales et expériences de culture et de greffe. Arch. Anat. Microsc. Morph. Exp. 71, 241-256.
- HAMBURGER V., HAMILTON H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morph. 88, 49-92.
- HANDLEY C.J., LOWTHER D.A., Mc QUILLAN D.J. (1985). The structure and synthesis of proteoglycans of articular cartilage, Cell Biol. Intern. Reports 9, 753-782.
- HASCALL V.C., OEGEMA T.R., BROWN M. (1976). Isolation and characterization of proteoglycans from chick limb bud chondrocytes grown *in vitro*. J. Biol. Chem. 251, 3511-3519.
- HASCALL V.C., HASCALL G.K. (1981). Proteoglycans. Dans : E.D. HAY (Ed), Cell biology of extracellular matrix, 39-63. Plenum Press, New-York.
- HASCALL V.C., KIMURA J.H. (1982). Proteoglycans : Isolation and characterization. Dans : L.W. CUNNINGHAM, D.W. FREDERIKSEN (Ed), Methods in Enzymology, 82, 769-800, Academic Press, Inc.
- HATTORI T., IDE H. (1985). Effect of cyclic AMP on limb bud chondrogenesis in low density culture. Exp. Cell Res. 157, 371-378.
- HERKEN R. (1975). Autoradiographic investigation with ^3H thymidine in limb bud cultures. Dans : NEUBERT D., MERKER H.J. (Ed.) , New approches to the evaluation of abnormal embryonic development.
- HIRAKI Y., YUTANI Y., FUKUYA M., TAKIGAWA M., SUZUKI F., 1985. Differentiation and de-differentiation of cultured chondrocytes : Increase in monomeric size of " cartilage specific "proteoglycans by dibutyryl cyclic AMP and complete inhibiton of their synthesis by retinoic acid. Biochem. International, 10, 267-272.
- HO P.L., LEVITT D., DORFMAN A. (1977). A radioimmune study of the effect of bromodeoxyuridine on the synthesis of proteoglycan by differentiating limb bud cultures. Dev. biol. 55, 233-243.

- HO W.C., GREENE R.M., SHANFELD J., DAVIDOVITCH Z. (1982). Cyclic nucleotides during chondrogenesis. Concentration and distribution *in vivo* and *in vitro*. J. Exp. Zool. 224, 321-330.
- Houben J.J.G. (1976). Aspects ultrastructuraux de la migration des cellules somitiques dans les bourgeons de membres postérieurs de souris. Arch. Biol. (Bruxelles) 87, 345-365.
- HURLE J.M., GAÑAN Y. (1986). Interdigital tissue chondrogenesis induced by surgical removal of the ectoderm in the embryonic chick leg bud. J. Embryol. exp. Morph. 94, 231-244.
- KIENY M., PAUTOU M.P., CHEVALLIER A. (1981). On the stability of the myogenic cell line in avian limb bud development. Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp. 70, 81-90.
- KNUDSON C.B., TOOLE B.P. (1985). Changes in the pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm. Dev. Biol. 112, 308-319.
- KOSHER R.A., SAVAGE M.P., CHAN S.C. (1979 a). *In vitro* studies on the morphogenesis and differentiation of the mesoderm subjacent to the apical ectodermal ridge of the embryonic chick limb bud. J. Embryol. Exp. Morph. 50, 75-97.
- KOSHER R.A., SAVAGE M.P., CHAN S.C. (1979 b). Cyclic AMP derivatives stimulate the chondrogenic differentiation of the mesoderm subjacent to the apical ectodermal ridge of the chick limb bud. J. Exp. Zool. 209, 221 - 228.
- KOSHER R.A., SAVAGE M.P. (1980). Studies on the possible role of cyclic AMP in limb morphogenesis and differentiation. J. Embryol. Exp. Morph. 56, 91-105.
- KOSHER R.A., SAVAGE M.P., WALKER K.H., (1981). A gradation of hyaluronate accumulation along the proxímodistal axis of the embryonic chick limb bud. J. Embryol. Exp. Morph. 63, 85-98.
- KOSHER R.A., SAVAGE M.P. (1981). Glycosaminoglycans synthesis by the apical ectodermal ridge of chick limb bud. Nature 291, 231-232.
- KOSHER R.A., WALKER K.H. (1983). The effect of prostaglandins on *in vitro* limb cartilage differentiation. Exp. Cell Res. 145, 145-153.

- KOSHER R.A., GAY S.W. (1985). The effect of prostaglandins on the cyclic AMP content of limb mesenchymal cells. *Cell Diff.* 17, 159-169.
- KUJAWA M.J., CAPLAN A.I. (1986). Hyaluronic acid bonded to cell-cultures surfaces stimulates chondrogenesis in stage 24 limb mesenchymal cell cultures. *Dev. Biol.* 114, 504-518.
- KUJAWA M.J., CARRINO D.A., CAPLAN A.I. (1986). Substrate-bonded hyaluronic acid exhibits a size dependent stimulation of chondrogenic differentiation of stage 24 limb mesenchymal cells in culture. *Dev. Biol.* 114, 519-528.
- LASHER R., CAHN R.D. (1969). The effects of 5-Bromodeoxyuridine on the differentiation of chondrocytes *in vitro*. *Dev. Biol.* 19, 415-435.
- LEV R., SPICER S.S. (1964). Specific staining of sulfate groups with Alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.* 12, 309.
- LEWIS J. (1977). Growth and determination in the developing limb. Dans : EDE D.A., HINCHLIFFE J.R., BALLS M. (Ed.), *Vertebrate limb and somite morphogenesis* 215-228. Cambridge University Press, Cambridge.
- MARKWELL M.A.K., HAAS S.M., BIEBER L.L., TOLBERT N.E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membranes and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87, 206-210.
- MATSUTANI E., KURODA Y. (1982). Effect of lectins on chondrogenesis of cultured quail limb bud cells. *Dev. Biol.* 89, 521-526.
- MATSUTANI E., YAMAGATTA T. (1982). Chick endogenous lectin enhances chondrogenesis of cultured chick limb bud cells. *Dev. Biol.* 92, 544-548.
- MERKER H.J., GÜNTHER Th. (1979). The influence of insulin, cAMP and calcium ionophore X 537 A on the growth of cartilage anlagen of limb buds *in vitro*. *Experientia* 35, 1307-1308.

- MILAIRE J., MULNARD J. (1968). Le rôle de l'épiblaste dans la chondrogenèse du bourgeon de membre chez la souris. *J. Embryol. Exp. Morph.* 20, 215-236.
- MILAIRE J. (1976 a). Rudimentation digitale au cours du développement normal de l'autopode chez les mammifères. Dans : Mécanismes de la rudimentation des organes chez les embryons de Vertébrés 221-231 Ed. du CNRS, Paris.
- MILAIRE J. (1976 b). Contribution cellulaire des somites à la genèse des bourgeons de membres postérieurs chez la souris. *Arch. Biol. (Bruxelles)* 87, 315-343.
- MILAIRE J., MULNARD J. (1984). Histogenic in 11 Day mouse embryo limb buds explanted in organ culture. *J. Exp. Zool.* 232, 359-377.
- MILLER R.P., HUSAIN M., LOHIN S. (1979). Long acting cAMP analogues enhance sulfate in corporation into matrix proteoglycans and suppress cell division of foetal rat chondrocytes in monolayers cultures. *J. Cell Physiol.* 100, 63-76.
- NATHANSON M.A., HAY E.D. (1980). Analysis of cartilage differentiation from skeletal muscle grown on bone matrix. *Dev. Biol.* 78, 301-331.
- NEWMAN S.A., PAUTOU M.P., KIENY M. (1981). The distal boundary of myogenic primordia in chimeric avian limb buds and its relation to an accessible population of cartilage progenitor cells. *Dev. Biol.* 84, 440-448.
- OSTER G.F., MURRAY J.D., MAINI P.K. (1985). A model for chondrogenic condensations in the developing limb : the role of extracellular matrix and cell tractions. *J. Embryol. Exp. Morph.* 89, 93-112.
- OVADIA M., PARKER C.H., LASH J.W. (1980). Changing patterns of proteoglycan synthesis during chondrogenic differentiation. *J. Embryol. Exp. Morph.* 56, 59-70.
- OWENS M.E., SOLURSH M. (1981). In vitro histogenic capacities of limb mesenchyme from various stage mouse embryos. *Dev. Biol.* 88, 297-311.
- PAWELEK J.M. (1969). Effects of thyroxine and low oxygen tension on chondrogenic expression in cell culture. *Dev. Biol.* 19, 52-72.

- ROYAL P.D., GOETINCK P.F. (1977). *In vitro* chondrogenesis in mouse limb mesenchymal cells ; changes in ultrastructure and proteoglycan synthesis, J. Embryol Exp. Morph. 39, 79-95.
- SAARNI H., TAMMI M. (1977). A rapid method for seraration and assay of radio labeled mucopolysaccharides from cell culture medium. Anal. Biochem. 81, 40-46.
- SAITO H., YAMAGATA T., SUZUKI S. (1968). Enzymatic methods for the determination of small quantities of isomeric chondroitin sulfates. J. Biol. Chem. 243, 1536-1542.
- SAUNDERS J.W. (1948). The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. J. Exp. Zool. 108, 363-403.
- SAUNDERS J.W., GASSELING M.T., ERRICK J.E. (1976). Inductive activity and enduring cellular constitution of a supernumerary apical ectodermal ridge grafted to the limb bud of the chick embryo. Dev. Biol. 50, 16-25.
- SEARLS R.L., SMITH A.A. (1982). Evidence that ectoderm influences the differentiation of muscle in the limb of the embryonic chick. J. Exp. Zool. 220, 343-351.
- SEARLS R.L. (1983). Evidence for inherent morphogenetic properties of myogenic regions of the embryonic chick wing J. Exp. Zool. 226, 59-73.
- SINGLEY C.T., SOLURSH M. (1981). The spatial distribution of hyaluronic acid and mesenchymal condensation in the embryonic chick wing. Dev. Biol. 84, 102-120.
- SOLURSH M., REITER R.S. (1975). Determination of limb bud chondrocytes during a transient block of the cell cycle. Cell Diff. 4, 131-137.
- SOLURSH M., REITER R.S., AHRENS P.B., PRATT R.M. (1979). Increase in level of cyclic AMP during avian limb chondrogenesis *in vitro*. Differentiation 15, 183-186.

- SOLURSH M., REITER R.S. AHRENS P.B., VERTEL B.M. (1981 a). Stage and position related changes in chondrogenic response of chick embryonic wing mesenchyme to treatment with dibutyryl cyclic AMP. *Dev. Biol.* 83, 9-19.
- SOLURSH M., SINGLEY C.T. REITER R.S. (1981 b). The influence of epithelia on cartilage and loose connective tissue formation by limb mesenchyme cultures. *Dev. Biol.* 86, 471-482.
- SOLURSH M., JENSEN K.L., SINGLEY C.T., LINSENMAYER T.F., REITER R.S. (1982). Two distinct regulatory steps in cartilage differentiation. *Dev. Biol.* 94, 311-325.
- SOLURSH M. (1984 a). Interactions during limb chondrogenesis *in vitro*. Dans R.L. TRELSTAD (Ed.), *The role of extracellular matrix in development*, 277-303, Alan R. Liss, Inc.
- SOLURSH M. (1984 b). Ectoderm as a determinant of early tissue pattern in the limb bud. *Cell Diff.* 15, 17-24.
- SPEIGHT G., HANDLEY C.J., LOWTHER D.A. (1981). Effect of dibutyryl cyclic AMP on the sulphation of proteoglycans by chondrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 672, 89-97.
- SUMMERBELL D., LEWIS J.H., WOLPERT L. (1973). Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* 244, 492-496.
- SUMMERBELL D., LEWIS J.H. (1975). Time, place and positional value in the chick limb bud. *J. Embryol. Exp. Morph.* 33, 621-643.
- SUMMERBELL D. (1976). A descriptive study of the rate of elongation and differentiation of the skeleton of the developing chick wing. *J. Embryol. Exp. Morph.* 35 : 241-260.
- SWALLA B.J., OWENS M.E., LINSENMAYER T.F., SOLURSH M. (1983). Two distinct classes of prechondrogenic cell types in the embryonic limb bud. *Dev. Biol.* 97, 59-69.
- SWALLA B.J., SOLURSH M. (1984). Inhibition of limb chondrogenesis by fibronectin. *Differentiation* 26, 42-48.

- THEILER K. (1972). The house mouse. Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New-York.
- THOROGOOD P.V., HINCHLIFFE J.R. (1975). An analysis of condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb J. Embryol. Exp. Morph. 33, 581-606.
- TOOLE B.P., GOLDBERG R.L., CHI-ROSSO G., UNDERHILL C.B. ORKIN R.W. (1984). Hyaluronate-cell interactions. Dans R.L. TRELSTAD (Ed.). The role of extracellular matrix in development, 43-66, Alan R. Liss, Inc., New-York.
- TROWELL O. (1954). A modified technique for organ culture *in vitro*. Exp. Cell Res. 6, 246-248.
- VASAN N.S., LASH J.W. (1979). Monomeric and aggregate proteoglycans in the chondrogenic differentiation of embryonic chick limb buds, J. Embryol. Exp. Morph. 49, 47-59.
- VASAN N.S. (1982). Analysis of the intermediate size proteoglycans from the developing chick limb buds. J. Embryol. Exp. Morph. 70, 61-74.
- VASAN N.S., MILLER E., (1985). Somite chondrogenesis by modified matrix- a biochemical and morphological study. Develop. Growth and Diff. 27, 405-417.
- WACHTLER F., CHRIST B., JACOB H.J. (1981). On the determination of mesodermal tissues in the avian embryonic wing bud. Anat. Embryol. 161, 283-290.
- WACHTLER F., CHRIST B., JACOB H.J. (1982). Grafting experiments on determination and migratory behaviour of presomitic and somatopleural cells in avian embryos. Anat. Embryol. 164, 369-378.
- ZANETTI N.C., SOLURSH M. (1984). Induction of chondrogenesis in limb mesenchymal cultures by disruption of actin cytoskeleton. J. Cell Biol. 99, 115-123.
- ZANETTI N.C., SOLURSH M. (1986). Epithelial effects on limb chondrogenesis involve extracellular matrix and cell shape. Dev. Biol. 113, 110-119.
- ZIMMERMANN B., THIES M. (1984). Alteration of lectin binding during chondrogenesis of mouse limb buds. Histochem. 81, 353-361.

ZWILLING E. (1956). Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo.

II. Experimental limb duplication. J. Exp. Zool. 132, 173-187.

ZWILLING E., HANSBOROUGH L. (1956). Interaction between limb bud ectoderm and

mesoderm in the chick embryo. III. Experiments with polydactylous limbs. J. Exp. Zool.

132, 219-239.

Le début de la morphogenèse des membres chez les Vertébrés Amniotes est caractérisé par la mise en place de bourgeons constitués d'un amas mésodermique recouvert d'une enveloppe ectodermique. Ce feuillet externe présente dans la région distale du bourgeon un épaississement antéro-postérieur : la crête apicale. Au cours de la croissance de ces bourgeons s'édifie un squelette embryonnaire cartilagineux issu des cellules mésodermiques. D'après les résultats des travaux effectués *in vivo* sur le poulet et la souris, un schéma récapitulatif des étapes conduisant à la chondrogenèse de certaines cellules du bourgeon de membre peut être décrit dans les termes suivants : la prolifération des cellules mésodermiques et la mise en place progressive des divers segments du membre requièrent la présence de la crête apicale. L'ectoderme et plus particulièrement la crête apicale influencent fortement le comportement des cellules mésenchymateuses sous jacentes. Ils semblent favoriser l'accumulation d'acide hyaluronique à la périphérie du bourgeon où les cellules sont isolées les unes des autres par d'importantes quantités d'une matrice extracellulaire sensible à la hyaluronidase. Quand on se rapproche du cœur du bourgeon, la quantité de matrice extracellulaire diminue et des zones de forte densité cellulaire apparaissent. Il est vraisemblable que des contacts privilégiés permettent alors l'échange de messages entre les cellules étroitement associées de ces amas. Ces interactions cellulaires sont une condition préalable nécessaire à l'initiation de la chondrogenèse car elles semblent être à l'origine de l'augmentation du taux intracellulaire d'AMPc indispensable au démarrage des synthèses des constituants de la matrice cartilagineuse.

Ces observations ont pu être en partie confirmées par une série de travaux effectués *in vitro* sur des embryons de poulet et de souris. Compte-tenu de l'importance du rôle joué par l'AMPc dans les processus d'induction et de stimulation de la chondrogenèse, nous avons étudié sur des cultures organotypiques de bourgeons de membres de souris traités au dibutyryl AMPc (dbAMPc).

1. L'antagonisme ectoderme-AMPc
2. L'influence du stade de développement des bourgeons de membres sur leur réceptivité vis-à-vis du nucléotide
3. La localisation des cellules réceptives et l'évolution de leur réceptivité
4. L'influence de l'ectoderme et du nucléotide sur la nature des composants de la matrice cartilagineuse.

Les résultats obtenus soulignent l'existence de l'antagonisme entre les effets respectifs de l'ectoderme et du dbAMPc sur la chondrogenèse *in vitro* du mésoderme de jeunes bourgeons de membres (stades 17 et 19) : l'ectoderme contrôle la morphogenèse squelettique en limitant la différenciation cartilagineuse alors que le dbAMPc stimule la chondrogenèse et freine la croissance des bourgeons de membres. Par ailleurs, le dbAMPc affecte la différenciation cartilagineuse en fonction du stade de développement auquel l'ébauche est parvenue au moment du traitement. Le nucléotide tout d'abord activateur de la chondrogenèse dans les jeunes bourgeons devient inhibiteur dans les bourgeons plus âgés. En outre, la position des zones sensibles au dbAMPc et la réactivité des cellules évoluent au cours du séjour *in vitro*. A partir de ces résultats différentes hypothèses ont été émises pour expliquer les effets tantôt activateur, tantôt inhibiteur du dbAMPc sur la chondrogenèse. Le dbAMPc pourrait provoquer :

- une transformation en cellules chondrogènes de cellules appartenant aux lignées conjonctive ou musculaire
- une stimulation du dépôt de matrice cartilagineuse par des chondrocytes matures en place
- une dégénérescence cellulaire
- un blocage de l'évolution de certains jeunes chondroblastes.

En dernier lieu il a été montré que l'élimination de l'ectoderme et la présence de dbAMPc sont des conditions expérimentales qui provoquent une augmentation de la proportion des agrégats de protéoglycannes, témoin de l'expression du phénotype cartilagineux.

