

50376
1987
123

50376
1987
123

N° d'ordre 1400

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES-ARTOIS

THESE
présentée pour obtenir le titre de DOCTEUR de 3ème CYCLE en
BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES.

par :
Chafika ZENJARI



**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'INNERVATION DU MEMBRE
DE PLEURODELE AU COURS DE LA CROISSANCE ET DE LA
REGENERATION. INFLUENCE DES FORMATIONS
SURNUMERAIRES SUR L'INNERVATION DU MEMBRE.**

Soutenue le 8 Juillet 1987 devant la commission d'examen :

Président et Rapporteur : M. A.P. CAPURON
Directeur de thèse : M. E. LHEUREUX
Examineurs : MM. P. CLAIRAMBAULT
P. DELORME
B. LASSALLE

UNIVERSITE DES SCIENCES
TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES ARTOIS

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

M. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

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

MM. ARNOULT, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DECUYPER,
DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, GERMAIN, GLACET, GONTIER, KOURGANOFF,
LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL,
PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI, Mes BEAUJEU, LELONG.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN

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

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

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

M. A. DUBRULLE.

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

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNELLE Jean Pierre	Chimie-Physique
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie-Physique
M. CARREZ Christian	Informatique
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. DHAINAUT André	Biologie animale
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
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. LEROY Jean Marie	Spectrochimie
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MIGEON Michel	E.U.D.I.L.
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PETIT Francis	Chimie organique
M. POUZET Pierre	Modélisation - Calcul scientifique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHAMPS Joel	Spectroscopie moléculaire
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
Mle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. ALLAMANDO Etienne	Composants électroniques
M. ANDRIES Jean Claude	Biologie des organismes
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
M. BASSERY Louis	Génie des procédés et réactions chimiques
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERTRAND Hugues	Sciences Economiques et Sociales
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIS Pierre	Mécanique
M. BOISSIER Daniel	Génie civil
M. BOIVIN Jean Claude	Spectrochimie
M. BOUQUELET Stéphane	Biologie appliquée aux enzymes
M. BOUQUIN Henri	Gestion
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CATTEAU Jean pierre	Chimie organique
M. CAYATTE Jean Louis	Sciences Economiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. CHARET Pierre	Biochimie structurale
M. CHIVE Maurice	Composants électroniques optiques
M. COMYN Gérard	Informatique théorique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
M. CORIAT Benjamin	Sciences Economiques et Sociales
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Tectonique Géodynamique
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. DEJAEGER Roger	Electrochimie et Cinétique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences Economiques
M. DENUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide - Cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DHAMELINCOURT Paul	Chimie physique
M. DORMARD Serge	Sciences Economiques
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUERULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides

M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.A.E.)
Mme EVRARD Micheline	Génie des procédés et réactions chimiques
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FAUQUEMBERGUE Renaud	Composants électroniques
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GOURIEROUX Christian	Probabilités et statistiques
M. GREGORY Pierre	I.A.E.
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrice	Sciences Economiques
M. GRIMBLOT Jean	Chimie organique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.A.E.)
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEBVRE Jacques	Physique
M. LEFEBVRE Christian	Pétrologie
Mle LEGRAND Denise	Algèbre
Mle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEGRAND Pierre	Chimie
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.A.E.)
M. LEROY Yves	Composants électroniques
M. LESENNE Jacques	Systèmes électroniques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAHIEU Jean Marie	Optique - Physique atomique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MAURISSON Patrick	Sciences Economiques et Sociales
M. NESMACQUE Gérard	Génie Mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MORCELLET Michel	Chimie organique
M. MORTREUX André	Chimie organique
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
M. NICOLE Jacques	Spectrochimie
M. NOTELET Francis	Systèmes électroniques
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée

M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POSTAIRE Jack	Informatique industrielle
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROBINET Jean Claude	EUDIL
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Systèmes électroniques
M. THIEBAULT François	Sciences de la terre
M. THUMERELLE Pierre	Démographie - Géographie Humaine
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
M. TOURSEL Bernard	Informatique
M. TREANTON Jean René	Sociologie du Travail
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VASSEUR Christian	Automatique
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. WACRENIER Jean Marie	Electronique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
M. WEINSTEIN Olivier	Analyse économique de la recherche et développement
M. WERNER Georges	Informatique théorique
M. WOZNIAK Michel	Spectrochimie
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Algèbre

**Ce travail a été réalisé au laboratoire de Morphogenèse animale de l'Université des
Sciences et Techniques de LILLE - FLANDRES-ARTOIS (C.N.R.S. U.A. 685)
Directeur : Professeur BART**

Monsieur E. LHEUREUX, Maître de conférence, a eu la patience et l'amabilité de diriger mon travail durant ces trois années. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour la confiance, la disponibilité et les conseils qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail.

Monsieur le Professeur A.P. CAPURON, laboratoire de Morphogenèse animale, qui s'est toujours intéressé à mon travail, a bien voulu accepter de présider le jury de cette thèse, je l'en remercie vivement.

Monsieur le Professeur P. CLAIRAMBAULT, laboratoire d'Anatomie comparée de PARIS VII, m'a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma considération.

Monsieur B. LASSALLE, Maître de conférence, laboratoire de Morphogenèse animale, s'est toujours intéressé à mon travail, je le remercie vivement de bien vouloir faire partie de mon jury de thèse.

Que Monsieur le Professeur P. DELORME, laboratoire de Physiologie animale de LILLE, qui a bien voulu examiner mon travail, accepte mes sincères remerciements.

Je tiens également à remercier Mme ANDRIES pour son aide technique et Mme LALOUX pour la dactylographie de ce texte ainsi que tous les membres du laboratoire pour leur sympathie et leur aide morale tout au long de mon séjour.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODES	5
I - Matériel	6
II - Méthodes	6
A - Méthodes d'élevage	6
B - Techniques opératoires	6
C - Techniques histologiques	9
D - Technique histochimique	10
PREMIERE PARTIE : INNERVATION DU MEMBRE ANTERIEUR DE PLEURODELE. SA VARIATION AU COURS DE LA CROISSANCE.	13
I - Innervation du membre antérieur de Pleurodèle adulte.	
A - Patron des muscles	14
B - Patron des nerfs	17
C - Localisation des motoneurones des principaux muscles du membre	19
II - Variation de l'innervation au cours de la croissance	25
A - Mise en place des nerfs dans le bourgeon du membre	25
B - Variation du nombre de fibres nerveuses au cours de la croissance	27
DEUXIEME PARTIE : INNERVATION DU MEMBRE REGENERE	31
I - Resultats	32
A - Patron des nerfs et des muscles	32
B - Localisation des motoneurones innervant les principaux muscles du membre régénéré	32
C - Etude quantitative des principaux nerfs	34
II - Discussion	35

TROISIEME PARTIE : INNERVATION DES MEMBRES A FORMATIONS

SURNUMERAIRES -----	37
I - Patron des nerfs et des muscles des formations surnuméraires. ----	38
A - Formations transversales. -----	38
B - Formations proximo-distales. -----	40
II - Localisation des pools de motoneurones innervant les formations surnuméraires. -----	40
A - Formations transversales. -----	41
Résultats.	
1 - Formations transversales obtenues chez des larves âgées. -----	41
a - Duplications antérieures et postérieures.---	41
b - Duplications ventrales. -----	45
2 - Formations ventrales obtenues chez des larves jeunes. -----	47
3 - Formations ventrales obtenues chez l'embryon.---	49
Discussion.	
B - Formations proximo-distales. -----	53
Résultats. -----	54
Discussion. -----	55
III - Etude quantitative des principaux nerfs des membres à formations surnuméraires. -----	57
A - Résultats. -----	58
1 - Formations surnuméraires obtenues chez les larves âgées. -----	58
2 - Formations surnuméraires obtenues chez les larves jeunes. -----	61
3 - Formations surnuméraires obtenues chez l'embryon. -----	62
B - Discussion. -----	64
 CONCLUSION -----	 67
 BIBLIOGRAPHIE -----	 70

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'innervation des organes de Vertébrés consiste en l'établissement de relations étroites entre des cellules nerveuses, motrices et sensorielles, et des cellules spécialisées non nerveuses. Parmi ces organes, le membre a fait l'objet de nombreux travaux et un intérêt particulier a été apporté à l'établissement des synapses neuromusculaires.

Cet établissement est l'une des dernières étapes d'une série d'événements se déroulant au cours de la vie embryonnaire, mais aussi post-embryonnaire. Ces événements débutent par les naissances indépendantes des nerfs et des muscles et s'achèvent par le regroupement des corps cellulaires de neurones moteurs en amas bien localisés au sein du système nerveux central, chaque neurone étant connecté, par son axone dont l'extrémité est ramifiée, à un ensemble de fibres musculaires aux fonctions nettement définies.

Dans l'établissement de ces relations privilégiées, les aspects relatifs aux interactions à longue et moyenne distances demeurent encore mal compris, malgré les nombreux travaux effectués principalement sur les membres d'Oiseaux et de Mammifères.

Chez les Vertébrés Tétrapodes, les mouvements coordonnés des membres témoignent de relations hautement spécifiques entre motoneurones et muscles cibles. La mise en place de l'innervation du membre pose plusieurs problèmes dont celui de l'établissement des chemins empruntés par les axones moteurs et les dendrites sensorielles en croissance et celui de la reconnaissance ultime de la cellule cible. Ce sont ces aspects qui ont fait l'objet de notre travail, à un niveau cellulaire étape préalable à toute étude à un niveau moléculaire.

Chez les Amphibiens Anoures et chez les Oiseaux, les expériences sur le bourgeon de membre en croissance sont beaucoup plus aisées que chez les

Mammifères, c'est pourquoi, la chirurgie embryonnaire qui consiste à perturber les relations spatiales entre le système nerveux et le membre a permis l'acquisition de nombreuses données. Ces perturbations s'adressent le plus souvent à la cible qui subit des ablations (Prestige, 1967 ; Stirling et Summerbell, 1977 ; Oppenheim et al, 1978 ; Lamb, 1980), des rotations (Stirling et Summerbell, 1981, 1985 ; Laing, 1984), des délétions (Stirling et Summerbell, 1977), des excédents (Stephens et al, 1985), le remplacement de muscles fléchisseurs par des extenseurs (Lance-Jones, 1986 ; Wigston, 1986) enfin des duplications (Morris, 1978 ; Lamb, 1978b ; Hollyday, 1981). Parfois, les opérations altèrent les dispositions du centre nerveux médullaire par délétions de segments médullaires (Lance-Jones et Landmesser, 1980a), par inversion cranio-caudale de la moelle qui innerve le membre (Lance-Jones et Landmesser, 1980b) ou remplacement de cette dernière par un segment médullaire ectopique (Butler et al, 1986). Les résultats se divisent en deux ensembles. Dans certains cas, les axones retrouvent leurs cibles correctes, même en position ectopique. Dans d'autres cas, des axones peuvent établir des synapses inappropriées. Cette variété de résultats démontre la complexité des interactions neuromusculaires à longue distance.

Consécutifs aux problèmes de l'établissement des relations spécifiques entre les neurones et leurs cibles, d'autres aspects ont aussi fait l'objet de nombreux travaux. Ce sont les aspects de la mort neuronale et de l'élimination synaptique étudiés chez les Oiseaux, les Mammifères et les Anoures (revues de Landmesser, 1980 ; Purves et Lichtman, 1980 ; Bennett, 1983 ; Clarke, 1985 ; Betz, 1987) qui permettent d'aborder les problèmes de compétition dont la résolution faciliterait la compréhension de l'établissement des synapses neuromusculaires qui peuvent ne pas être hautement spécifiques comme nous l'avons mentionné ci-dessus.

Les Urodèles ont curieusement fait l'objet de peu d'études dans ce domaine de l'innervation du membre (Weiss, 1937 ; Grimm, 1971 ; Cass et al., 1973 ; Bennett et Raftos, 1979 ; Stephens et al, 1982, 1984, 1985). Pourtant, les Urodèles ont un avantage que n'ont pas les Anoures et les Oiseaux. Leur innervation peut être étudiée au cours de la vie embryonnaire et par la morphonèse régénératrice.

L'étude qui nous a été confiée consiste à rechercher comment se réalise

l'innervation des membres simples et multiples résultant d'opérations effectuées tant chez la larve que chez l'embryon. Il nous a fallu préalablement établir les patrons des nerfs et des muscles du membre ainsi que la localisation de pools de motoneurones correspondant aux principaux muscles du membre. Puis, nous avons recherché la période d'innervation du membre et l'évolution quantitative des nerfs au cours de la croissance. Enfin, nous avons réalisé une étude expérimentale de l'innervation du membre par le biais de la régénération et de la production de membres à formations surnuméraires aussi bien après la période d'innervation du membre c'est-à-dire chez la larve âgée qu'avant, c'est-à-dire chez l'embryon ou la très jeune larve.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué sur le triton *Pleurodeles waltl* élevé au laboratoire. Les stades embryonnaires et larvaires; auxquels nous ferons référence correspondent à ceux de la table de développement établie par Gallien & Durocher (1957).

II. METHODES

A - Méthodes d'élevage

L'élevage est fait dans des pots individuels. Les animaux sont maintenus dans l'eau du robinet à la température de la pièce soit $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Les jeunes larves sont nourries de plutei d'*Artemia salina* et les plus âgées de larves de chironomes. L'eau d'élevage est renouvelée une fois par semaine.

B - Techniques opératoires

1) greffes de blastème de régénération : (Fig 1 et 2)

a - Anesthésie

Les animaux sont anesthésiés dans une solution de MS222 à 1 pour 1000.

b - Amputation et obtention de blastèmes de régénération :

Les opérations sont effectuées sous observation à la loupe binoculaire à des grossissements de 10 à 20, à l'aide de pinces et de ciseaux de Pascheff.

L'amputation du membre antérieur (Fig.1a, b) est réalisée au niveau du bras distal ou du poignet de larves d'une longueur de 4 à 5 cm. Un blastème de régénération se forme et se développe. Quand il atteint le stade palette, il fait l'objet de transplantations.

c- Transplantations (Fig. 1c)

Des autogreffes et parfois des homogreffes de blastèmes de régénération sont

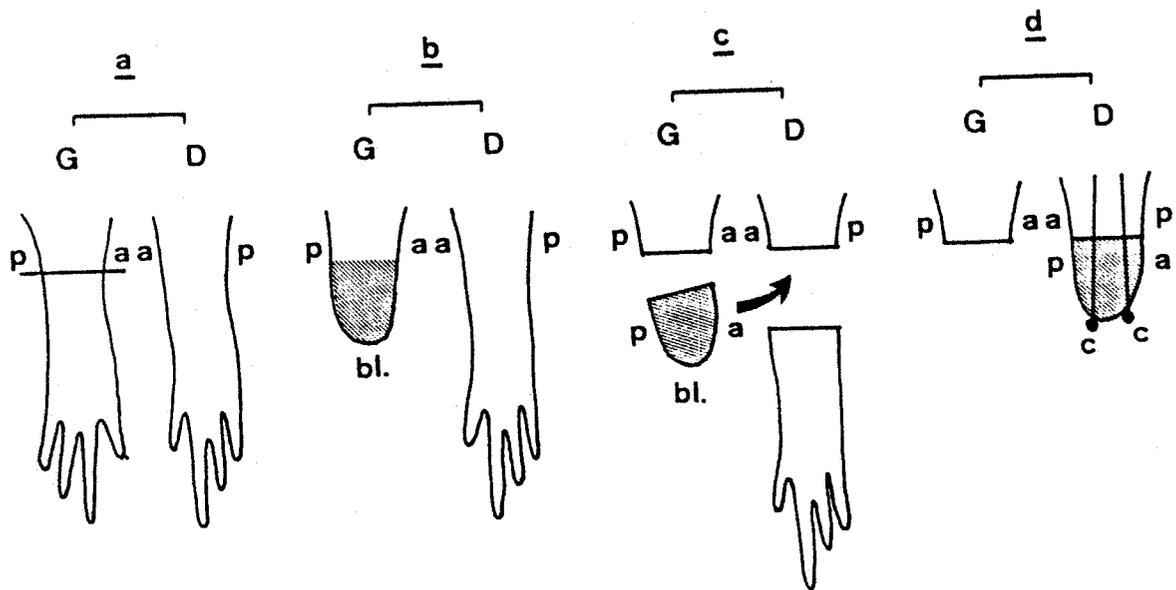


Fig. 1 - Procédure expérimentale de transplantations contralatérales de blastèmes de régénération réalisant une inversion des axes a-p du blastème de régénération et du moignon porte-greffe.

a : amputation du membre gauche ; b : formation d'un blastème de régénération ; c : ablation du membre droit et greffe du blastème gauche sur le moignon droit ; d : fin de l'opération.

a : antérieur ; bl : blastème de régénération ; cl : clou d'argent ; D : membre droit ; G : membre gauche ; p : postérieur.

effectuées sur des moignons d'amputation et le maintien des greffons est réalisé à l'aide de deux petits clous d'argent (Fig.1d) qui seront ôtés deux jours plus tard. Des échanges de blastèmes de régénération permettent de réaliser soit une inversion des axes antéro-postérieur (a-p) du greffon et du membre porte-greffe (Fig. 1), soit une inversion dorso-ventrale (d-v). Des homogreffes ipsilatérales de blastèmes de régénération de bras distal sur le poignet du membre antérieur réalisent uniquement une discontinuité proximo-distale (pr-di) (Fig.2).

2) Transplantations contralatérales de champ de membres embryonnaires

Les opérations sont effectuées sur des bourgeons caudaux au stade 26/27 (Fig. 3). Après anesthésie, un transfert contralatéral du champ du membre est réalisé avec une inversion de l'axe a-p, dans une solution d'Holtfreter opératoire contenant un antibiotique. Les embryons sont maintenus dans cette solution pendant 1 heure

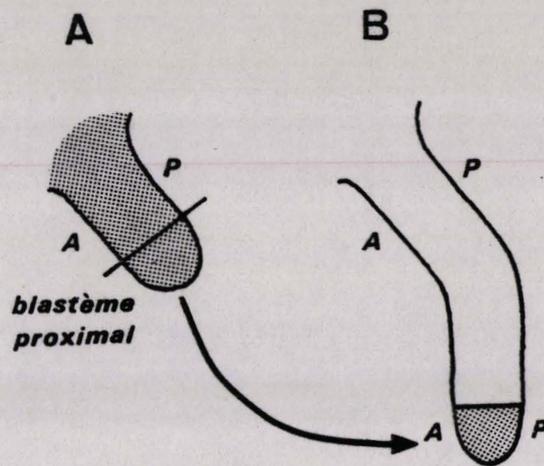


Fig. 2 - Procédure expérimentale de transplantation d'un blastème proximal du membre droit d'une larve A au niveau du poignet droit d'une autre larve B. a : antérieur ; p : postérieur.

jusqu'à cicatrisation des greffons sur l'hôte ,après quoi ils sont mis dans une solution d'Holtfreter d'élevage pendant 48 h. Après cette période, les embryons sont remis dans l'eau d'élevage.

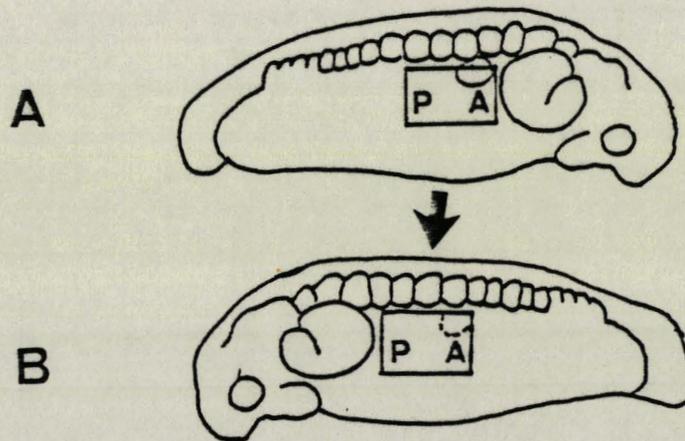


Fig. 3 - Procédure expérimentale de transplantation contralatérale du champ de membre droit d'un embryon A de stade 26/27 à la place du champ de membre gauche d'un embryon hôte B de même stade réalisant une inversion de l'axe A-P du greffon.

3) Traitement au palmitate de rétinol de larves dont le membre droit a été amputé.

Le traitement des tritons en régénération par les dérivés de la vitamine A permet dans certains cas de produire des membres doubles. La technique utilisée dans ce travail est celle de Lheureux et al (1986). La voici brièvement rapportée.

On effectue une amputation du bras proximal de larves de stade 36. Les animaux sont alors traités à l'abri de la lumière sous une boîte en carton par le palmitate de rétinol dissous dans l'eau d'élevage à une dose de 75 unités internationales par ml, soit 48 mg dissous dans 200 ml d'eau courante. Trois fois par semaine, les larves sont exposées une heure à la lumière du jour pendant leur repas, après quoi, le milieu est renouvelé et les larves retournent à l'obscurité. Après 11 jours de traitement, la régénération se poursuit dans les conditions normales d'élevage.

C - Techniques histologiques

1) Microscopie photonique

a - Histologie pour analyses structurales

Les membres antérieurs témoins et expérimentaux sont fixés pendant 48 h dans une solution de Bouin acétique puis subissent une décalcification préalable à l'inclusion. Après leur inclusion dans la paraffine, les membres sont débités en coupes transversales de 7 μm d'épaisseur puis colorés selon l'une des trois techniques suivantes :

- coloration à l'Azan

Cette technique est utilisée pour l'étude de la répartition des muscles et des nerfs des membres.

- coloration à l'hématoxyline et éosine

Cette technique est utilisée pour la coloration des neurones médullaires.

- coloration de Bodian

Cette technique de coloration des nerfs a été adaptée au membre de pleurodèle. Les coupes déparaffinées, collodionnées, hydratées, sont traitées dans l'étuve à 60° par une solution de nitrate d'argent à 20% pendant 1 h 30, puis après un lavage à l'eau distillée pendant 1 min., par une solution de protéinate d'argent à 0,2%

pendant 22 h.

Après réduction par une solution d'hydroquinone à 1% et de sulfite de sodium anhydre à 10% pendant 5 min., on procède au virage au noir par une solution de chlorure d'or à 0,5% pendant 10 min., puis on fait la déshydratation des coupes et le montage au Xam.

b) Méthodes de comptage des fibres nerveuses :

Les coupes sont observées au microscope photonique et les dessins sont réalisés à la chambre claire. Le comptage des fibres nerveuses est effectué à l'aide d'un oculaire réticulé de 100 carrés de 0,5 mm de côté. L'aire de la coupe sur laquelle les comptages sont réalisés, est mesurée à l'aide d'un planimètre, afin d'établir le nombre de fibres nerveuses par unité de surface.

2) Microscopie électronique

Des bourgeons de membres de pleurodèle aux stades 36 (cône), 38 (palette échancrée), 41 (deux doigts), 43 (trois doigts) et 45 (quatre doigts) sont fixés au glutaraldehyde à 2,5% dans du tampon cacodylate de sodium 0,1 M (pH 7,3) pendant 3 h et lavés dans le même tampon pendant une nuit. La post-fixation est faite par une solution de tétraoxyde d'osmium à 1% dans du tampon cacodylate 0,1 M pendant 1 h 30 et la deshydratation est faite par passage dans des alcools à degrés croissants. Une imprégnation des pièces par une solution d'acétate d'uranyle à 2% dans l'alcool 50° s'intercale entre l'alcool 50° et 70°. Elle s'effectue à l'obscurité pendant 20 min. Avant l'inclusion dans le spurr, les pièces sont imprégnées à l'oxyde de propylène pendant 1 h. Des coupes semi-fines et ultrafines sont réalisées à l'ultramicrotome OMUII Reichert, les premières sont colorées au bleu d'azur B et les secondes sont contrastées par une double coloration à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb (Reynolds 1963). Les observations sont faites au microscope électronique Jéol 120CX.

D - Technique histochimique

Cette technique permet de localiser les corps cellulaires des motoneurones innervant les muscles du membre de triton par marquage rétrograde à la peroxydase du raifort. Elle a été appliquée sur des animaux témoins et expérimentaux dont la taille est égale ou supérieure à 50 mm.

1) Application de la peroxydase sur les muscles

Sous anesthésie, la peau du membre est incisée afin de dégager le muscle dont on veut étudier l'innervation motrice. Après avoir écarté quelques fibres musculaires, on dépose en plusieurs points du muscle, quelques cristaux de peroxydase du raifort (HRP sigma Type VI). La peroxydase, captée par les terminaisons nerveuses sera acheminée dans les corps cellulaires des motoneurones. Quand toute l'enzyme est absorbée, la peau est rabattue et les lèvres juxtaposées cicatrisent facilement. Le triton est remis en élevage pendant 3 jours.

2) Fixation

L'animal est anesthésié, éviscéré et la moelle épinière est exposée par sa face ventrale par ablation des corps vertébraux des huit premières vertèbres. La moelle épinière est fixée sur place par une solution de glutaraldéhyde à 2% dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,3.

Le segment compris entre les deuxième et sixième racines spinales est coupé délicatement, libéré de ses attaches, débarrassé des méninges et plongé dans le même fixateur pendant 2 à 4 h à 4°C. La moelle est ensuite lavée dans le tampon phosphate et y reste pendant la nuit.

3) Coloration *in toto*

Pour révéler la peroxydase, la moelle épinière est immergée pendant 5 h dans une solution de diaminobenzidine (DAB) à 4 mg dans 5 ml de tampon phosphate 0,1M (pH 7,3) à 4°C. Après cela, 0,5 ml d'eau oxygénée à 0,3% est ajouté aux 5 ml de la solution précédente et la réaction se poursuit à température ambiante pendant la même durée. On procède alors à un lavage rapide de la moelle épinière dans le tampon (1 min), après quoi on la déshydrate et on l'inclut dans la paraffine. Les pièces sont ensuite coupées à 10 µm et montées au Xam.

4) Analyses

Chaque coupe est examinée au microscope photonique. On note la position des cellules dans le plan transversal de la moelle épinière, et leur distribution le long de l'axe rostro-caudal. Les sites d'émergence des nerfs spinaux sont utilisés comme repères le long de l'axe rostro-caudal. Chaque moelle épinière est divisée en éléments successifs correspondant chacun à un tiers de métamère. La dimension rostro-

caudale de chaque élément est égale à 300 μm , soit 30 coupes. Les nerfs rachidiens 2, 3, 4, 5 et 6 sont situés respectivement à la limite antérieure des premier, quatrième, septième, dixième et treizième éléments (Fig. 4).

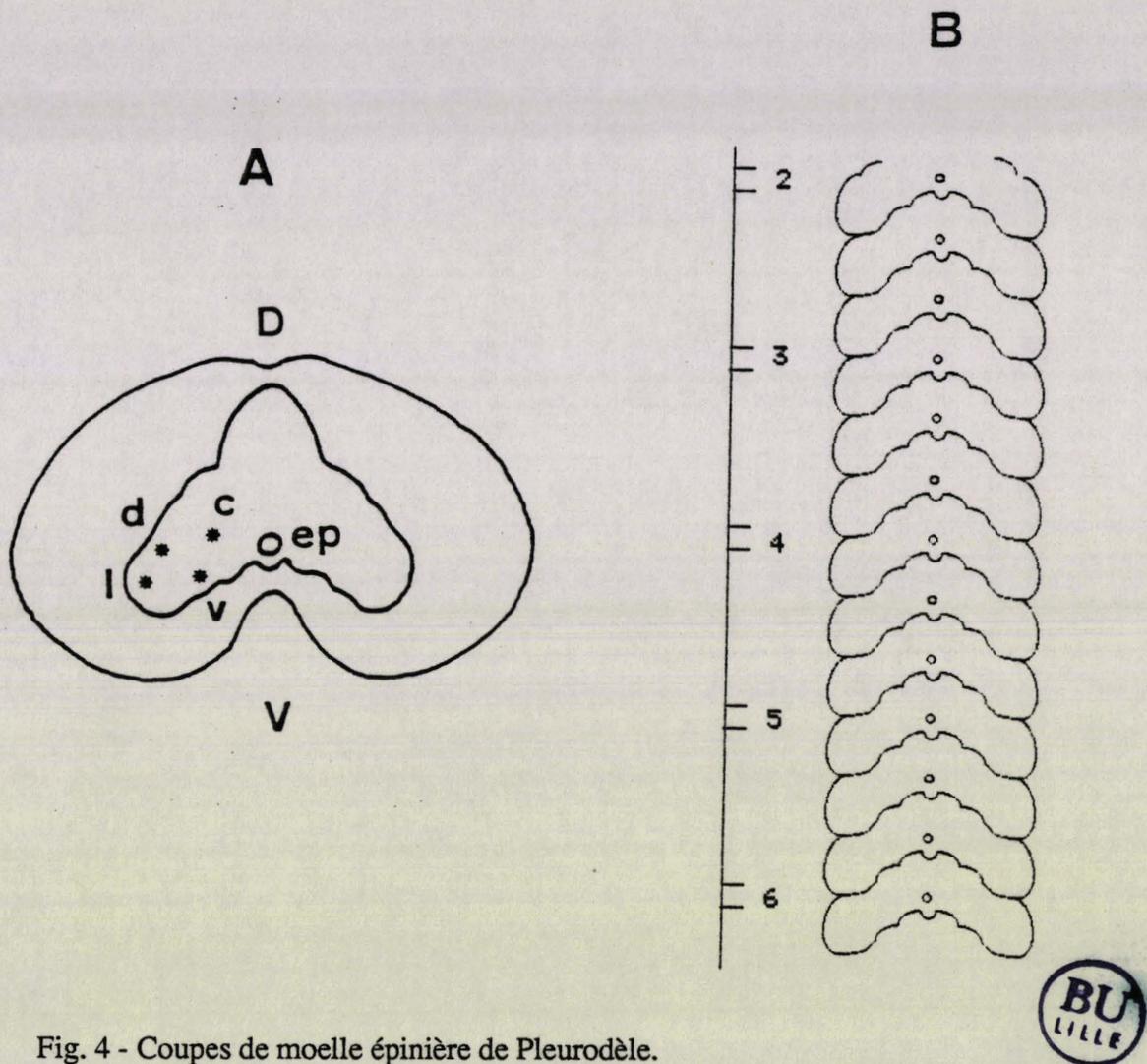


Fig. 4 - Coupes de moelle épinière de Pleurodèle.

A. Vue d'ensemble de la moelle épinière adulte précisant les principales positions des motoneurones innervant les muscles du membre. c : centrale ; d : dorsale ; D : dorsal ; ep : canal de l'épendyme ; l : latérale ; v : ventrale ; V : ventral.

B. Schéma représentant les 13 segments de la moelle brachiale. Chaque segment regroupe 30 coupes de 10 μm chacune et correspond à un tiers de métamère. On a limité la représentation des segments aux cornes ventrales de la moelle épinière. Les nombres 2 à 6 représentent les nerfs spinaux 2 à 6. Il y a 3 segments entiers entre 2 émergences de racines spinales successives.

Première partie

**L'INNERVATION DU MEMBRE ANTERIEUR DE
PLEURODELE.
SA VARIATION AU COURS DE LA CROISSANCE.**

Première partie

L'INNERVATION DU MEMBRE ANTERIEUR DE PLEURODELE. SA VARIATION AU COURS DE LA CROISSANCE.

Le membre de triton est un ensemble de tissus innervés soit par des neurones moteurs localisés dans les cornes ventrales de la moelle épinière soit par des neurones sensoriels localisés dans les ganglions spinaux. Notre étude est surtout axée sur l'innervation motrice des principaux muscles du membre mais lorsque nous serons amenés à décrire les nerfs, nous les considérerons de façon globale ignorant les taux respectifs de fibres motrices et sensorielles qui composent chacun d'eux.

I - INNERVATION DU MEMBRE ANTERIEUR DE PLEURODELE

Avant d'entreprendre l'étude de l'innervation du membre, nous avons établi le patron des muscles du membre. L'étude de l'innervation a consisté à établir le patron des nerfs du membre et à localiser les motoneurones des principaux muscles du membre. Le patron des nerfs et des muscles du membre antérieur de pleurodèle est établi à partir de coupes sériées de membres, colorées à l'Azan et au Bodian. Le squelette du membre avait fait l'objet d'une étude ancienne de Wiedersheim (1883). La nomenclature des muscles et des nerfs repose sur les descriptions concernant la salamandre (Francis, 1934) et l'axolotl (Piatt, 1957a ; Grim et Carlson, 1974).

A - Patron des muscles :

1) Musculature du bras (Fig. 5 A et C).

La musculature du bras de pleurodèle se compose de deux principaux groupes de muscles : le complexe musculaire dorsal *anconaeus* (triceps), extenseur

de l'avant-bras sur le bras et le muscle ventral *humero-antebrachialis* (biceps), fléchisseur de l'avant-bras sur le bras. A ces deux muscles s'adjoignent d'autres muscles de moindre développement.

a) le complexe musculaire *anconaeus* :

Il est constitué de quatre muscles :

- le muscle *anconaeus humeralis lateralis*, le plus important se situe vers l'épaule, puis devient dorso-postérieur lorsqu'on se dirige vers le coude.
- le muscle *anconaeus scapularis medialis*, dorsal, côtoie le précédent.
- le muscle *anconaeus coracoïdeus cucularis*, se situe à proximité du premier mais occupe une position ventro-postérieure.
- le muscle *anconaeus humeralis medialis*, antérieur par rapport au muscle *anconaeus coracoïdeus*, se situe dans la moitié distale du bras.

b) Le muscle *humero-antebrachialis* :

Il occupe une position antéro-ventrale et se prolonge jusqu'au radius.

Les muscles de moindre développement sont au nombre de deux :

- le muscle *coracobrachialis longus*, ventral, est développé dans la moitié proximale.
- le muscle *coracoradialis proprius*, ventral, s'insère entre le muscle *humero-antebrachialis* et le muscle *coracobrachialis longus*.

2) Musculature de l'avant-bras

Elle se compose de deux grands groupes de muscles, des muscles dorsaux, extenseurs de la main et des muscles ventraux fléchisseurs de la main.

a) Les muscles extenseurs :

Ils sont au nombre de quatre. Leur distinction est peu aisée par voie de dissection mais l'étude histologique (P.I.C) permet de distinguer :

- le muscle *extensor antibrachis et carpi radialis*, antérieur
- le muscle *extensor antibrachis et carpi radialis*, postérieur
- le muscle *extensor digitorum communis*, superficiel qui recouvre les 2 autres.
- le muscle *extensor antibrachis radialis*, plus petit situé entre les deux premiers et recouvert lui aussi par le muscle *extensor digitorum communis*.

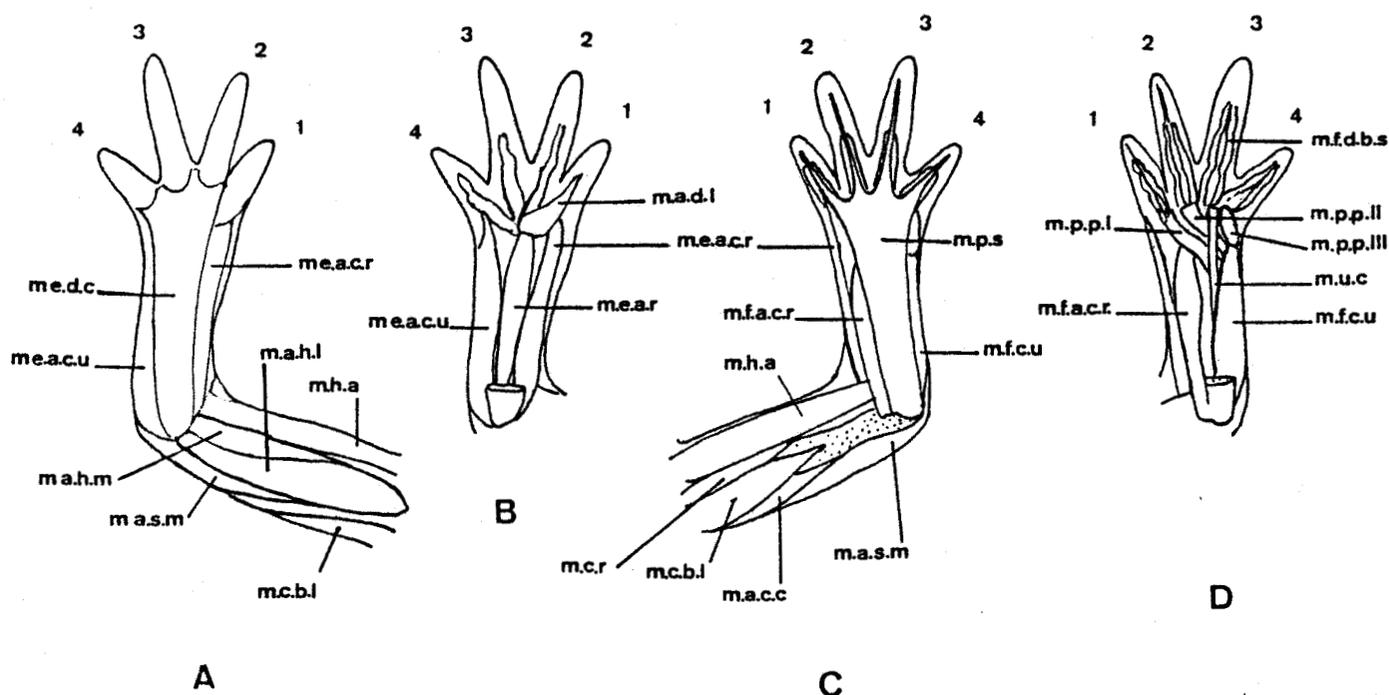


Fig. 5 - Musculature du membre antérieur gauche de Pleurodèle

A - Membre antérieur gauche en vue dorsale.

B - Avant bras gauche en vue dorsale, le muscle *extensor digitorum communis* ayant été enlevé.

C - Membre antérieur gauche en vue ventrale.

D - Avant bras gauche en vue ventrale, le muscle *palmaris superficialis* ayant été enlevé.

macc	: muscle <i>anconaeus coracoideus cucullaris</i>
mad I	: muscle <i>abducteur digiti I</i>
mahl	: muscle <i>anconaeus humeralis lateralis</i>
mahm	: muscle <i>anconaeus humeralis medialis</i>
masm	: muscle <i>anconaeus scapularis medialis</i>
mcbl	: muscle <i>corarobrachialis longus</i>
mcrp	: muscle <i>coraco-radialis proprius</i>
meacr	: muscle <i>extensor antibrachis et carpi radialis</i>
meacu	: muscle <i>extensor antibrachis et carpi ulnaris</i>
mear	: muscle <i>extensor antibrachis radialis</i>
meb	: muscle <i>extensores breves digitorum</i>
medc	: muscle <i>extensor digitorum communis</i>
mfacr	: muscle <i>flexor antibrachis et carpi radialis</i>
mfcu	: muscle <i>flexor carpi ulnaris</i>
mfbs	: muscle <i>flexores breves superficialis</i>
mfbp	: muscle <i>flexores breves profundus</i>
mpp I	: muscle <i>palmaris profundus I</i>
mpp II	: muscle <i>palmaris profundus II</i>
mpp III	: muscle <i>palmaris profundus III</i>
mpq	: muscle <i>pronator quadratus</i>
mps	: muscle <i>palmaris superficialis</i>
muc	: muscle <i>ulnocarpalis</i>

b) Les muscles fléchisseurs :

Les principaux muscles fléchisseurs sont au nombre de trois :

- le muscle *flexor antibrachii et carpi radialis*, antérieur
- le muscle *flexor carpi ulnaris*, postérieur
- le muscle *palmaris superficialis*

Au niveau de l'avant-bras, se mettent en place d'autres muscles fléchisseurs plus profonds :

- le muscle *ulnocarpalis*
- le muscle *pronator quadratus*
- le muscle *palmaris profundus I, II et III*

2 - Musculature de la main

Elle se compose de muscles dorsaux et de muscles ventraux dont la contraction assure l'extension ou la flexion des doigts.

a - Dorsalement on observe :

- le muscle *abductor digiti I*
- le muscle *extensores breves digitorum* au niveau des doigts.

b - Ventralement on observe :

- les muscles *flexores breves superficialis*, situés superficiellement au niveau des doigts

- les muscles *flexores breves profundus*, situés aussi au niveau des doigts mais sont plus profonds que les précédents.

B - Patron de nerfs (Fig. 6)

Les coupes sériées de membres colorées à l'azan ou par la technique de Bodian ont permis d'établir la répartition des nerfs dans le membre antérieur de pleurodèle. La nomenclature a été établie à partir d'études faites chez la salamandre (Francis, 1934) et chez l'axolotl (Piatt, 1957a). Quatre nerfs spinaux contribuent à la formation du plexus brachial, les nerfs spinaux 2 et 3 qui s'associent pour former le nerf extenseur et les nerfs spinaux 4 et 5 qui s'associent pour former le nerf brachial.

1 - Patron des nerfs du bras :

Les deux principaux nerfs du bras de pleurodèle sont le nerf brachial et le nerf extenseur. Le nerf brachial, dorsal au niveau de l'épaule, se dirige très vite vers

la face ventrale en contournant l'humérus par son bord postérieur et se divise en deux branches qui se côtoient jusqu'au coude tout en migrant vers le côté antérieur. Le nerf extenseur est aussi dorso-postérieur au niveau de l'épaule puis s'enfonce à travers le muscle *anconaeus* et se divise en deux branches inégales : le nerf extenseur cranial le plus important et le nerf extenseur caudal. Ces deux nerfs vont gagner le bord antérieur et se placer entre l'humérus et le muscle *anconaeus scapularis medialis* dans la moitié distale du bras.

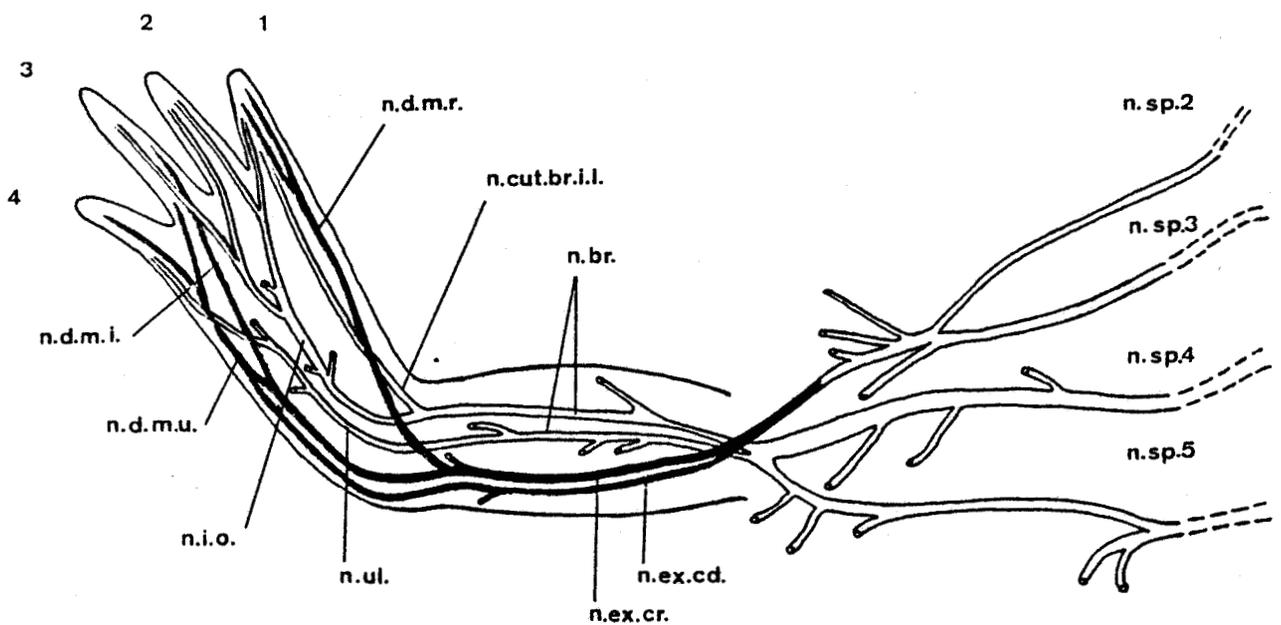


Fig. 6 - Répartition des nerfs du membre antérieur gauche de Pleurodèle. Vue dorsale.

n. br.	: nerf <i>cutaneus brachii inferior lateralis</i>
n. cut. br. i. l.	: nerf <i>cutaneus brachii inferior lateralis</i>
n. d. m. i.	: nerf <i>dorsalis manus intermedius</i>
n. d. m. r.	: nerf <i>dorsalis manus radialis</i>
n. d. m. u.	: nerf <i>dorsalis manus ulnaris</i>
n. ex. cd.	: nerf <i>extensorius caudalis</i>
n. ex. cr.	: nerf <i>extensorius cranialis</i>
n. io.	: nerf <i>interosseus</i>
n. sp. 2	: deuxième nerf spinal
n. sp. 3	: troisième nerf spinal
n. sp. 4	: quatrième nerf spinal
n. sp. 5	: cinquième nerf spinal



2 - Patron des nerfs de l'avant-bras et de la main

Le nerf extenseur cranial se divise en deux nerfs de même diamètre. Le nerf *dorsalis manus radialis* qui innerve le bord postérieur ventral de l'avant-bras et de la main et le nerf *dorsalis manus intermedius* qui migre progressivement sous les muscles extenseurs pour occuper une position intermédiaire entre le radius et l'ulna sous le muscle *extensor antibrachis et carpi ulnaris*.

Le nerf extenseur caudal, postérieur au précédent, demeure indivis et postérieur. Il constitue le nerf *dorsalis manus ulnaris*.

Dans l'avant-bras proximal, la branche la plus antérieure du nerf brachial se divise en deux parties : le nerf *cutaneus brachis inferior lateralis* et le nerf ulnaire. Le premier garde une position ventro-antérieure sous le muscle *huméro antebrachialis* au niveau du coude et sous le muscle *flexor carpi radialis* dans l'avant-bras. L'autre branche du nerf brachial va constituer le nerf ulnaire qui migre de la même façon que le nerf interosseux et se place entre les muscles *flexores palmaris superficialis et pronator quadratus* au milieu de l'avant-bras (Pl.I.D). Les positions des nerfs dans l'avant-bras sont maintenues dans la main. Ces nerfs se ramifient de façon à innerver tous les doigts.

C - Localisation des motoneurones des principaux muscles du membre

La localisation des motoneurones dans la moelle épinière a été beaucoup étudiée par des méthodes histologiques et physiologiques. La plupart de ces études ont été faites chez les Mammifères (Romanes 1951, 1964) et surtout chez les Oiseaux (Landmesser, 1978a, b ; Hollyday, 1980). Chez les Amphibiens, divers auteurs ont étudié l'organisation des motoneurones innervant les muscles des membres : Cruce (1974) chez la grenouille, Lamb (1976), chez le xénope, Carey (1982), et Stephens et Holder (1985), chez l'axolotl. Toutes ces études ont montré que les motoneurones innervant les muscles du membre se trouvent en position bien définie dans la moelle épinière. Mais, à la différence du poulet et de la grenouille où les motoneurones sont organisés en groupes bien individualisés, les neurones moteurs des Urodèles ont une répartition plus diffuse dans la région de la moelle épinière responsable de l'innervation du membre.

Nous avons examiné la structure de la moelle épinière du pleurodèle à partir d'une étude histologique, et nous nous sommes proposés de déterminer la position des neurones innervant les principaux muscles du membre antérieur normal de pleurodèle par la technique de marquage à la peroxydase du raifort.

Résultats

1- Etude histologique de la moelle épinière

Cette étude a pour objet de vérifier si l'organisation des motoneurones innervant le membre correspond à ce qui a été observé chez l'axolotl ou, au contraire, si des zones bien individualisées pourraient correspondre aux colonnes motrices latérales définies chez les Oiseaux et les Anoures, et dans ce cas, s'il est possible de définir une période de mort neuronale. A cette fin, la moelle épinière de la région brachiale a été étudiée chez l'animal métamorphosé et chez différents stades larvaires. L'observation de coupes transversales de moelle épinière de pleurodèle métamorphosé (Pl. V, 5,6) montre l'existence de neurones latéraux en faible nombre, légèrement séparés de la masse des neurones axiaux, et pouvant correspondre à la colonne motrice latérale des autres Vertébrés. Malheureusement, aucun critère cytologique et en particulier, l'absence de nucléoles ne permet pas de délimiter avec certitude une colonne motrice latérale. De tels motoneurones ont été recherchés chez différents stades larvaires. Ce n'est qu'au stade 45, que quelques cellules se séparent de la masse des neurones axiaux (Pl. V, 4). La moelle épinière des stades plus jeunes ne présente qu'un ensemble de neurones massés autour du canal de l'épendyme (Pl. V, 3). Remarquons que les ganglions spinaux sont présents dès le stade 34, le plus jeune stade étudié qui correspond à l'apparition de la première ébauche du bourgeon de membre. Ces résultats confirment les observations de Carey (1982) sur l'axolotl.

2- Les motoneurones des principaux muscles du membre

Quatre muscles du membre antérieur de pleurodèle ont été étudiés. Deux muscles proximaux du bras, *l'anconaeus* et le biceps et deux muscles distaux de l'avant-bras, *le flexor digitorum communis* et *l'extensor digitorum communis*. Chaque muscle est injecté chez trois ou quatre animaux et les localisations des pools

moyens de motoneurones correspondants sont déterminées.

a - Motoneurones du complexe musculaire *anconaeus* (Fig. 7A).

Le complexe musculaire *anconaeus* est composé de plusieurs unités musculaires, mais nous n'avons pas pu les subdiviser pour injecter chacune d'entre elles et nous l'avons considéré comme un seul muscle. Les motoneurones qui innervent ce complexe sont groupés en un pool dont on a défini les limites rostro-caudales et transversales. Selon l'axe rostro-caudal, ce pool commence entre la deuxième et la troisième racine spinale et se termine un peu en arrière de la quatrième racine spinale. Dans le plan transversal, la plupart des cellules marquées sont en positions dorsales et latérales. Ces motoneurones correspondent à de grandes cellules à plusieurs dendrites (Pl. V, 8).

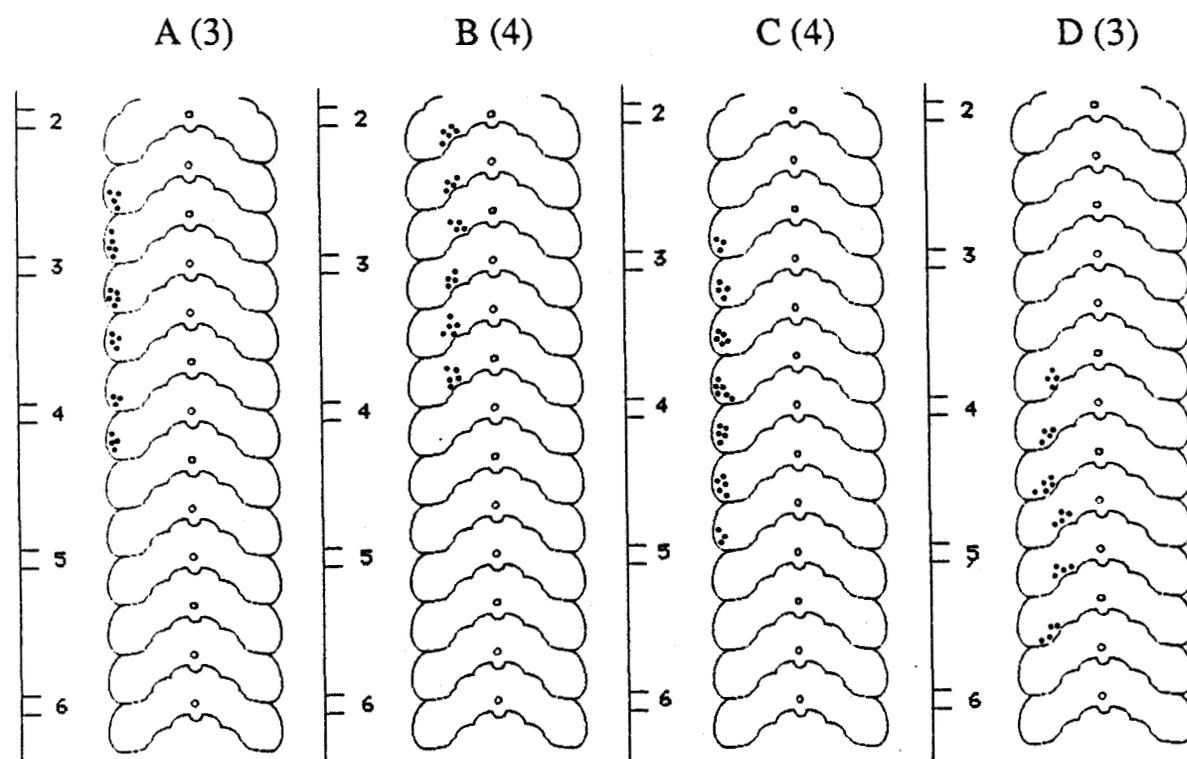


Fig. 7 - Localisation des pools de motoneurones innervant les quatre complexes musculaires du membre antérieur de Pleurodèle. Chaque segment représente la somme de 30 coupes soit 300 μm . Les points représentent la somme des motoneurones marqués dans les 30 coupes. Les points sont aussi une moyenne des nombres et répartitions des motoneurones rencontrés chez les 3 ou 4 animaux d'une même série (nombre indiqué entre parenthèses). A : *Anconaeus* ; B : *Humero antibrachialis* ; C : *Extensor digitorum communis* ; D *Flexor digitorum communis*.

b - Motoneurones du muscle *humero-antebrachialis* (Fig. 7B)

Le pool de motoneurones du muscle *humero-antebrachialis* est le plus rostral des quatre pools moteurs étudiés. Il débute au niveau de la deuxième racine spinale et se termine juste en avant de la quatrième racine spinale. Les cellules marquées sont en positions ventrales et médianes dans la corne ventrale de la moelle épinière. Elles correspondent à un autre type de neurone relativement petit avec souvent une seule dendrite.

c - Motoneurones du muscle *extensor digitorum communis* (Fig.7C)

Le muscle *extensor digitorum communis* est extenseur des doigts comme son nom l'indique. Il est dorsal et superficiel au niveau de l'avant-bras. Son pool de motoneurones est un peu plus caudal que ceux des muscles précédents et sa distribution rostro-caudale est plus étendue. Ce pool débute au niveau de la troisième racine spinale et finit au niveau de la cinquième. Les cellules marquées se trouvent surtout en positions dorsales et latérales. Quelques neurones ventraux peuvent être occasionnellement rencontrés (Pl. V, 9-10).

d- Motoneurones du muscle *flexor digitorum communis* (Fig. 7D)

Le muscle *flexor digitorum communis* se trouve en position ventrale et recouvre les autres muscles de l'avant-bras. Les motoneurones marqués sont encore plus caudaux que ceux des autres muscles étudiés. Le pool moteur de ce muscle commence au niveau de la quatrième racine spinale et se termine à la limite caudale de la cinquième. Dans le plan transversal, les cellules marquées occupent, dans la majorité des cas, des positions centrales et ventrales dans la corne ventrale de la moelle épinière. Des cellules en position ventro-latérale contribuent aussi à la formation du pool moteur du muscle *flexor digitorum communis*.

Discussion

Chez le Pleurodèle les distributions de pools de motoneurones correspondant aux muscles étudiés sont ipsilatérales et stables d'un animal à un autre aussi bien selon l'axe rostro-caudal que selon le plan transversal. Le long de l'axe rostro-caudal, les variations d'un individu à un autre n'excèdent pas un élément (30 coupes) c'est à dire, un tiers de métamère. De tels résultats sont en accord avec ceux observés chez

l'Axolotl (Carey, 1982 ; Stephens et Holder, 1985). Toutefois, les pools de motoneurones innervant des muscles de mêmes fonctions peuvent se superposer partiellement. Ainsi, les deux-tiers caudaux du pool de neurones moteurs du muscle *anconaeus* se superposent aux deux tiers rostraux du muscle *extensor digitorum communis*. Cette superposition se limite au sixième de la longueur des pools de motoneurones innervant les muscles *humero-antibrachialis* et *flexor digitorum communis*.

a) Localisation des pools de motoneurones en liaison avec les positions et fonctions des muscles correspondants.

Dans le plan transversal, les localisations des pools de motoneurones innervant des muscles de même fonction chez le Pleurodèle, sont similaires. Les motoneurones innervant les muscles extenseurs sont en position latérale et ceux innervant les muscles fléchisseurs sont en position médiane. Ces résultats sont en accord avec ceux de Stephens et Holder (1985) observés chez l'axolotl. De plus, nous avons noté une relation entre la position proximo-distale des muscles du membre et la localisation rostro-caudale des motoneurones dans la moelle épinière. Les muscles les plus proximaux sont innervés par les motoneurones les plus rostraux et les muscles distaux par les motoneurones les plus caudaux, ceci est en accord avec les résultats de Carey (1982) et de Stephens et Holder (1985) sur l'Axolotl. L'innervation des membres postérieurs d'Anoures a été étudiée par Cruce (1974) chez la grenouille par utilisation de la technique de chromatolyse rétrograde. Il existe chez la grenouille une relation entre la position transversale des motoneurones et la position morphologique des différents muscles dans le membre. A ce sujet, nos résultats sont conformes à ceux de Cruce. De plus, cet auteur a montré que les motoneurones des muscles fléchisseurs tendent à être en position plus rostrale que les motoneurones des muscles extenseurs. Par contre, nous n'avons pas observé cette relation chez le Pleurodèle.

Nos résultats sont aussi en accord avec ceux de Lamb (1976) qui a étudié l'innervation des principaux muscles du membre postérieur de Xénope. Cet auteur a aussi montré que les muscles dorsaux étaient innervés par des motoneurones latéraux et les muscles ventraux par des motoneurones médians.

Les études sur l'innervation des muscles des membres dans d'autres classes de Vertébrés ont montré une organisation de l'innervation motrice des membres ayant des points communs avec celle que nous venons de décrire. Chez les Mammifères, Romanes (1951, 1964) a étudié la position des motoneurones responsables de l'innervation des pattes de chat par la méthode de chromatolyse rétrograde. Cet auteur a montré comme nous l'avons observé chez le Pleurodèle que les motoneurones extenseurs étaient latéraux et que les motoneurones fléchisseurs étaient médians. Chez le poulet, la position des motoneurones responsables de l'innervation des muscles de membres postérieurs de poulet a été étudiée en détail par Landmesser (1978a) et par Hollyday (1980) en utilisant la technique de marquage à la peroxydase du raifort. La localisation des motoneurones chez le poulet est comparable à celle des Mammifères et des Amphibiens.

b) Deux types de motoneurones

Dans notre étude, nous avons rencontré deux types de motoneurones dans la moelle épinière, de grands motoneurones en position latérale et des petits motoneurones en position médiane. Carey (1982) et Stephens et Holder (1985) ont aussi identifié ces deux types de motoneurones dont la signification reste inconnue.

c) Limites d'utilisation de la technique de marquage à la peroxydase du raifort

Les résultats présentés regroupent les données obtenues sur 3 ou 4 animaux. La localisation des motoneurones innervant un même muscle est identique chez tous les animaux étudiés, mais le nombre de motoneurones marqués est variable d'un triton à un autre. Le marquage à la peroxydase du raifort est une bonne technique qualitative mais ne peut être utilisée pour estimer le nombre de motoneurones innervant un muscle donné.

II - VARIATION DE L'INNERVATION AU COURS DE LA CROISSANCE

Dans ce chapitre, nous étudierons tout d'abord la mise en place des nerfs dans le bourgeon du membre antérieur à partir d'examen ultrastructuraux. L'augmentation du nombre de fibres nerveuses au cours de la croissance sera analysée au cours des premiers stades larvaires sur des images de microscopie électronique et sera poursuivie sur des stades larvaires plus âgés à partir de coupes colorées au Bodian. Enfin, un comptage des motoneurones correspondants aux muscles du membre permettra de situer la période de mort cellulaire propre à tout membre de Vertébré ayant achevé sa morphogénèse.

A - Mise en place des nerfs dans le bourgeon du membre

Résultats :

Ce premier paragraphe repose essentiellement sur des données ultrastructurales car la technique de Bodian que nous avons adaptée au membre de Pleurodèle est inefficace pour déceler les petits nerfs des membres en formation probablement à cause d'un trop faible nombre de fibres nerveuses.

Au stade 36, le bourgeon de membre a la forme d'un cône allongé. C'est à ce stade qu'apparaissent les premières fibres nerveuses décelées en microscopie électronique au niveau proximal du bourgeon du membre antérieur (Pl.II.C). Des coupes faites à un niveau plus distal ne montrent aucune fibre nerveuse (Pl.II.B). Des coupes effectuées à des stades plus jeunes (stade 35) ne montrent pas non plus de fibres nerveuses (Pl.II.A). A ces stades, le mésenchyme est un ensemble de cellules indifférenciées. Le cytoplasme est très peu développé et le noyau occupe la majeure partie de la cellule. De plus, des espaces intercellulaires sont observés un peu partout et principalement dans les zones où apparaissent les premiers nerfs (Pl.II.C).

Au stade 38, le membre a la forme d'un cylindre dont l'extrémité ressemble à une palette échancrée. La moitié distale du bourgeon de membre est envahie par les nerfs (Pl.II.D, III.A,B) dont le nombre de fibres est peu élevé. On observe ici encore des cellules dont le rapport nucléoplasmique est élevé et qui sont séparées par de

larges méats. Par contre, à ce même stade 38, la différenciation musculaire débute dans la partie proximale (Pl.III.C). Des striations sont observées d'une façon discontinue au sein du muscle en formation. La photographie de la Pl.III.C représente un ensemble de 3 fibres musculaires juxtaposées au sein desquelles une striation apparaît dans certains compartiments. Le nerf, dont une vue à un plus fort grossissement est représentée Pl.III.D, montre une fibre nerveuse qui semble se détacher du faisceau de fibres et se diriger vers le muscle en différenciation.

Au stade 41, le membre antérieur possède deux doigts différenciés. Les nerfs contiennent plus de fibres nerveuses (Pl.IV.A) que ceux des stades précédents. Les premières fibres acquièrent de la myéline à partir du stade 45 (Pl.IV.C,D), le membre présentant alors quatre doigts. Les coupes ultrastructurales effectuées sur des membres de larves de stade 44 ne montrent pas encore de nerfs myélinisés. Les noyaux des cellules de Schwann deviennent remarquables à ce stade. Au niveau de l'avant-bras, il y a moins de fibres myélinisées (Pl.IV.B). La myélinisation semble donc commencer au niveau du bras et se continuer distalement dans l'avant-bras.

Discussion

L'étude dont nous venons de présenter les résultats relatifs au pleurodèle montre que l'invasion des nerfs s'opère à des stades précoces de formation du membre. Les premières fibres nerveuses atteignent la base du bourgeon de membre quand ce dernier a la forme d'un cône allongé dont la longueur de l'axe proximo-distal est triple du diamètre. De plus, les fibres groupées en faisceaux envahissent le bourgeon de membre au sein d'un mésenchyme indifférencié, plus particulièrement dans des espaces vides de cellules. La mise en place des nerfs précède donc la différenciation musculaire. Nous n'avons pas recherché le moment de l'établissement des synapses neuromusculaires mais il est probable qu'il coïncide avec la période de différenciation musculaire comme cela a été déterminé chez le poulet (Burke, 1981, Jolesz et Steter, 1981, cités par Vogel et Landmesser, 1987). La mise en place des nerfs dans les membres de poulet a fait l'objet d'études physiologiques et histologiques. Bennett et al (1980), en observant des images de microscopie électronique ont détecté des axones dans le bourgeon de membre au

stade 22 (table de Hamburger et Hamilton, 1951) quand le bourgeon a la forme d'un cône. En utilisant la coloration à l'argent, plusieurs auteurs (Landmesser et Morris, 1975 ; Lewis et al., 1981 ; Summerbell et Stirling, 1982) montrent chez le poulet, que les axones destinés à innerver les muscles se détachent des troncs nerveux principaux et se dirigent vers leurs cibles aux stades 26-27. A ce stade, les masses musculaires dorsales et ventrales ne sont pas encore clivées en muscles individuels. A partir d'études physiologiques, d'autres auteurs ont aussi abordé ce problème de l'innervation des muscles des membres de poulet. Aux stades 28-29, des électrodes sont placées sur un petit nombre de fibres musculaires de la masse ventrale. A ce niveau, on enregistre une activité électrique à la suite de stimulations de certains nerfs spinaux innervant cette masse musculaire ventrale (Landmesser, 1978b). A partir d'études physiologiques équivalentes, des synapses fonctionnelles ont été détectées dès le stade 26 1/2 (Lance-Jones et Landmesser, 1981 ; Hollyday, 1983 ; Tosney et Landmesser, 1985a, b).

B - Variation du nombre de fibres nerveuses au cours de la croissance larvaire

Résultats

La technique de Bodian, coloration spécifique des neurofibrilles qui apparaissent en noir, permet un comptage des fibres nerveuses qui composent les nerfs. Les comptages sont effectués selon la technique décrite dans Matériel et Méthodes sur les nerfs brachiaux et extenseurs situés au milieu des bras des larves de stades 45, 53, 55b, 55c et des animaux métamorphosés (stade 56) de 80 et 90 mm de longueur. Le comptage est effectué chez 3 animaux de chaque stade. La moyenne des 3 comptages est établie. Il nous a semblé intéressant d'établir un rapport entre le nombre de fibres nerveuses et la taille du membre. Nous avons considéré que l'aire d'une section transversale de membre était le meilleur choix parmi les éléments représentatifs de la croissance, puisqu'on ignore la représentation en fibres motrices et sensorielles dans les nerfs étudiés tout comme la destinée des fibres motrices et l'origine des fibres sensorielles composant ces nerfs. Dans le tableau I ont été regroupées les moyennes des valeurs des aires des coupes transversales de membre et celles

des nombres de fibres nerveuses. Ces mesures sont effectuées sur les 4 principaux nerfs du bras. L'addition de ces valeurs est rapportée dans la dernière colonne du tableau I. Cette étude utilisant la technique de Bodian ne permet pas de déceler les nerfs des membres sur les plus jeunes stades. Un complément est apporté par l'analyse des images de coupes ultrafines effectuée entre le stade 36 et 45. Elle ne concerne que quelques nerfs et le rapport entre le nombre de fibres nerveuses et la taille des bourgeons de membre n'a pas pu être établi (Tableau I). Rappelons qu'au stade 36, dans la partie proximale du bourgeon de membre apparaissent les premières fibres nerveuses. On compte 18 fibres dans le nerf brachial antérieur (Pl.II.C). Dans la partie distale d'un bourgeon de membre de larve de stade 38, on trouve des nerfs ayant la même taille que ceux présents dans le bourgeon proximal de

TABLEAU I

Variation du nombre de fibres nerveuses constituant les principaux nerfs du bras et leurs rapports avec la surface du plan de section transversal du bras de Pleurodèle au cours de la croissance. Chaque nombre est la moyenne de 3 mesures.

Technique utilisée	Stade	Aire d'une c. transv du bras en mm ²	Nombre de fibres nerveuses				Nombre total de fibres nerveuses des 4 nerfs	Nb. total de fibres nerveuses des 4 nerfs Aire	Nb. de fib. nerv. du nerf brachial Aire
			Nerf brachial		Nerf extenseur				
			antérieur	postérieur	cranial	caudal			
Microsc. électron.	36		18						
Microsc. électron.	38		42						
Microsc. électron.	45		112	102					
Bodian	45	0,83	36	23	26	6	91	109,63	71,08
Bodian	53	1,52	135	86	123	12	356	234,21	145,39
Bodian	55 (60 mm)	3,76	307	209	286	22	824	219,14	137,23
Bodian	55 (65 mm)	3,95	328	234	302	25	889	225,06	142,27
Bodian	56 (80 mm)	5,71	434	220	353	39	1046	183,18	114,53
Bodian	56 (90 mm)	6,75	548	316	387	52	1302	192,88	128



larves de stade 36. 21 fibres nerveuses composent le nerf interosseux (Pl.III.A,B). A un niveau proximal de ce même membre, on compte 42 fibres nerveuses dans le nerf brachial antérieur (Pl.III.D). Au stade 45, les nerfs sont de plus grande taille et contiennent plus de fibres nerveuses : 112 fibres entrent dans la formation du nerf brachial antérieur (Pl.IV.C).

A partir des comptages sur coupes colorées au Bodian, on constate qu'il y a une augmentation progressive du nombre de fibres nerveuses au cours du temps (tableau I). Quand on considère l'ensemble des 4 nerfs, on constate que le rapport du nombre de fibres nerveuses à l'aire du plan transversal du bras est à peu près constant (de l'ordre de 200) pour tous les stades sauf pour le stade 45. A cette exception près, il y a donc une augmentation du nombre de fibres nerveuses proportionnelle à la taille du membre. Pour le stade 45, le petit rapport obtenu (109) ne représente que la moitié des autres rapports. Cette faible valeur peut être liée au retard de l'innervation par rapport à la croissance du membre. Ce décalage se ferait sentir d'avantage au cours des stades précoces de développement qu'ultérieurement. Peut-être avons nous sous-estimé le nombre de fibres nerveuses composant les nerfs. De plus, la différence des nombres de fibres nerveuses des nerfs au stade 45 comptées sur les coupes ultrafines et les coupes colorées au Bodian est surprenante. La microscopie électronique révèle l'existence de 3 à 4 fois plus de fibres que l'histologie classique. Egar et Singer (1971), comparant les deux techniques de comptage dans un même nerf d'axolotl, ont montré que par la microscopie électronique, on comptait environ 70% de fibres nerveuses de plus que par la technique de Bodian. Ces auteurs pensent que la technique de Bodian ne permet de distinguer qu'une fraction des fibres non myélinisées. Peut-être que ces fibres enveloppées par une cellule de Schwann apparaissent comme une seule fibre sous le microscope photonique. Nous n'avons pas d'autre explication mais il nous faudra toutefois réaliser des études comparatives complémentaires afin de lever cette ambiguïté.

Discussion

L'étude dont nous venons de présenter les résultats montre qu'il y a une augmentation du nombre de fibres nerveuses proportionnelle à la taille du membre.

On se demande alors quelle peut être l'origine des fibres nerveuses qui viennent constamment grossir les nerfs. Rappelons que le nerf est constitué d'un ensemble de fibres nerveuses motrices et sensorielles. Si l'on suppose une croissance continue des muscles, l'augmentation du nombre de fibres nerveuses peut correspondre à une augmentation du nombre de fibres motrices peut être elle-même liée à une augmentation du nombre de motoneurones dans la moelle épinière. L'augmentation du nombre de fibres nerveuses au cours de la croissance peut aussi correspondre à une augmentation du nombre de fibres sensorielles. A notre connaissance, aucune étude de l'augmentation du nombre de fibres nerveuses des nerfs des membres en croissance n'a été faite. Par contre, des études de variation du nombre de motoneurones innervant les muscles des membres de *Rana pipiens* (Race et Terry, 1967) et de poulet (Hamburger, 1975 ; Lance-Jones, 1982) ont montré que les populations des motoneurones se stabilisent après la métamorphose chez la grenouille et après le 9ème jour d'incubation (stades 35-36) chez le poulet sans qu'aucune augmentation ultérieure ne soit perçue. Le pleurodèle semble donc constituer un modèle différent de la grenouille et du poulet. Il faudrait rechercher l'origine des fibres nerveuses constamment ajoutées aux nerfs tout au long de la croissance de ce triton. Une étude numérique des motoneurones innervant le membre aurait permis une réponse à cette question. Malheureusement, chez le pleurodèle, les motoneurones ne sont pas identifiables, comme ils le sont chez le poulet ou la grenouille.

Deuxième partie

INNERVATION DU MEMBRE REGENERE

Deuxième partie

INNERVATION DU MEMBRE REGENERE

La régénération des membres d'Urodèles conduit à la reconstitution exacte du segment amputé. Les mécanismes qui contrôlent la régénération des membres ont été longuement étudiés (revues Tank et Holder, 1981 ; Wallace, 1981). Peu de choses sont connues sur le contrôle de la croissance axonale et la formation de connexions neuromusculaires dans le membre régénéré. Avant d'entreprendre une recherche expérimentale sur l'établissement des connexions neuromusculaires des membres à formations surnuméraires, nous avons cherché à savoir si l'innervation de la partie régénérée du membre amputé était ou non identique à celle du membre normal.

I - Résultats

Nous avons tout d'abord établi le patron des nerfs et des muscles du membre régénéré, puis nous avons recherché la localisation des motoneurones innervant les principaux muscles de ce membre.

A - Patron des nerfs et des muscles

A l'aide de coupes sériées colorées à l'azan, nous avons examiné la répartition des nerfs et des muscles dans le membre régénéré. Dans tous les cas étudiés, les muscles régénérés occupent une position normale. Le patron des nerfs est aussi conforme à celui du membre non amputé.

B - Localisation des motoneurones innervant les principaux muscles du membre régénéré

Après avoir établi une carte des pools de motoneurones innervant les principaux muscles du membre antérieur de pleurodèle, nous avons étudié les pools de motoneurones innervant les muscles correspondants du membre

régénéré. L'innervation des quatre principaux muscles du membre : le complexe musculaire *anconaeus*, le muscle *humero-antebrachialis*, le muscle *extensor digitorum communis* et le muscle *flexor digitorum communis*, a été étudiée sur des membres régénérés d'animaux métamorphosés. Quatorze animaux ont été utilisés dans cette étude.

1) Motoneurones du complexe musculaire *anconaeus*. (Fig. 8A)

Dans le plan transversal de la moelle épinière, les motoneurones marqués correspondant au muscle *anconaeus* sont en positions dorsales et latérales, positions correspondant à celles des motoneurones du muscle témoin (Fig. 8A). Selon l'axe rostro-caudal, le pool moteur de ce muscle commence entre la deuxième et la troisième racine spinale, répartition identique à celle du membre normal, mais se termine au niveau de la quatrième racine spinale, soit un segment (30 coupes) en avant de celui du muscle correspondant du membre normal.

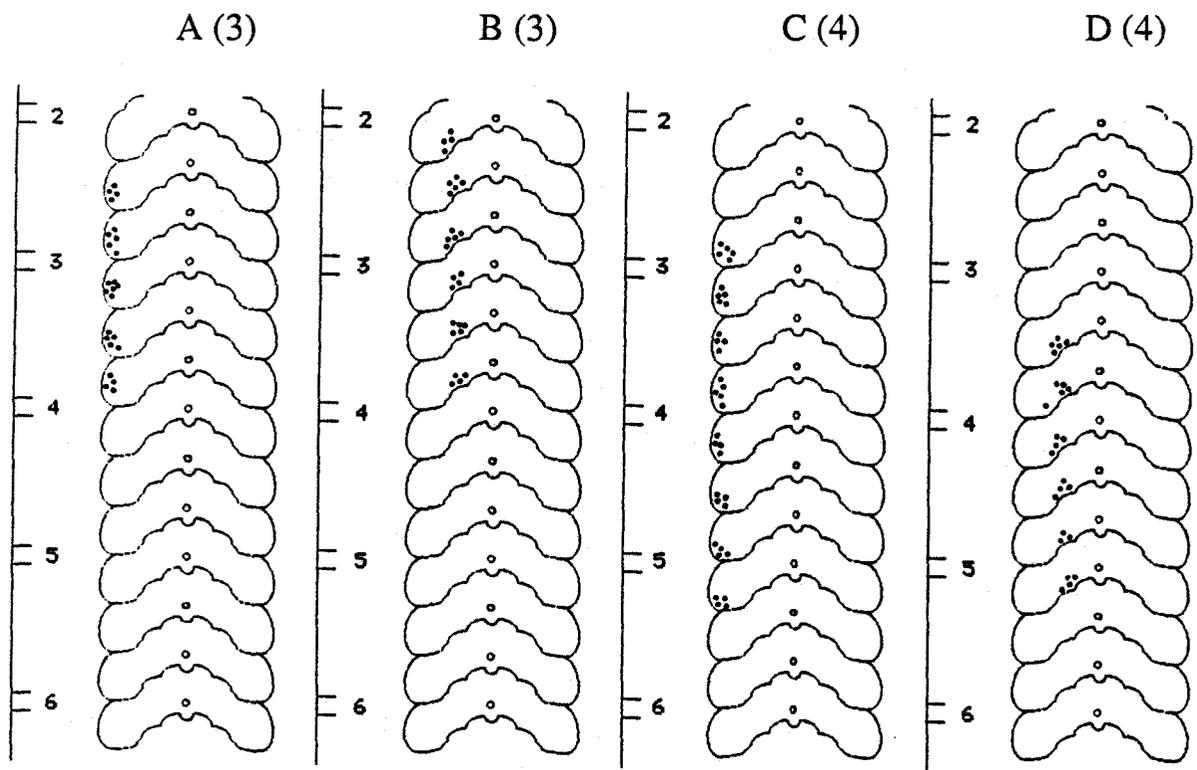


Fig. 8 - Localisation des pools des motoneurones innervant les quatre complexes musculaires du membre régénéré de Pleurodèle. A : *Anconaeus* ; B : *Humeroantebrachialis* ; C : *Extensor digitorum communis* ; D : *Flexor digitorum communis*.

2) Motoneurones du muscle *huméro-antebrachialis*. (Fig. 8B)

Le pool moteur de ce muscle a la même distribution que celui du muscle *humero-antebrachialis* du membre normal, aussi bien dans le plan transversal que selon l'axe rostro-caudal.

3) Motoneurones du muscle *extensor digitorum communis*. (Fig.8C)

Dans le plan transversal, les motoneurones marqués correspondant au muscle *extensor digitorum communis* ont des positions dorsales et latérales, positions correspondant à celle du muscle normal non régénéré. Par contre, le pool moteur commence au niveau de la troisième racine spinale et se termine un peu en arrière de la cinquième, ce qui l'allonge d'un segment vers l'arrière par rapport à celui du muscle correspondant du membre normal.

4) Motoneurones du muscle *flexor digitorum communis*. (Fig. 8D)

Dans la corne ventrale de la moelle épinière, les motoneurones marqués correspondant au muscle *flexor digitorum communis* sont localisés en positions ventrales, centrales et ventro-latérales, positions correspondant à celles du membre normal. Selon l'axe rostro-caudal, ce pool de motoneurones est plus rostral que celui du membre normal. Il débute entre la troisième et la quatrième racine spinale et se termine à la limite caudale de la cinquième. Ce pool est ainsi décalé globalement d'un segment (30 coupes) vers l'avant.

C) Etude quantitative des principaux nerfs (Tableau II)

Nous avons cherché à savoir si le nombre de fibres nerveuses constituant les principaux nerfs du bras a ou non varié au cours de la régénération. L'examen de coupes sériées colorées au Bodian montre que les nerfs du membre régénéré sont exactement dans les mêmes positions que ceux du membre normal. Le comptage des fibres nerveuses a été réalisé au milieu du bras de 6 animaux de stade 56, sur les deux nerfs brachiaux et les deux nerfs extenseurs. Il n'y a pas de différence significative entre les moyennes obtenues sur les membres régénérés et celles obtenues sur les membres normaux.

Tableau II - Nombre de fibres nerveuses constituant les principaux nerfs du bras du membre régénéré et normal de Pleurodèle. Chaque nombre est la moyenne de 3 mesures.

Stade		Nombre de fibres nerveuses				Nombre total de fibres nerveuses des 4 nerfs
		Nerf brachial		Nerf extenseur		
		antérieur	postérieur	cranial	caudal	
56 (80 mm)	Régénéré	382	225	365	23	995
	Normal	434	220	353	39	1046
56 (90 mm)	Régénéré	512	349	365	64	1290
	Normal	548	316	387	52	1302

Discussion

Le patron des muscles et des nerfs du membre régénéré est identique à celui du membre normal. Ces résultats confirment à la fois ceux de Piatt (1957b) et ceux de Grim et Carlson (1972, 1974). Piatt (1957b) a étudié la répartition des nerfs dans le membre régénéré d'axolotl et a montré qu'elle ne présentait pas de différence majeure avec celle du membre normal. Etudiant la morphogenèse régénératrice du membre d'axolotl, Grim et Carlson (1972, 1974) ont montré que la musculature du membre régénéré était identique à celle du membre normal.

Notre étude a porté aussi sur l'innervation motrice du membre régénéré de pleurodèle. Nous avons recherché la localisation des pools de motoneurones innervant les principaux muscles du membre régénéré. Les résultats présentés montrent clairement que la grande majorité des motoneurones qui réinnervent les muscles du membre régénéré sont dans la même position transversale que celle des motoneurones qui innervent le membre normal. Par contre, dans leur distribution rostro-caudale, les pools de motoneurones innervant les muscles du membre régénéré sont parfois décalés d'un segment (30 coupes) vers l'avant ou vers l'arrière. Il faut toutefois noter que des différences de cet ordre ont été rencontrées pour un même muscle étudié chez plusieurs animaux témoins.

Cette étude peut être comparée à celle de Stephens et Holder (1987) qui ont étudié l'innervation des muscles du membre régénéré d'axolotl par la technique de marquage à la peroxydase. Les 4 muscles étudiés par les auteurs sont ceux que nous avons étudiés chez le pleurodèle. Les muscles distaux régénérés sont innervés par des motoneurones situés dans la même position que ceux innervant les muscles distaux témoins. Par contre, les muscles proximaux régénérés sont innervés par un mélange de motoneurones. Certains correspondent au pool normal, d'autres correspondent au pool de motoneurones qui innervent normalement les muscles distaux. L'altération de l'innervation des muscles distaux observée chez l'axolotl n'a donc pas été retrouvée chez le pleurodèle. Nos résultats suggèrent que l'innervation du membre ne se fait pas au hasard, mais qu'il doit exister des mécanismes de guidage sélectif qui dirigent chaque axone vers sa cible appropriée. D'autres études sur la régénération des axones d'Urodèles ont été réalisées sans amputation du membre. Il a été montré que dans les membres dénervés (Cass et Mark, 1975) et les membres dans lesquels les nerfs ont été déviés (Grimm, 1971 ; Holder et al, 1982), les nerfs se régénéraient et étaient capables de retrouver leurs cibles correctes.

Troisième partie

**INNERVATION DES MEMBRES A FORMATIONS
SURNUMERAIRES**

Troisième partie

INNERVATION DES MEMBRES A FORMATIONS SURNUMÉRAIRES

Nous avons recherché quel pouvait être l'impact de telles altérations du patron de membre sur l'innervation. Dans un premier chapitre, nous avons établi les patrons des nerfs et muscles des formations surnuméraires. Dans un deuxième chapitre, nous avons recherché la localisation des pools de motoneurones innervant les principaux muscles des formations surnuméraires afin de voir si les muscles homologues présents dans deux ou trois composants d'un membre multiple partageaient un même pool de motoneurones. Dans un troisième chapitre, une étude quantitative des principaux nerfs des membres à formations surnuméraires a été réalisée afin de voir si une augmentation de taille de la cible avait un impact direct sur la quantité d'innervation. Celle-ci pouvant se manifester par un recrutement supplémentaire de neurones ou par un bourgeonnement local des fibres nerveuses.

Chez les Urodèles, la genèse de formations surnuméraires a été obtenue chez plusieurs espèces tant sur le plan transversal que selon l'axe proximo-distal. Ces formations surnuméraires contribuent, d'une part à augmenter la taille de la cible offerte aux neurones qui innervent le membre, et d'autre part à modifier les positions des cibles par rapport à la normale.

I - PATRON DES NERFS ET DES MUSCLES DES FORMATIONS SURNUMÉRAIRES

L'examen de coupes sériées colorées au Bodian nous a permis d'établir la répartition des muscles et des nerfs dans les membres à formations surnuméraires aussi bien transversales que proximo-distales.

A) Formations transversales

Cette étude a été réalisée sur les membres à formations surnuméraires

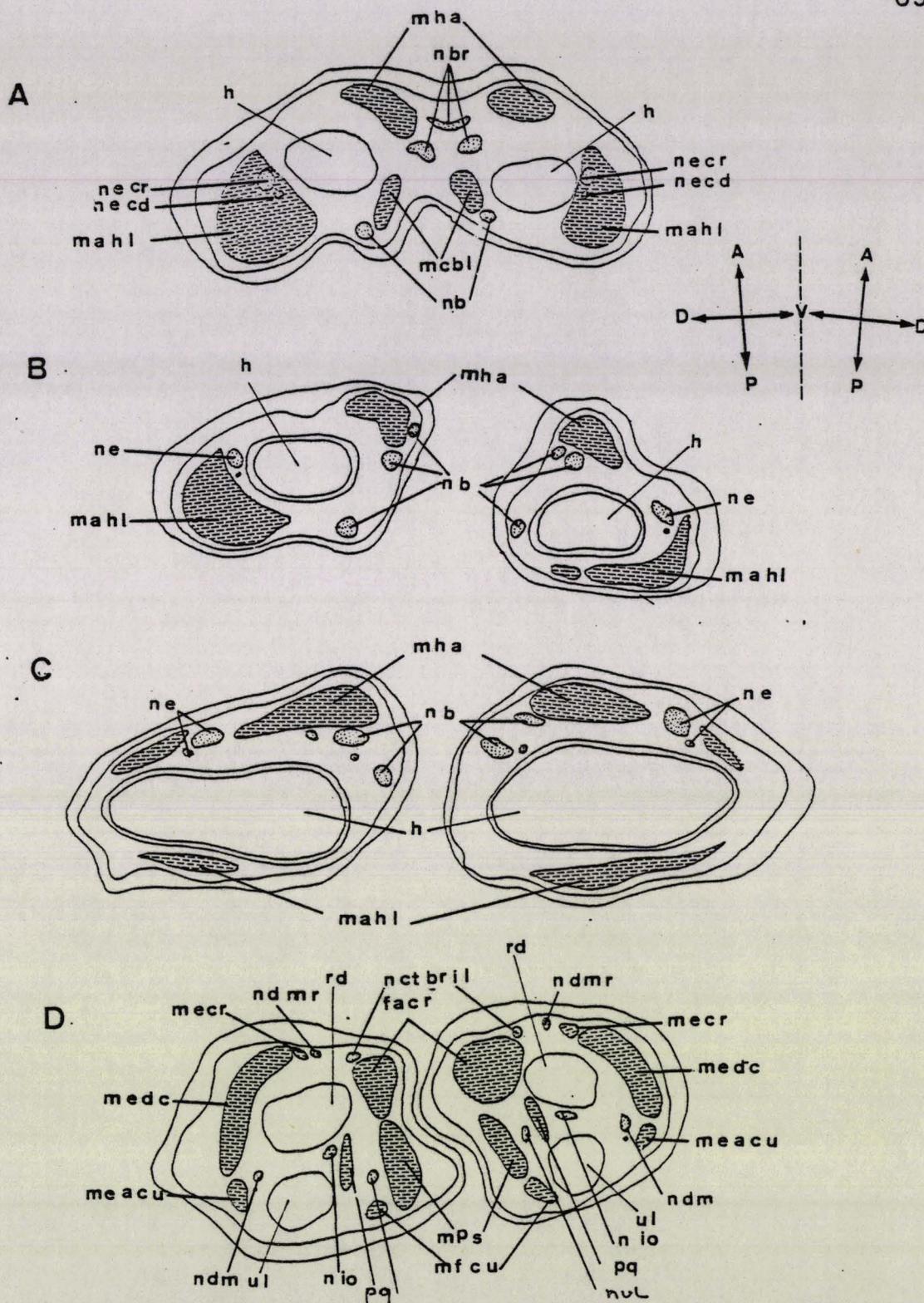


Fig. 9 - Coupes histologiques transversales de membre antérieur double de Pleurodèle.

A - Coupe transversale au niveau du bras proximal (x160)

B - Coupe transversale au milieu du bras (x160)

C - Coupe transversale au niveau du coude (x160)

D - Coupe transversale au milieu de l'avant-bras (x160)

Abréviations : voir Fig. 5 et 6 pages 16 et 18

résultant d'opérations effectuées tant chez la larve que chez l'embryon. Dans les 11 cas étudiés, les patrons des muscles et des nerfs dans les membres surnuméraires sont conformes à ceux du membre normal. La figure 9 montre la répartition des nerfs et des muscles dans un membre double obtenu chez une larve jeune traitée au palmitate de rétinol. Les patrons des nerfs et des muscles dans le membre axial sont normaux et ceux du membre dupliqué ventral sont conformes à ceux du membre contralatéral. En d'autres termes, la symétrie en miroir des deux membres est totale.

B) Formations proximo-distales.

Le patron des nerfs et des muscles dans les formations surnuméraires proximo-distales est aussi identique à celui du membre normal.

II. LOCALISATION DES POOLS DE MOTONEURONES INNERVANT LES MUSCLES DES FORMATIONS SURNUMÉRAIRES

Dans la première partie de notre mémoire, nous avons présenté les résultats concernant l'innervation du membre normal aussi bien par l'établissement du patron des nerfs que par la localisation des pools de motoneurones des principaux muscles du membre.

La recherche des mécanismes qui président à l'établissement des relations spécifiques entre les motoneurones et leurs cibles musculaires a été entreprise principalement chez le Poulet et à un degré moindre chez les Amphibiens, en altérant les positions relatives des neurones et des cibles au cours de la croissance embryonnaire ou encore en greffant des bourgeons de membres surnuméraires et en analysant les connexions neuromusculaires consécutives à ces opérations.

Afin de mieux comprendre comment s'établissent les relations entre les motoneurones médullaires et les muscles du membre chez le Pleurodèle, nous avons modifié la cible normale constituée par le membre simple en créant des membres à formations surnuméraires. Ces modifications ont été réalisées à des stades précoces du développement et à des stades larvaires, c'est à dire avant et après la mise en place de l'innervation du membre. Nous avons recherché l'origine des motoneurones innervant les muscles des formations surnuméraires. Nous exposerons successivement les résultats concernant l'innervation des formations surnuméraires

transversales et proximo-distales. Les membres témoins auxquels on se réfère au cours de l'exposé correspondent au membre régénéré dont les résultats sont exposés dans la deuxième partie du mémoire.

A - Formations transversales :

Résultats

1) FORMATIONS TRANSVERSALES OBTENUES SUR DES LARVES AGEES

On effectue des transplantations contralatérales de blastèmes de régénération en opposant les axes a-p ou les axes d-v du blastème et du moignon porte-greffe selon la méthode décrite dans Matériel et Méthodes.

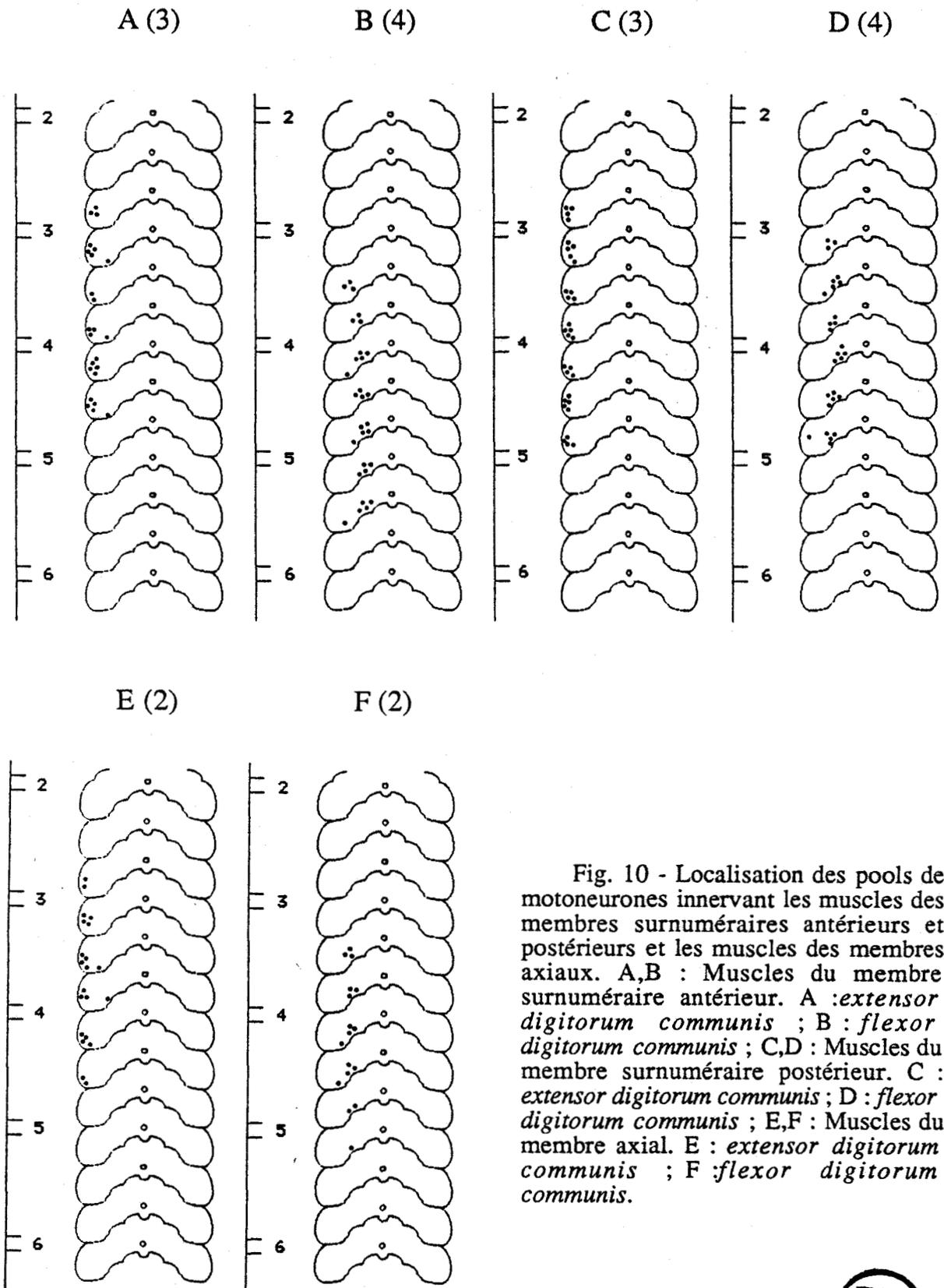
a -DUPLICATIONS ANTERIEURES ET POSTERIEURES

L'inversion de l'axe a-p du greffon par rapport à celui du moignon porte greffe conduit à la genèse de membres surnuméraires antérieur et postérieur en plus du membre axial inversé. On a alors un membre triple. Parfois, un seul membre surnuméraire se développe, et dans ce cas, c'est l'antérieur qui est le plus souvent présent.

Nous avons recherché la position des motoneurones innervant les muscles composant le membre axial et les membres surnuméraires antérieurs et postérieurs. Bien que les blastèmes soient prélevés et transplantés au niveau du bras proximal, les duplications ne s'observent le plus souvent qu'à partir du coude. C'est pourquoi, notre recherche s'est limitée à la localisation des pools de motoneurones innervant les deux muscles de l'avant-bras : le muscle *extensor digitorum communis* et le muscle *flexor digitorum communis*. Chaque muscle est étudié chez trois ou quatre animaux.

a1 - Membres surnuméraires antérieurs. (Fig. 10 A, B)

Nous avons étudié l'innervation de 7 membres surnuméraires antérieurs dont 4 appartiennent à des membres triples et 3 à des membres doubles. Les motoneurones marqués correspondant à chaque muscle sont caractérisés par leur position dans le plan transversal et leur distribution selon l'axe rostro-caudal de la moelle épinière. La figure 10 A, B, montre la position des pools moteurs des deux muscles étudiés



pour ces formations surnuméraires. Les points représentés dans chaque segment défini dans Matériel et Méthodes, correspondent au nombre total de motoneurones marqués dans les 30 coupes composant le segment. Plus précisément, ces nombres représentent la moyenne des résultats obtenus dans les échantillons étudiés.

§ Motoneurones du muscle *extensor digitorum communis*. (Fig. 10A)

Dans la corne ventrale de la moelle épinière observée en coupe transversale, les motoneurones innervant ce muscle sont localisés, dans la majorité des cas, en position dorsale et latérale. C'est la situation obtenue dans le membre normal. Toutefois, des motoneurones en position ventrale inappropriée ont été rencontrés chez l'un des trois animaux étudiés. Ils sont au nombre de 3 sur l'ensemble des 24 motoneurones marqués. Cette exception correspond probablement à une diffusion de la peroxydase à un muscle voisin lors de son injection dans le muscle *extensor digitorum communis*. La distribution rostro-caudale du pool moteur de ce muscle commence au niveau de la troisième racine spinale comme nous l'avons observé dans le membre normal, mais se termine un peu en avant de la cinquième racine spinale soit un segment (30 coupes) avant celle du pool moteur du muscle témoin correspondant. Ainsi, le pool du muscle *extensor digitorum communis* du membre surnuméraire antérieur se superpose presque totalement à celui du membre normal.

§ Motoneurones du muscle *flexor digitorum communis*. (Fig. 10B)

Dans le plan transversal, la position des motoneurones marqués innervant le muscle *flexor digitorum communis* est identique à celle du membre normal. Les motoneurones sont en positions ventrale, centrale et ventro-latérale. Selon l'axe rostro-caudal, le pool moteur de ce muscle est plus rostral que celui du membre normal. Il débute au niveau de la troisième racine spinale et se termine un peu en avant de la cinquième. Ce pool est décalé globalement de deux segments (60 coupes) vers l'avant par rapport à celui du membre normal.

a2 - Membres surnuméraires postérieurs. (Fig. 10C, D)

Sept membres surnuméraires postérieurs ont été étudiés. Ils proviennent tous de membres triples. La figure 10 C, D, montre la position des pools moteurs des deux muscles étudiés pour cette formation.

§. Motoneurones du muscle *extensor digitorum communis*.(Fig.10C)

Aussi bien dans le plan transversal que selon l'axe rostro-caudal de la moelle épinière, la position des motoneurones innervant ce muscle est similaire à celle du membre normal.

§. Motoneurones du muscle *flexor digitorum communis*. (Fig. 10D)

Dans le plan transversal, les motoneurones marqués correspondant au muscle *flexor digitorum communis* sont en positions ventrale, centrale et ventro-latérale, positions correspondant à celles du membre normal. Par contre, le pool moteur de ce muscle est plus rostral que celui du membre normal. Il commence au niveau de la troisième racine spinale et se termine à la limite rostrale de la cinquième. Il est ainsi décalé rostralement de deux segments par rapport au membre normal.

a3- Membres axiaux inversés selon l'axe a-p.(Fig. 10E, F)

Ces membres sont le résultat du développement des blastèmes greffés. Quatre membres ont été étudiés dans ce cas, dont deux appartiennent à des membres doubles et deux à des membres triples. La figure 10 E, F, montre la position des pools moteurs des deux muscles étudiés pour ces membres.

§. Motoneurones du muscle *extensor digitorum communis*.(Fig.10E)

Dans la corne ventrale de la moelle épinière, les motoneurones marqués correspondant au muscle *extensor digitorum communis* sont localisés en positions latérale et dorsale. Toutefois, quelques cellules nerveuses ventrales ont été observées dans les deux membres étudiés, elles sont au nombre de 3 parmi 21 motoneurones marqués. Selon l'axe rostro-caudal, le pool moteur de ce muscle a une distribution similaire à celle trouvée dans le membre normal.

§. Motoneurones du muscle *flexor digitorum communis*. (Fig.10F)

Dans le plan transversal de la moelle épinière, les motoneurones innervant se trouvent en positions centrale, ventrale et ventro-latérale. Ces positions sont celles du membre normal. Par contre, le pool moteur de ce muscle a une distribution plus rostrale que celle du membre normal. Il débute entre la troisième et quatrième racine spinale et se termine à la limite caudale de la cinquième. Ainsi, ce pool est décalé globalement d'un segment vers l'avant par rapport à celui du membre normal.

b - DUPLICATIONS VENTRALES

Aucun membre triple porteur de membres surnuméraires dorsaux et ventraux n'a été obtenu. Les membres doubles obtenus sont composés du membre inversé provenant du développement du blastème greffé et d'un membre surnuméraire ventral ayant l'orientation normale du membre porte-greffe. La duplication affecte l'avant-bras et parfois même seulement la main. Nous n'étudierons la position des motoneurones innervant les muscles des membres surnuméraires que lorsque ces derniers correspondront au moins à un avant-bras complet.

b1- Membres surnuméraires ventraux

La figure 11 A, B, montre la position des pools de motoneurones qui innervent les deux muscles suivants de l'avant-bras : le muscle *extensor digitorum communis* et le muscle *flexor digitorum communi*

§ Motoneurones du muscle *extensor digitorum communis*.(Fig.11A)

Dans la majorité des cas, les motoneurones correspondant à ce muscle occupent des positions dorsale et latérale. Quelques cellules nerveuses en position ventrale inappropriée ont été observées chez trois des quatre animaux étudiés. Elles sont au nombre de 4 parmi 28 motoneurones marqués. Les motoneurones en position ventrale sont inappropriés car ils innervent le muscle *flexor digitorum communis* dans le membre normal. Le long de l'axe rostro-caudal, le pool moteur de ce muscle débute au niveau de la troisième racine spinale et se termine au niveau de la cinquième, position du pool moteur du muscle correspondant du membre normal.

§. Motoneurones du muscle *flexor digitorum communis*. (Fig.10B)

Dans le plan transversal de la moelle épinière, les neurones moteurs ont une position identique à celle des neurones correspondants du membre témoin. Le long de l'axe rostro-caudal, le pool moteur du muscle *flexor digitorum communis* du membre surnuméraire est plus rostral que celui du membre normal. Il commence à la limite caudale de la troisième racine spinale et se termine au niveau de la cinquième. Il est globalement décalé de deux segments en avant de celui du membre normal.

b2- Membres axiaux

Cinq membres axiaux inversés selon l'axe d-v ont été étudiés. Trois proviennent de membres doubles et 2 correspondent au développement sans duplication du blastème greffé. La position dorso-ventrale des deux muscles étudiés est inversée par rapport au membre porte-greffe. La figure 11 C,D, montre la position des pools moteurs innervant les deux muscles étudiés.

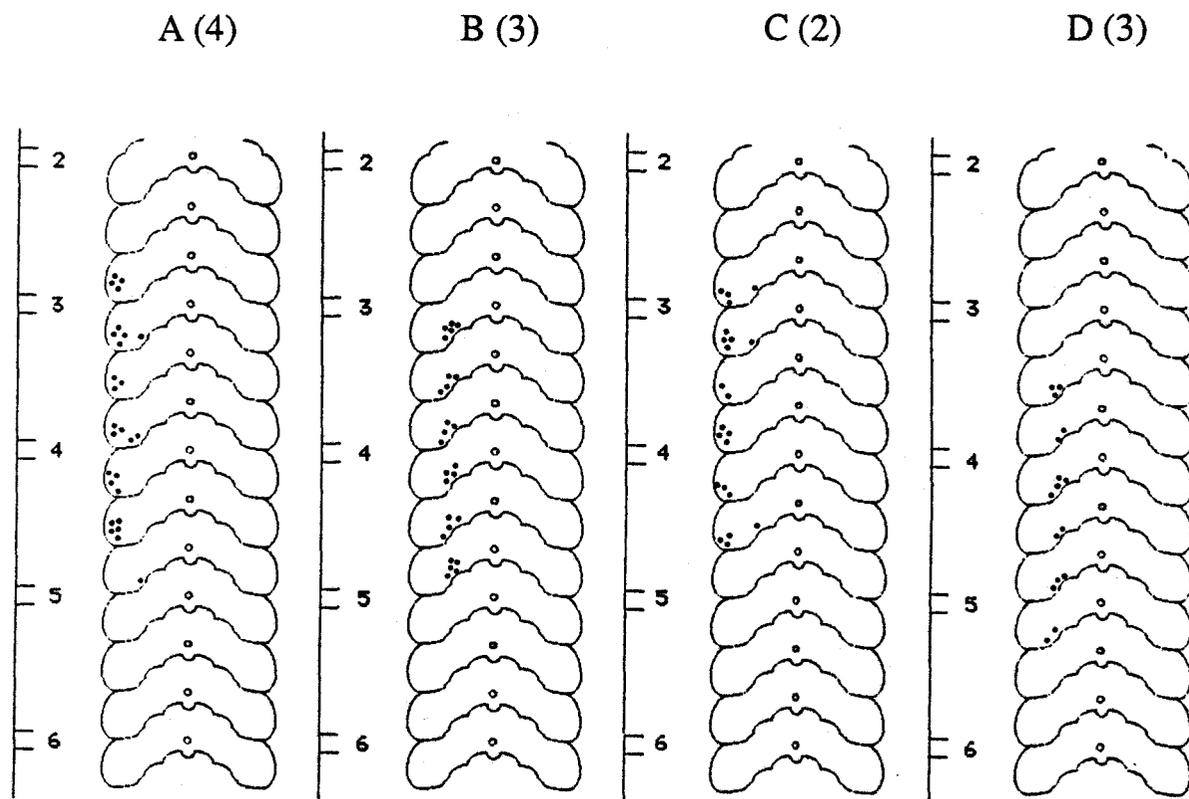


Fig. 11 - Localisation des pools de motoneurones innervant les muscles surnuméraires ventraux et les muscles des membres axiaux inversés selon l'axe d-v. A : Muscle *extensor digitorum communis* du membre surnuméraire ventral ; B : Muscle *flexor digitorum communis* ; C : Muscle *extensor digitorum communis* du membre axial ; D : Muscle *flexor digitorum communis*.

§ Motoneurones du muscle *extensor digitorum communis*.(Fig.11C)

Dans la corne ventrale de la moelle épinière, les motoneurones innervant le muscle *extensor digitorum communis* sont, dans la majorité des cas en positions latérale et dorsale. Toutefois, des cellules nerveuses en position ventrale ont été observées dans les deux cas étudiés. Elles sont au nombre de 3 parmi 21

motoneurones marqués. Ces motoneurones innervent habituellement le muscle *flexor digitorum communis* du membre normal.

§. Motoneurones du muscle *flexor digitorum communis*. (Fig.11D)

Les motoneurones innervant le muscle *flexor digitorum communis* du membre inversé selon l'axe d-v sont localisés en position identique à celle du membre témoin. La distribution du pool moteur de ce muscle selon l'axe rostro-caudal est plus rostrale que celle du membre normal. Elle est décalée globalement d'un segment vers l'avant.

2) FORMATIONS VENTRALES OBTENUES CHEZ DES LARVES JEUNES

Le traitement des membres antérieurs droits amputés de pleurodèle par le palmitate de rétinol permet de produire des membres doubles opposés par leurs faces ventrales. L'un d'eux a l'asymétrie du membre amputé droit : il est qualifié de membre axial. L'autre membre ventral a l'asymétrie du membre gauche et correspond au membre surnuméraire. Les membres obtenus sont parfois dupliqués à partir de l'épaule, mais souvent les duplications ne s'observent qu'à partir du coude.

Nous avons recherché la position des motoneurones innervant les muscles composant les membres surnuméraires ventraux. Quatre muscles sont étudiés : le muscle *anconaeus* (1 cas) et le muscle *huméro-antebrachialis* (1 cas) quand la duplication commence au niveau de l'épaule ; le muscle *extensor digitorum communis* (2 cas) et *flexor digitorum communis* quand la duplication s'observe à partir du coude. Il n'y a pas eu assez de tritons au membre droit dupliqué pour rechercher la localisation des pools de motoneurones innervant les muscles des membres axiaux.

§. Motoneurones du complexe *anconaeus*. (Fig. 12A)

Le pool de motoneurones innervant ce muscle a la même position que celui innervant le muscle correspondant du membre témoin.

§. Motoneurones du muscle *huméro-antebrachialis*. (Fig. 12B)

Dans la corne ventrale de la moelle épinière, les motoneurones marqués correspondant à ce muscle sont en positions centrales et ventrales. Toutefois, quelques cellules nerveuses sont en position inappropriée. On a en effet dénombré

deux cellules ventro-latérales sur un total de 15 motoneurones marqués. Selon l'axe rostro-caudal, le pool de motoneurones a la même distribution que celui du muscle *humero-antebrachialis* témoin.

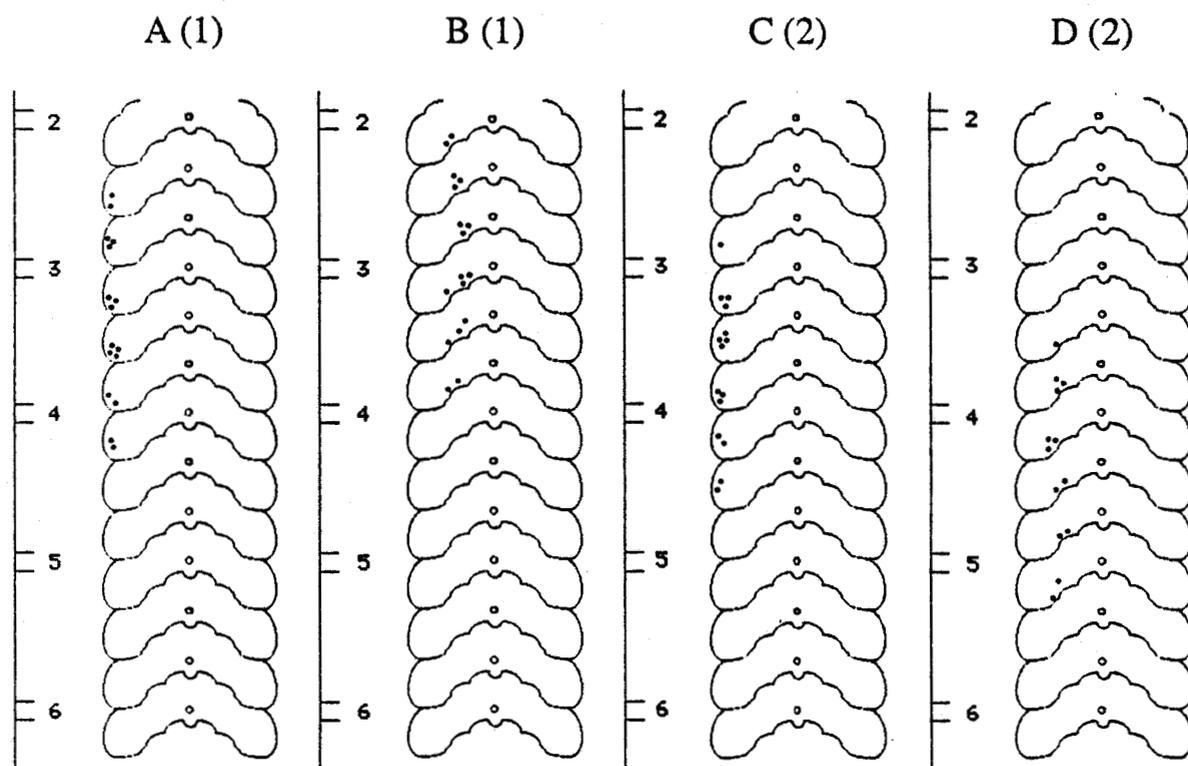


Fig. 12 - Localisation des motoneurones innervant les muscles de membres surnuméraires ventraux obtenus chez des larves jeunes. A : *anconaeus* ; B : *humero antebrachialis* ; C : *extensor digitorum communis* ; D : *flexor digitorum communis*.

§. Motoneurones du muscle *extensor digitorum communis*. (Fig. 12C)

Dans le plan transversal de la moelle épinière, le pool de motoneurones de ce muscle occupe une position latérale et dorsale, position conforme à celle du pool moteur du muscle témoin. Par contre, selon l'axe rostro-caudal, le pool est plus court que celui du muscle témoin. Il commence au niveau de la troisième racine spinale et se termine un peu avant la cinquième, soit un segment en avant du pool du muscle correspondant du membre normal, et 2 segments (60 coupes) en avant du pool du muscle correspondant du membre régénéré.

§. Motoneurones du muscle *flexor digitorum communis*. (Fig. 12D).

Les motoneurones innervant ce muscle sont en positions centrales, ventrales et ventro-latérales, positions conformes à celles des motoneurones innervant le muscle correspondant du membre normal. Selon l'axe rostro-caudal de la moelle épinière, ce pool est décalé globalement d'un segment vers l'avant par rapport à celui du muscle *flexor digitorum communis* normal. Par contre, il se superpose au pool correspondant du membre régénéré.

De l'ensemble de ces résultats, on peut conclure que les pools de motoneurones innervant les 4 muscles étudiés des membres surnuméraires ventraux se superposent presque parfaitement à ceux établis dans le cas du membre normal ou régénéré.

3) FORMATIONS VENTRALES OBTENUES CHEZ L'EMBRYON

Le transfert contralatéral du champ du membre d'un embryon à un autre aboutit parfois à la formation d'un membre double. Le membre surnuméraire est opposé au membre axial par sa face ventrale. Dans certains cas, la duplication s'observe à partir de l'épaule, dans d'autres cas, elle débute au niveau du coude. Nous avons étudié la localisation des pools de motoneurones innervant les principaux muscles du membre surnuméraire ventral: *anconaeus* (2 cas), *humero-antebrachialis* (1 cas), *extensor digitorum communis* (1 cas) et *flexor digitorum communis* (2 cas).

§. Motoneurones du complexe musculaire *anconaeus*. (Fig. 13A)

Dans la majorité des cas, les motoneurones innervant ce muscle sont en positions dorsales et latérales. Deux cellules en position ventro-latérale inappropriée ont été observées parmi 21 cellules nerveuses marquées. Selon l'axe rostro-caudal, le pool moteur de ce muscle a la même distribution que celle du pool témoin correspondant.

§. Motoneurones du muscle *humero-antebrachialis*. (Fig. 13B)

Aussi bien dans le plan transversal que selon l'axe rostro-caudal de la moelle épinière, les motoneurones innervant ce muscle sont dans la même position que ceux innervant le muscle correspondant du membre témoin.

§. Motoneurones du muscle *extensor digitorum communis*. (Fig. 13C)

Dans la corne ventrale de la moelle épinière, les motoneurones marqués

correspondant à ce muscle occupent des positions dorsale et latérale, positions conformes à celles du pool de motoneurones du muscle *extensor digitorum communis* du membre témoin. Selon l'axe rostro-caudal de la moelle épinière, le pool de motoneurones de ce muscle débute au niveau de la troisième racine spinale et se termine au niveau de la cinquième. Ainsi, ce pool débute un segment (30 coupes) en arrière du muscle correspondant des membres normal et régénéré.

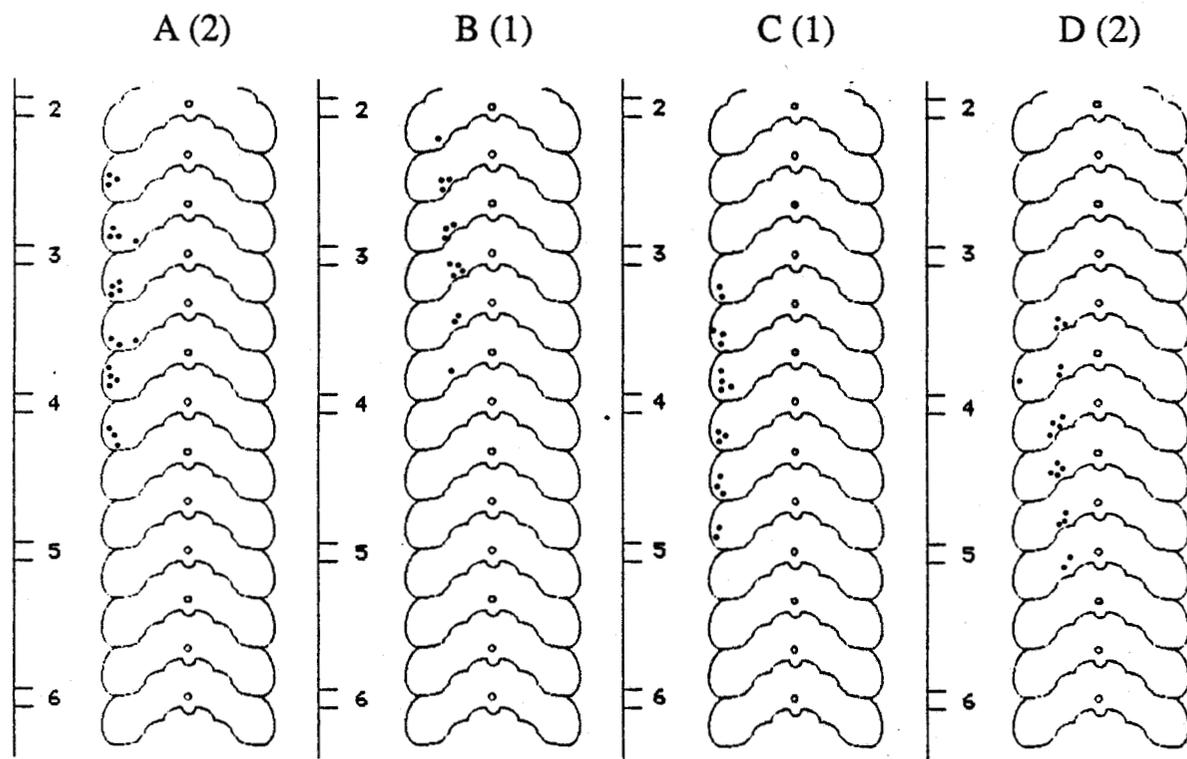


Fig 13 - Localisation des motoneurones innervant les muscles de formations surnuméraires ventrales obtenues chez l'embryon. A : *anconaeus* ; B : *humero antebrachialis* ; C : *extensor digitorum communis* ; D : *flexor digitorum communis*.

§. Motoneurones du muscle *flexor digitorum communis*. (Fig.13D)

La plupart des motoneurones innervant ce muscle sont en positions centrales, ventrales et ventro-latérales. Toutefois, 2 cellules en position dorsale inappropriée ont été observées parmi les 20 motoneurones marqués. Selon l'axe rostro-caudal, ce pool débute entre la troisième et la quatrième racine spinale et se termine un segment en arrière de la cinquième. Il est ainsi décalé globalement d'un segment vers l'avant

par rapport à celui du muscle correspondant du membre normal.

Comme nous l'avons vu dans le cas des formations surnuméraires obtenues chez les larves âgées et jeunes, les pools de motoneurones innervant un muscle donné ont, d'une façon générale une position conforme à celles des témoins.

Discussion

Un même pool de motoneurones innerve un même muscle quelque soit la position du membre correspondant par rapport au corps. Il y a donc une spécificité étroite entre les motoneurones et leurs cibles. De tels résultats sont obtenus aussi bien dans les membres simples en position normale (témoins) qu'inversée (issus d'un blastème greffé). De même, dans les membres multiples, les muscles homologues sont innervés par un même pool moteur. Enfin, cette spécificité est observée à la fois sur les membres opérés au stade embryonnaire et sur les membres opérés aux stades larvaires jeunes et âgés. A ces résultats considérés dans leur globalité, il faut toutefois mentionner l'existence de rares exceptions dont la présence peut être expliquée autrement que par l'établissement de connexions inappropriées. C'est ainsi que nous avons noté la présence de cellules nerveuses en positions transversales inappropriées mais en nombre très faible. Elles ne se rencontrent pas chez tous les animaux étudiés, et correspondent à un ou deux motoneurones parmi les 20 à 25 marqués. Leur présence est dûe probablement à une diffusion de la peroxydase à un muscle voisin au moment de son introduction dans le muscle étudié. Selon l'axe rostro-caudal du pool moteur, les variations de distribution, quand elles existent, correspondent à un décalage global du pool de motoneurones d'un segment (30 coupes) vers l'avant et exceptionnellement de deux segments. Il faut noter que des différences de cet ordre affectent parfois deux animaux d'une même série d'expériences.

Chez l'axolotl, Bennett et McGrath (1980) ont amputé au milieu du fémur les membres postérieurs de larves de 12 cm. La partie amputée est greffée sur place après une rotation de 180°, inversant les axes a.p. et d.v. des greffons. Dix animaux sur 32 ont présenté une formation surnuméraire. Les auteurs ont estimé par électrophysiologie le pourcentage de fibres musculaires innervées par les nerfs 16 et 17. Ce pourcentage est équivalent entre membres témoins et membres opérés,

inversés ou surnuméraires contralatéraux. La technique des auteurs permet d'estimer la distribution rostro-caudale du pool moteur des différents muscles étudiés. Les résultats des auteurs, tout comme les nôtres, suggèrent que les sites synaptiques ont des propriétés sélectives suffisantes pour déterminer le patron d'innervation des muscles du membre. D'autres expériences sur les Urodèles ont également permis de conclure que la réinnervation favorisait la restauration des connexions appropriées. Elles ont été effectuées sur des membres d'urodèles non amputés sur lesquels ont été réalisées des dénervations (Bennett et Raftos, 1977) des déviations de nerfs (Grimm 1971, Cass et al., 1973, Holder et al, 1982, 1984) et des modifications des positions des muscles cibles (Wigston, 1986).

Chez le poulet, des membres surnuméraires ont été obtenus soit par transfert de bourgeon de membre embryonnaire accompagné d'une rotation de ce bourgeon (Morris, 1978) soit par greffe d'un bourgeon supplémentaire auprès du bourgeon de membre en place (Hollyday, 1981). Malgré des petites variations dans la distribution rostro-caudale des pools de motoneurones innervant les membres surnuméraires, la position de ces pools dans la corne ventrale de la moelle épinière est identique à celle des pools de motoneurones du membre normal. D'autres types d'expériences réalisées chez le poulet, conduisent également à la suggestion d'une liaison spécifique entre motoneurones et cibles correspondantes. Lance-Jones et Landmesser (1980, a,b) ont effectué des délétions et des rotations de segments de la moelle épinière selon l'axe rostro-caudal. Ces auteurs ont montré, à l'aide de techniques histochimiques et physiologiques, que les axones des motoneurones n'établissaient des synapses qu'avec leurs cibles appropriées. Ceci suggère que les motoneurones possèdent une identité leur permettant de suivre des chemins spécifiques et de se lier aux muscles correspondants. Butler et al (1986) ont provoqué l'innervation inappropriée des muscles brachiaux en remplaçant les segments brachiaux du tube neural d'un embryon hôte par les segments thoraciques d'un embryon donneur, avant la croissance des motoneurones. Ils ont observé, par des techniques histologiques et histochimiques, qu'au début, il existe une union compatible entre les nerfs issus de la moelle thoracique et les muscles de l'aile, mais que durant les stades suivants de développement, il y a détérioration de cette relation jusqu'à une dénervation de

certains muscles puis une atrophie de ces derniers.

Par contre, des muscles dorsaux transplantés à la place des muscles ventraux du membre de poulet (Lance-Jones,) ont été innervés de façon inappropriée par des nerfs ventraux. De même, en inversant les bourgeons d'aile de poulet, Stirling et Summerbell (1985) ont montré que l'innervation des muscles était appropriée dans le cas d'inversion de l'axe a-p mais inappropriée dans le cas d'inversion de l'axe d-v.

Il semble donc que chez les Oiseaux l'innervation correcte des muscles de membre ne soit pas réalisée dans tous les types d'expériences présentés. Par contre, chez les Urodèles, les résultats montrent qu'au cours de la morphogenèse régénératrice, il y a toujours une réinnervation appropriée même quand les muscles ont une position relative modifiée. Il doit donc exister des mécanismes de guidage qui rétablissent les connexions appropriées et éliminent les liaisons neuromusculaires inappropriées. Des mécanismes semblables semblent présider à la mise en place des axones aussi bien dans le bourgeon de membre embryonnaire que dans le membre larvaire en régénération.

B - Formations proximo-distales

Par greffe d'un blastème proximal du membre antérieur sur le poignet du membre correspondant d'un autre animal, on peut obtenir un développement plus ou moins complet du blastème greffé (Lheureux, 1978). Dans les meilleurs cas, on observe à partir du poignet du membre greffé les segments successifs suivants : stylo-pode distal, zeugopode et autopode. Dans nos expériences se sont développés principalement des membres limités à un avant-bras et une main. Dans un seul cas, le membre comprenait stylo-pode, zeugopode et autopode. Pour ce membre surnuméraire, nous avons recherché les corps cellulaires des motoneurones innervant l'*anconaeus*. Pour les autres membres dupliqués proximo-distalement, ce sont les muscles de l'avant-bras, *extensor digitorum communis* et *flexor digitorum communis* qui ont fait l'objet d'une recherche d'innervation par marquage des corps cellulaires des motoneurones médullaires par la peroxydase.

Résultats

§ Motoneurones innervant l'*anconaeus* de la formation surnuméraire distale. (Fig.14A)

Dans la corne ventrale de la moelle épinière, les motoneurones innervant ce muscle sont en positions dorsales et latérales. Ce sont des motoneurones dans cette même position qui innervent l'*anconaeus* du membre normal. Selon l'axe rostro-caudal, le pool moteur de ce même muscle débute entre la deuxième et la troisième

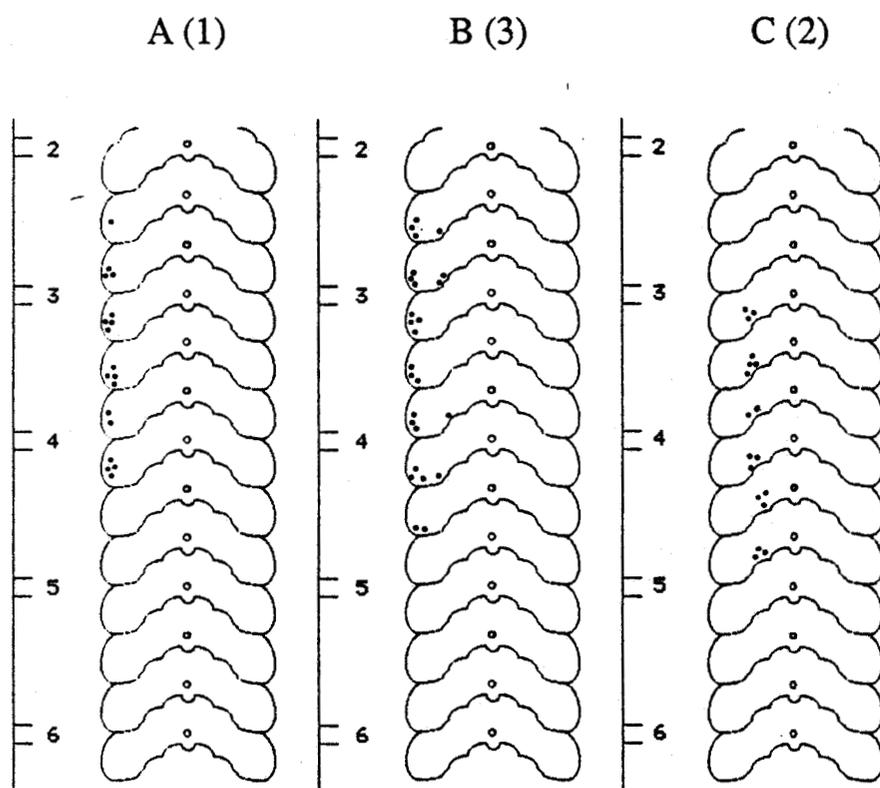


Fig. 14 - Localisation des motoneurones innervant les muscles des membres dupliqués proximo distalement. A : *anconaeus* ; B : *extensor digitorum communis* ; C : *flexor digitorum communis*.

sième racine spinale comme nous l'avions observé pour le membre normal mais il se termine entre la quatrième et la cinquième racine spinale soit un segment en arrière du pool de l'*anconaeus* du membre normal. Ce pool est ainsi un peu plus court que celui du membre normal.

§. Motoneurones innervant le muscle *extensor digitorum communis*.

(Fig.14B)

Cette étude a été réalisée sur trois animaux. Dans le plan transversal de la moelle épinière, les motoneurones innervant le muscle *extensor digitorum communis* chez deux animaux sont en position conforme à celle du muscle témoin correspondant. Par contre, chez le troisième animal, nous avons observé quelques cellules en position ventrale inappropriée. Elles sont au nombre de 5 parmi 26 motoneurones marqués. Selon l'axe rostro-caudal, le pool des motoneurones de ce muscle est plus rostral que celui du membre normal. Il débute au niveau de la deuxième racine spinale et se termine à la limite caudale de la quatrième. Le pool de motoneurones innervant ce muscle est donc décalé rostralement de deux segments (60 coupes sériées) par rapport à celui du membre normal. Ce léger décalage rostral superpose le pool de motoneurones du muscle *extensor digitorum communis* étudié et celui du muscle *anconaeus* témoin.

§. Motoneurones innervant le muscle *flexor digitorum communis*.

(Fig. 14C).

Dans le plan transversal de la moelle épinière, les motoneurones innervant ce muscle occupent une position identique à celle du muscle correspondant du membre normal. Selon l'axe rostro-caudal, le pool moteur de ce muscle commence à la limite caudale de la troisième racine spinale et se termine au niveau de la cinquième. Ainsi, par rapport au membre normal, ce pool est décalé globalement de deux segments vers l'avant.

Discussion

Nous avons créé des formations surnuméraires selon l'axe proximo-distal du membre. Le membre expérimental "trop long" contient donc une masse musculaire complémentaire offerte aux motoneurones ayant participé à l'innervation de la main du membre receveur. En utilisant le marquage rétrograde à la peroxydase, nous avons déterminé le patron des motoneurones responsables de l'innervation des principaux muscles du membre surnuméraire. Les résultats présentés ci-dessus montrent qu'en général, dans le plan transversal de la moelle épinière, les

motoneurones innervant ces muscles sont dans une position identique à celle des muscles correspondants du membre normal. La seule exception parmi les 3 membres étudiés est obtenue pour le muscle *extensor digitorum communis*. Quelques cellules nerveuses en position inappropriée ont été observées. Elles ne sont qu'au nombre de 5 parmi 26 motoneurones marqués. Elles correspondraient alors aux motoneurones du muscle *flexor digitorum communis*. On peut aussi supposer que cette exception est due à une diffusion de la peroxydase à un autre muscle lors de son introduction dans le muscle *extensor digitorum communis*. Selon l'axe rostro-caudal, les pools moteurs innervant les muscles des membres surnuméraires se superposent souvent aux pools innervant les muscles correspondants du membre normal. Toutefois, quelques différences ont été observées. Parfois, les pools de motoneurones sont décalés globalement d'un ou deux segments vers l'avant par rapport au membre normal. Il faut noter que des différences de cet ordre affectent parfois deux animaux d'une même série d'expériences. Ceci suggère que ce sont les mêmes motoneurones qui innervent à la fois les muscles de l'avant-bras porte-freffe et les muscles correspondants de l'avant-bras surnuméraire qui lui est directement attaché. En ce qui concerne le muscle *anconaeus* étudié, on ne peut exclure l'existence d'une innervation inappropriée qui serait réalisée entre ce muscle et les motoneurones du muscle extenseur de l'avant-bras. En effet, les pools de motoneurones de ces 2 muscles chevauchent sur les 3/4 de leurs longueurs.

Une étude comparable à celle que nous avons présentée a été réalisée sur l'axolotl par Stephens et al (1985). Ces auteurs ont étudié l'innervation des membres dupliqués selon l'axe proximo-distal. Ils ont établi le patron des motoneurones innervant les principaux muscles du bras ou de la cuisse surnuméraires. Les muscles proximaux surnuméraires sont innervés par les motoneurones qui innervent normalement la musculature distale du membre. L'innervation des muscles distaux surnuméraires n'a pas été étudiée par ces auteurs. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Whitelaw et Hollyday (1983) qui ont montré que, chez le poulet, les muscles de la cuisse surnuméraire distale étaient innervés par un petit nombre de motoneurones innervant normalement la musculature du pied. L'observation de nos présents résultats relatifs aux muscles de l'avant-bras suggère que les axones

régénérés retrouvent des cibles homologues. Pour étendre ces conclusions à l'innervation des muscles proximaux en situation distale par rapport à l'avant-bras, il nous faudra plutôt étudier l'innervation du muscle *huméro-antebrachialis* surnuméraire dont le pool normal de motoneurons ne se superpose à aucun autre. On pourra ainsi comparer le mode d'innervation de ce muscle surnuméraire à ceux définis par Stephens et al (1985) chez l'axolotl et Whitelaw et Hollyday (1983) chez le poulet.

Stirling et Summerbell (1977) ont provoqué par contre des délétions proximales et distales dans l'aile de poulet et ils ont étudié l'innervation des parties restantes. Leurs résultats ont montré que les nerfs spinaux retrouvent toujours leur cible musculaire suggérant que le trajet des nerfs est prédéterminé et que les nerfs innervent seulement leurs muscles appropriés indépendamment de la localisation de ces derniers. Nos résultats semblent confirmer cette suggestion.

III - ETUDE QUANTITATIVE DES PRINCIPAUX NERFS DES MEMBRES A FORMATIONS SURNUMERAIRES

La méthode de marquage rétrograde a permis de localiser les motoneurons innervant les principaux muscles des membres à formations surnuméraires mais n'a pas permis leur comptage. Pour compléter cette étude, nous avons eu recours à une méthode quantitative qui a été abordée par le comptage des fibres nerveuses des principaux nerfs de ces membres.

Dans la première partie, nous avons montré qu'il y avait une augmentation du nombre de fibres nerveuses des nerfs des membres en croissance. Le nombre de fibres nerveuses est proportionnel à la taille du membre. Nous allons voir si l'augmentation artificielle de la taille du membre par création de formations surnuméraires peut augmenter le nombre de fibres nerveuses composant les nerfs des membres multiples.

A - Résultats

Cette étude a été réalisée sur les membres multiples qui ont été utilisés dans l'étude de la localisation des pools des motoneurones. Ces membres ont été obtenus par des opérations réalisées sur des larves âgées ou jeunes et sur des embryons.

1) Formations surnuméraires obtenues chez les larves âgées

Six membres ont été utilisés, 4 triples et 2 doubles. Les membres triples proviennent tous du développement de membres portant un blastème contralatéral dont l'axe a-p est inversé. L'un des membres doubles a été obtenu par la même procédure et l'autre provient du développement d'un membre portant un blastème contralatéral dont l'axe d-v est inversé. Tous ces membres sont dupliqués à partir du coude. Le comptage des fibres nerveuses est réalisé dans les nerfs du bras et dans les nerfs des 3 ou 2 avant-bras de chaque membre multiple. Les nerfs correspondants du membre contralatéral régénéré servent de témoins. Le tableau III regroupe les résultats des comptages des fibres nerveuses dans 4 nerfs du bras et 6 nerfs de l'avant-bras. Le nombre de fibres nerveuses de chaque nerf est ramené à une unité de surface arbitraire obtenue en établissant le rapport du nombre de fibres nerveuses à l'aire de la coupe transversale du niveau correspondant du membre. Ces données permettent une meilleure comparaison entre les nerfs homologues des membres différents.

Au niveau de l'avant-bras, les 2 ou 3 formations surnuméraires ont des tailles différentes mais inférieures à celle du membre témoin (Tableau IIIa). Les aires de coupes transversales des avant-bras du membre multiple ont des valeurs variant entre 50% et 100% de celle de l'avant-bras contralatéral du même animal. Ramené à une unité de surface arbitraire, les valeurs établies pour chacun des 6 nerfs de l'avant-bras de chaque composant du membre multiple sont comparables à celles du membre témoin contralatéral. En d'autres termes, dans un membre triple, le nombre global de fibres nerveuses comptées dans les 3 nerfs homologues est triple, voire dans certains cas supérieur au triple du nombre de fibres nerveuses du nerf correspondant de l'avant-bras témoin. Dans les membres doubles, le contingent global de fibres nerveuses est double de celui du témoin contralatéral.

Tableau IIIa Nombre de fibres nerveuses constituant les nerfs des avant-bras des formations surnuméraires obtenues chez la larve âgée. Les nombres entre pa renthèses représentent le rapport du nombre de fibres nerveuses à l'aire d'une coupe transversale de l'avant-bras. (Les abréviations des nerfs sont celles de la Fig.6 p.17)

Numéro de l'animal opéré	Membre Etudié	Composants du membre multiple	Aire d'une coupe transv. d'a-bras en mm ²	Nombre de fibres nerveuses						Nombre total de fibres nerv. des 6 nerfs
				n.d.m.f.	n.d.m.u	n.d.m.l.	n et br.i.l.	n. co.	n. ul.	
1	témoin	témoin	6,99	94 (13)	57 (8)	105 (15)	53 (7)	128 (8)	128 (8)	565 (81)
	membre triple	antérieur axial postérieur	4,75	92 (19)	47 (10)	87 (18)	24 (5)	113 (23)	49 (10)	412 (87)
		témoin	témoin	3,84 6,16	78 (20) 104 (17)	30 (8) 94 (15)	62 (16) 120 (19)	30 (8) 65 (10)	105 (27) 132 (21)	52 (13) 69 (11)
2	témoin	témoin	6,75	94 (14)	58 (9)	110 (16)	87 (13)	147 (22)	72 (11)	568 (84)
	membre triple	antérieur axial postérieur	5,21	87 (17)	48 (9)	94 (18)	45 (9)	120 (23)	58 (11)	365 (70)
		témoin	témoin	3,49 4,24	51 (15) 79 (19)	42 (12) 52 (12)	88 (25) 88 (21)	53 (15) 62 (15)	101 (29) 114 (27)	41 (12) 50 (12)
3	témoin	témoin	6,76	112 (17)	77 (11)	76 (11)	48 (7)	185 (27)	90 (13)	588 (87)
	membre triple	antérieur axial postérieur	5,45	79 (14)	63 (12)	119 (22)	79 (14)	123 (23)	67 (12)	530 (97)
		témoin	témoin	7,69	117 (15)	86 (11)	131 (17)	71 (9)	114 (15)	78 (10)
4	témoin	témoin	6,76	77 (11)	52 (8)	76 (11)	45 (7)	185 (27)	90 (13)	525 (78)
	membre triple	antérieur axial postérieur	3,2	48 (15)	41 (13)	80 (25)	67 (21)	96 (30)	38 (12)	370 (116)
		témoin	témoin	5,04 5,28	72 (14) 73 (14)	49 (10) 56 (11)	96 (19) 106 (20)	83 (16) 85 (16)	104 (21) 119 (23)	65 (13) 73 (14)
5	témoin	témoin	6,01	89 (15)	81 (13)	112 (19)	67 (11)	125 (21)	70 (12)	544 (91)
	membre double	antérieur axial	6,23	79 (13)	73 (12)	108 (17)	75 (12)	132 (21)	76 (12)	543 (87)
		témoin	témoin	5,07	71 (14)	64 (13)	117 (23)	61 (12)	98 (19)	61 (12)
6	témoin	témoin	6,14	72 (12)	59 (10)	102 (17)	56 (9)	109 (18)	58 (9)	456 (74)
	membre double	axial ventral	5,87	64 (11)	54 (9)	75 (13)	47 (8)	89 (15)	45 (8)	374 (64)
		témoin	témoin	5,34	58 (11)	48 (9)	88 (16)	51 (10)	82 (15)	31 (6)

Dans chaque bras, élément proximal à la duplication ou à la triplification, le nombre de fibres nerveuses des 4 nerfs est voisin de celui des nerfs homologues du bras contralatéral (Tableau IIIb). Le rapport du nombre de fibres d'un nerf du bras opéré à celui du nerf correspondant contralatéral est légèrement supérieur à l'unité. La moyenne établie pour l'ensemble des mesures est égale à 1,14. Puisque cette moyenne est bien inférieure au triple ou au double de celle du membre témoin, ce ré-

Tableau IIIb

Nombre de fibres nerveuses constituant les nerfs des bras des membres à formations surnuméraires obtenus chez la larve âgée. Les nombres entre parenthèses représentent le rapport du nombre de fibres nerveuses à l'aire d'une coupe transversale du bras.

Numéro de l' animal opéré	Membre étudié	Aire d'une coupe transvers. de bras en mm ²	Nombre de fibres nerveuses				Nombre total de fibres nerveuses des 4 nerfs
			Nerf brachial		Nerf extenseur		
			antérieur	postérieur	cranial	caudal	
1	témoin	4,92	429 (87)	266 (54)	365 (74)	123 (25)	183 (240)
	membre triple	5,23	445 (85)	282 (53)	375 (72)	185 (35)	1287 (246)
2	témoin	6,82	512 (75)	349 (51)	365 (53)	64 (9)	1290 (189)
	membre triple	7,22	637 (88)	462 (64)	371 (51)	102 (14)	1572 (217)
3	témoin	6,75	548 (81)	316 (47)	337 (50)	102 (15)	1303 (193)
	membre triple	7,69	513 (67)	355 (46)	419 (54)	93 (12)	1893 (246)
4	témoin	5,21	415 (80)	202 (39)	382 (73)	94 (18)	1093 (210)
	membre triple	7,04	481 (68)	335 (48)	391 (56)	76 (11)	1285 (183)
5	témoin	5,78	420 (73)	215 (37)	333 (56)	42 (7)	1010 (175)
	membre double	5,89	437 (74)	242 (41)	345 (59)	54 (9)	1078 (183)
6	témoin	6,51	495 (76)	351 (54)	350 (54)	69 (11)	1265 (194)
	membre double	6,83	536 (78)	374 (55)	407 (60)	84 (12)	1401 (205)

sultat implique l'existence d'un bourgeonnement des axones et des dendrites au niveau de la duplication. En effet, les données excluent l'hypothèse d'un recrutement supplémentaire important de neurones médullaires et ganglionnaires. Ce recrutement correspond au mieux à 14% de neurones. On remarque toutefois que le nombre de fibres nerveuses par unité de surface dans les bras opérés est similaire à celui des membres témoins, la taille des bras opérés étant légèrement supérieure à celle des membres régénérés contralatéraux.

2 - Formations surnuméraires obtenues chez les jeunes larves

Trois membres doubles, dupliqués à partir de l'épaule et opposés par leur face ventrale ont été étudiés. Un comptage des fibres nerveuses des nerfs brachiaux et extenseurs est réalisé au milieu des bras des membres doubles et des membres témoins contralatéraux (Tableau IV). Toutes les valeurs étant ramenées à une unité de

Tableau IV : Nombre de fibres nerveuses constituant les nerfs des bras des membres à formations surnuméraires obtenus chez la jeune larve (les numéros entre parenthèses représentent les rapports du nombre de nerfs à l'aire d'une coupe transversale du bras).

Numéro de l'animal opéré	Membre étudié	Composants du membre double	Aire d'une coupe transv. de bras (mm ²)	Nombre de fibres nerveuses				Nombre total de fibres nerveuses des 4 nerfs
				Nerf brachial		Nerf extenseur		
				antérieur	postérieur	cranial	caudal	
1	témoin	témoin	4,48	337 (75)	214 (48)	269 (60)	45 (10)	865 (193)
	membre double	avant bifurcation	6,3	676 (107)	395 (63)	411 (65)	83 (13)	1565 (248)
		axial ventral	4,04 3,24	397 (98) 279 (86)	220 (54) 173 (53)	286 (71) 165 (51)	53 (13) 32 (10)	956 (237) 649 (200)
2	témoin	témoin	6,93	438 (63)	314 (45)	320 (46)	44 (6)	116 (161)
	membre double	axial ventral	6,81 3,2	366 (53) 248 (77)	292 (42) 200 (62)	329 (48) 214 (66)	79 (12) 56 (17)	1066 (157) 718 (224)
3	témoin	témoin	1,04	58 (56)	50 (48)	46 (44)	11 (11)	165 (159)
	membre double	axial ventral	1,13 0,98	60 (53) 55 (56)	50 (44) 53 (54)	55 (49) 60 (61)	9 (8) 7 (7)	174 (154) 175 (179)

surface arbitraire, les nombres de fibres nerveuses des nerfs homologues des bras témoins et dupliqués sont voisins. Le nombre global de fibres nerveuses atteint donc des valeurs doubles et même bien souvent un peu supérieures à celles des membres témoins contralatéraux (Tableau IV). Comparer par exemple, dans le nerf brachial antérieur : 75 à 98+86 ; 63 à 53+77 et 56 à 53+56.

Les 4 nerfs du bras observés à un niveau proximal à la dichotomie contiennent un très grand nombre de fibres nerveuses. Un seul exemple a été étudié (Tableau IV, animal No1). Lorsqu'on établit le rapport de ce nombre à celui du nerf homologue du bras contralatéral, on obtient les valeurs respectives suivantes : 2 ; 1,84 ; 1,52 et 1,84 pour les nerfs brachiaux antérieur et postérieur et les nerfs extenseurs cranial et caudal. La valeur de ces moyennes est égale à 1,80. Ces résultats démontrent, à la différence de ce que l'on a obtenu avec les larves âgées, que les fibres nerveuses supplémentaires liées aux duplications précoces correspondent probablement à des neurones médullaires ou ganglionnaires supplémentaires, ce qui n'exclut pas qu'une fraction des fibres nerveuses additionnelles soit liée à un bourgeonnement d'axones ou de dendrites.

3 - Formations surnuméraires obtenues chez l'embryon

Un seul membre double a été étudié à ce jour. La duplication affecte l'avant-bras. Le comptage des nerfs a été réalisé à la fois au niveau du bras du membre double et du membre témoin contralatéral ainsi qu'au niveau des avant-bras du membre double et du membre témoin.

Au niveau de l'avant-bras, les deux composants du membre double ont des tailles différentes (Tableau Va). L'avant-bras dorsal a une taille proche de celle de l'avant-bras contralatéral. Le nombre de fibres nerveuses constituant leurs nerfs est à peu près équivalent. L'avant-bras ventral du membre double est plus petit mais ses nerfs contiennent autant de fibres nerveuses par unité de surface (Tableau Va). Comme on l'a vu préalablement, il y a dans chaque élément dupliqué proportionnalité entre le nombre de fibres nerveuses et la taille du membre.

Au niveau du bras, le membre à formations surnuméraires présente dans chaque nerf un nombre double de fibres nerveuses de celui du membre contralatéral (Tableau Vb). Le rapport moyen du nombre de fibres nerveuses des nerfs du bras

opéré à celui du bras contralatéral est égal à 2,3. Il témoigne très probablement de l'existence d'un recrutement de neurones largement suffisant pour exclure la nécessité d'un bourgeonnement d'axones ou de dendrites au niveau de la duplication.

Tableau Va : Nombre de fibres nerveuses constituant les nerfs des avant-bras des formations surnuméraires obtenues chez l'embryon. Les nombres entre parenthèses représentent le rapport du nombre de fibres nerveuses à l'aire d'une coupe transversale de l'avant-bras. Abréviations : voir Fig. 6

No de l'animal opéré	Membre étudié	Composants du membre double	Aire c. tr. mm ²	Nombre de fibres nerveuses						Nb total de f. nerveuses des 6 nerfs
				ndmr	ndmu	ndml	nctbril	nio	nul	
1	témoin	témoin	3,49	112 (32)	64 (18)	73 (21)	53 (15)	128 (37)	58 (17)	488 (140)
	membre double	axial	3,04	105 (35)	57 (19)	88 (29)	37 (12)	199 (65)	78 (26)	564 (186)
		ventral	2,08	32 (15)	27 (13)	51 (25)	26 (12)	84 (40)	44 (21)	264 (127)

Tableau Vb : Nombre de fibres nerveuses constituant les nerfs du bras du membre à formations surnuméraires obtenu chez l'embryon. (les numéros entre parenthèses représentent le rapport du nombre de fibres nerveuses à l'aire d'une coupe transversale du bras)

Numéro de l'animal opéré	Membre étudié	Aire d'une coupe transvers. de bras en mm ²	Nombre de fibres nerveuses				Nombre total de fibres nerveuses des 4 nerfs
			Nerf brachial		Nerf extenseur		
			antérieur	postérieur	cranial	caudal	
1	témoin	3,14	260 (82)	184 (59)	292 (93)	47 (15)	783 (249)
	membre double	3,74	509 (136)	429 (115)	602 (161)	143 (38)	1683 (450)

B - Discussion

Dans les trois ensembles expérimentaux qui viennent d'être présentés, l'obtention de membres multiples a eu lieu à différents stades de développement du Pleurodèle.

Chez les larves âgées, la transplantation de blastèmes a eu lieu bien après l'établissement des connexions neuromusculaires. Chez les larves jeunes (stade 36/37) traitées à la vitamine A, la production de membres doubles est contemporaine de la mise en place des nerfs des membres. Enfin, chez l'embryon, les duplications sont antérieures à l'innervation.

Un certain nombre de résultats relatifs à l'innervation des éléments dupliqués sont communs aux 3 ensembles expérimentaux. Nous avons en effet montré, par comptage des fibres des principaux nerfs, que le nombre de fibres nerveuses par unité de surface était constant, c'est-à-dire que l'innervation de chacun des éléments dupliqués est identique à celle de l'élément simple contralatéral correspondant. L'existence d'un nombre global de fibres nerveuses double au niveau des éléments dupliqués peut correspondre à deux origines différentes. Ou bien il s'agit d'un recrutement de neurones supplémentaires ou bien les fibres nerveuses des niveaux proximaux non dédoublés ont bourgeonné des fibres supplémentaires. Nos résultats montrent que cette double origine est possible mais à des degrés variables selon les ensembles expérimentaux considérés. Chez les larves âgées, le recrutement des neurones semble faible (14%), ce qui implique un important bourgeonnement des fibres nerveuses sectionnées lors de l'opération chirurgicale. Chez les jeunes larves, un recrutement neuronal important semble être lié à l'augmentation de l'innervation périphérique. Toutefois, un pourcentage de 20% des fibres nerveuses ne s'explique que par un bourgeonnement des fibres nerveuses plus proximales. Enfin, les membres doubles induits chez l'embryon semblent innervés par un contingent de neurones double de celui du membre témoin. Des études histologiques et physiologiques permettraient d'estimer d'une part la quantité de neurones supplémentaires et d'autre part l'étendue du bourgeonnement axonal. En effet, pour l'instant, rien ne nous permet d'affirmer l'existence d'un recrutement neuronal complémentaire lié à la genèse de formations surnuméraires.

Des recherches quantitatives de l'innervation des membres de vertébrés n'ont pas été abordées suivant des méthodes identiques aux nôtres mais plusieurs auteurs ont étudié l'influence de la taille de la cible sur la quantité de motoneurones présents dans la colonne motrice médullaire correspondante. Des bourgeons de membres surnuméraires ont été greffés chez l'embryon de poulet (Hollyday et Hamburger, 1976) avant la période de mort neuronale qui, dans les conditions normales, conduit à l'élimination de 50% de neurones de la colonne motrice latérale. Ces auteurs observent que le nombre de motoneurones du côté opéré augmente de 11 à 27% par rapport au témoin. Autrement dit, malgré le doublement de la cible qui aurait pu permettre la survie de la totalité des motoneurones, la mort cellulaire affecte de 45% à 37% des motoneurones au lieu de 50% programmés. Cet excédent de neurones de 11 à 27% paraît bien faible comparé à nos résultats obtenus chez l'embryon de Pleurodèle où l'on suppose un doublement du nombre de neurones. Il faut remarquer que la situation du membre double de pleurodèle est différente de celle obtenue chez le poulet (Hollyday et Hamburger, 1976) car les membres doubles de Pleurodèle ont une base commune située bien en face du plexus brachial, alors que le membre surnuméraire de poulet a été ajouté sur le bord antérieur du bourgeon en place. Chez le Xénope, Lamb (1979) a étudié le cas d'un membre triple obtenu accidentellement. L'augmentation du nombre de motoneurones n'est que de 18% alors que l'augmentation de la masse musculaire est estimée à 100%. Il faut ajouter que le volume des ganglions dorsaux de la région lombaire a augmenté 1,7 fois. Il est probable qu'une situation équivalente soit offerte par les membres doubles résultat de nos transplantations embryonnaires. Le facteur de multiplication des fibres nerveuses à la base du membre double, égal à 2,3, est probablement lié à une augmentation du nombre de motoneurones mais aussi à une augmentation du nombre de neurones sensoriels. De plus, si l'on se réfère aux observations de Prestige et Wilson (1974) chez le Xénope, le bourgeonnement d'axones des racines ventrales n'aurait pas lieu au cours de la croissance embryonnaire normale. Ceci suggère qu'à chaque fibre nerveuse présente dans les nerfs à la base des membres correspond un neurone.

A l'inverse des expériences qui contribuent à augmenter la taille de la cible,

en l'occurrence celle du membre, des expériences d'ablation des bourgeons de membre tant chez les Anoures (Prestige, 1967 ; Fortune et Blackler, 1976 ; Kett et Pollack, 1985) que chez le Poulet (Bueker, 1947 ; Oppenheim et al, 1978) conduisent à une réduction du nombre de motoneurones de la colonne motrice latérale.

CONCLUSION

CONCLUSION

Dans l'étude que nous avons présentée, nous avons cherché à savoir comment se réalisait l'innervation des membres antérieurs de Pleurodèle. Nous avons établi, dans une première partie, le patron des nerfs et des muscles du membre antérieur de Pleurodèle et recherché la localisation des motoneurones innervant les principaux muscles de ce membre. La distribution de ces motoneurones est diffuse dans la région de la moelle épinière qui innerve le membre. A la différence des autres Vertébrés où les motoneurones qui innervent les muscles sont groupés en noyaux compacts constituant la colonne motrice latérale, les Urodèles ne paraissent pas présenter une colonne motrice bien délimitée. Néanmoins, les motoneurones qui innervent un muscle donné ont une position bien définie dans le plan transversal et selon l'axe rostro-caudal et constituent un pool de motoneurones. Des chevauchements peuvent exister entre les pools de motoneurones innervant deux muscles différents. L'invasion du bourgeon de membre par les nerfs a été détectée dès le stade 36. Les nerfs atteignent l'extrémité distale au stade 38 et le nombre de fibres nerveuses augmente régulièrement au cours de la croissance.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés à l'innervation du membre au cours de la régénération. Celle-ci est identique à celle du membre normal non amputé.

Dans une troisième partie, nous avons entrepris une recherche expérimentale sur l'établissement des connexions neuromusculaires dans les membres à formations surnuméraires. Le patron des nerfs et des muscles des formations surnuméraires est conforme à celui du membre normal. L'innervation de ces formations estimée par comptage des fibres nerveuses des principaux nerfs est apparemment normale. On a aussi montré que deux ou trois muscles homologues appartenant aux éléments des membres doubles ou triples étaient innervés par un même pool de motoneurones. Des mécanismes de guidage sélectif doivent donc établir les connexions neuromusculaires appropriées. De tels mécanismes semblent intervenir aussi bien au cours de la

croissance que de la régénération. D'un point de vue quantitatif, il était intéressant de savoir si un même pool de motoneurones innervant 2 ou 3 muscles homologues présentait un plus grand nombre de neurones moteurs. L'absence de colonne motrice latérale bien définie nous a conduit à effectuer une recherche quantitative indirecte. Dans les membres multiples obtenus chez les larves âgées, le recrutement de neurones, s'il existe, est faible. Les fibres nerveuses supplémentaires proviennent probablement d'un bourgeonnement des fibres présentes au niveau de la duplication ou la triplication. Dans les membres multiples obtenus chez les jeunes larves et les embryons, les fibres nerveuses additionnelles présentes à un niveau proximal à la duplication, pourraient correspondre à un recrutement important de neurones qu'ils soient moteurs ou sensoriels. Il serait intéressant de connaître la provenance du recrutement neuronal induit par la présence des formations surnuméraires.

Les résultats relatifs à l'innervation des duplications proximo-distales se divisent en deux groupes. Dans le cas des muscles de l'avant-bras surnuméraire situé en position directement distale à l'avant-bras du membre porte-greffe, l'innervation a pour origine le pool de motoneurones qui innervent les muscles homologues de l'avant-bras porte-greffe. Par contre, l'innervation des muscles du bras surnuméraire autorise deux interprétations possibles. En effet, le pool de motoneurones qui innerve l'*anconaeus* surnuméraire distal se situe dans la zone de chevauchement des pools de motoneurones de l'*anconaeus* et de l'*extensor digitorum communis*. Il nous faudra éclaircir ce problème car s'il s'avérait que l'hypothèse d'une innervation inappropriée des muscles proximaux surnuméraires était vérifiée, les problèmes relatifs à la compétition des neurones pour une cible donnée pourraient être l'objet d'une étude approfondie. En particulier, alors que chez le Poulet, on a récemment montré qu'une innervation inappropriée était condamnée à plus ou moins brève échéance (Butler et al, 1986), aucun travail relatif à l'innervation inappropriée des muscles d'Amphibien n'a été conduit suffisamment longtemps pour savoir si une telle innervation était compatible avec une survie musculaire.

BIBLIOGRAPHIE

- BENNETT M.R., (1983). The development of neuromuscular synapses. *Physiol. Rev.*, **63**, 915-1048.
- BENNETT M.R. and RAFTOS J., (1977). The formation and regression of synapses during the reinnervation of axolotl striated muscles. *J. Physiol.*, **265**, 261-295.
- BENNETT M.D., DAVEY D.F. and VEBEL K., (1980). The growth of segmental nerves from the brachial myotomes into the proximal muscles of the chick forelimb during development. *J. Comp. Neurol.*, **189**, 335-357.
- BENNETT M.R. and Mc GRATH., (1980). Segmental innervation of rotated and supernumerary axolotl hindlimbs. *J. exp. Zool.*, **214**, 1-12.
- BETZ W. J. (1987). Motoneuron death and synapses elimination in Vertebrates. In *The Vertebrates Neuromuscular Junction*, 117-162, Alan R. Liss.
- BUEKER E.D., (1945). Hyperplastic changes in the nervous system of a frog (*Rana*) as associated with multiple functional limbs. *Anat. Rec.*, **93**, 157-173.
- BURKE R.E., (1981). Motor units : Anatomy, physiology and functional organization. In *Handbook of Physiology. Amer. Physiol. Soc.*, **2**, 345-422.
- BUTLER J., CAUWENBERGS P. and COSMOS E., (1986). Fate of brachial muscles of the chick embryo innervated by inappropriate nerves : structural, fonctionnal and histochemical analyses. *J. Embryol. exp. Morph.*, **95**, 147-168.
- CAREY F.J., (1982). Localization of motoneurons supplying forelimb muscles of Urodele Amphibia : an HRP study. *Anat. Rec.*, **202**, 26A.
- CASS D.T. and MARK R.F., (1975). Reinnervation of axolotl limbs. 1. Motor nerves. *Proc. R. Soc. B.*, **190**, 45-58.
- CLARKE P.G.H. (1985). Neuronal death in the development of the vertebrate nervous system. *Trends Neurobiol.*, **8**, 345-349.

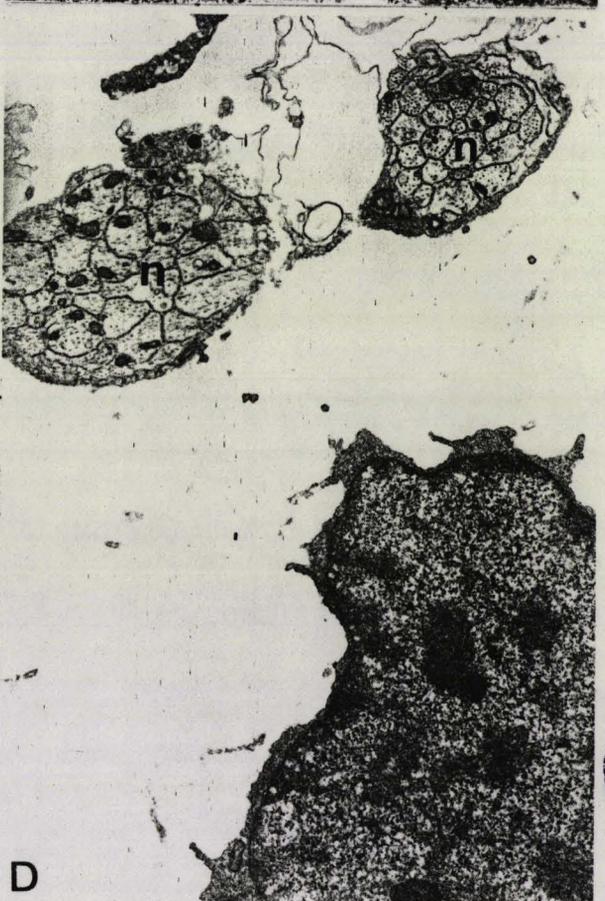
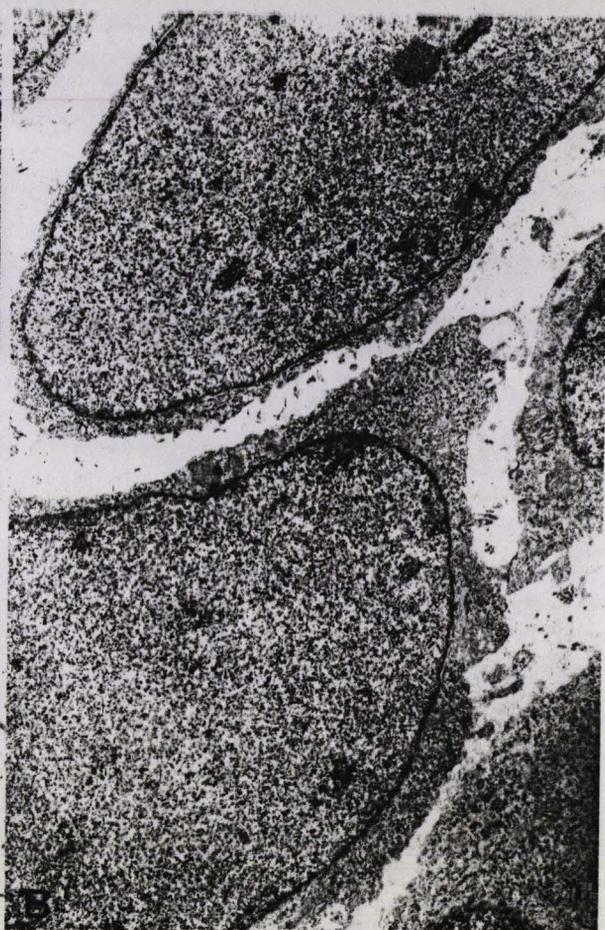
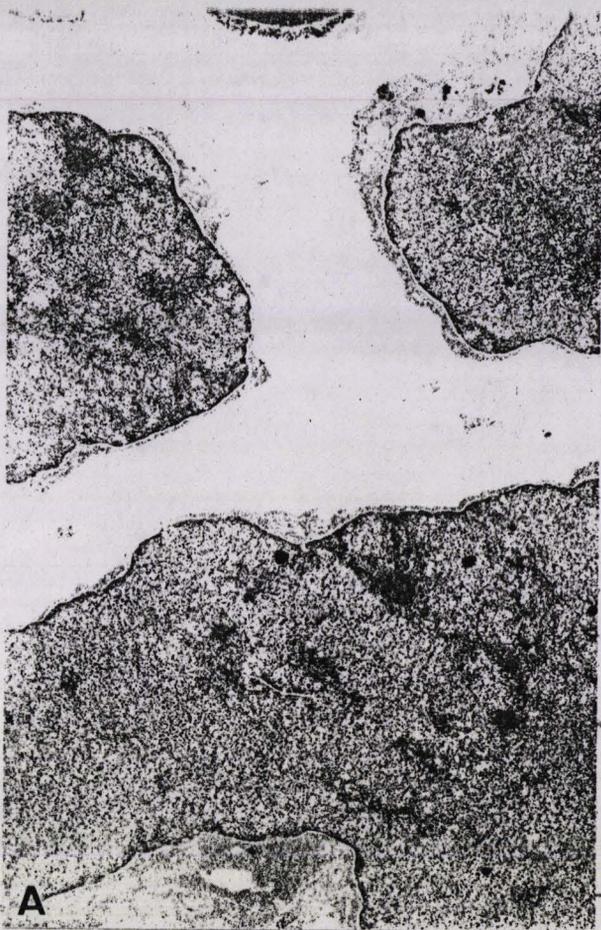
- CRUCE W.L.R., (1974). The anatomical organization of hindlimb motoneurons in the lumbar spinal cord of the frog, *Rana catesbiana*. *J. Comp. Neurol.*, **153**, 59-76.
- EGAR M. and SINGER M., (1971). A quantitative electron microscope analysis of peripheral nerve in the Urodele Amphibian in relation to limb regenerative capacity. *J. Morph.*, **133**, n°4, 387-398.
- FORTUNE J.E., BLACKLER A.W., (1976). The response of the brachial ventral horn of *Xenopus laevis* to forelimb amputation during development. *J. Embryol. exp. Morph.*, **36**, 453-468
- FRANCIS E.T.B., (1934). *The anatomy of the salamander*. Oxford Univ. Press London.
- GALLIEN L. et DUROCHER M., (1957). Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltlii* Michah.. *Bull. Biol. Fr. et Belg.*, **91**, 97-114.
- GRIM M. and CARLSON B.M., (1974). A comparison of muscles of the forearm and hand during ontogenesis and regeneration in the Axolotl (*Ambystoma mexicanus*). *Z. Anat. Entwickl. Gesch.*, **145**, 137-148.
- GRIMM M.L., (1971). An evaluation of myotypic respecification in axolotls. *J. exp. Zool.*, **178**, 479-496.
- HAMBURGER V., (1975). Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo. *J. Comp. Neurol.*, **160**, 49-92.
- HAMBURGER V. and HAMILTON H.L., (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.*, **88**, 49-92.
- HOLDER N., MILLS J. and TONGE D.A., (1982). Selective reinnervation of skeletal muscle in the newt *Triturus cristatus*. *J. Physiol.*, **326**, 371-384.
- HOLDER N. TONGE D.A. and JESANI P. (1984). Directed regrowth of axons from a misrouted nerves to their correct muscles in the limb of the adult newt. *Proc. R. Soc. Lond. B* **22**, 477-489.
- HOLLYDAY M., (1980). Organization of motor pools in the chick lumbar lateral motor column. *J. Comp. Neurol.*, **194**, 143-170.
- HOLLYDAY M., (1981). Roles of motor innervation in chick embryos with supernumerary limbs. *J. Comp. Neurol.*, **202**, 439-465.

- HOLLYDAY M., (1983). Development of motor innervation of chick limbs. In *Limb Development and Regeneration. Part. A*, 183-193. J. F. Fallon and A. I. Caplan Eds. Alan R. Liss, New York.
- HOLLYDAY M. and HAMBURGER, (1976). Reduction of naturally occurring motor neuron loss by enlargement of the periphery. *J. Comp. Neurol.*, **170**, 311-320.
- JOLESZ F. and SRETER F.A., (1981). Development, innervation, and activity pattern induced changes in skeletal muscle. *Ann. Rev. Physiol.*, **43**, 531-552.
- KETT N.A. and POLLACK E.D., (1985). Retention of lateral motor column neurons during the phase of rapid cell loss after limb amputation in *Rana pipiens* tadpoles. *J. exp. Zool.*, **236**, 59-66.
- LAMB A.H., (1976). The projection patterns of the ventral horn to the hindlimb during development. *Develop. Biol.*, **54**, 82-99.
- LAMB A.H., (1979a). Evidence that some developing limb motoneurons die for reasons other than peripheral competition. *Develop. Biol.*, **71**, 347-350.
- LAMB A.H., (1979b). Ventral horn cell counts in a *Xenopus* with naturally occurring supernumerary hind limbs. *J. Embryol. exp. Morph.*, **49**, 13-16.
- LAMB A.H., (1980). Motoneurone counts in *Xenopus* frogs reared with one bilaterally-innervated hindlimb. *Nature*. **284**, 347-350.
- LAMB A.H., (1981). Target dependency of developing motoneurons in *Xenopus laevis*. *J. Comp. Neurol.*, **203**, 157-171.
- LANCE-JONES C., (1982). Motoneuron cell death in the developing lumbar spinal cord of the mouse. *Dev. Brain Res.*, **4**, 473-479.
- LANCE-JONES C., (1986). Motoneuron projection patterns in chick embryonic limbs with a double complement of dorsal thigh musculature. *Develop. Biol.*, **116**, 387-406.
- LANCE-JONES C. and LANDMESSER L., (1978). Effect of spinal cord deletions and reversals on motoneuron projection patterns in the embryonic chick hindlimb. *Neurosci. Abstr.* **4**, 118

- LANCE-JONES C. and LANDMESSER L., (1980a). Motoneurone projection patterns in the chick hindlimb following early spinal cord deletions. *J. Physiol.* (London). **302**, 559-580.
- LANCE-JONES C. and LANDMESSER L., (1980b). Motoneurone projection patterns in the chick hindlimb following early partial reversals of the spinal cord. *J. Physiol.* (London). **302**, 581-602.
- LANCE-JONES C. and LANDMESSER L., (1981). Pathway selection by lumbosacral motoneurons during normal development. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **214**, 19-52.
- LANDMESSER L., (1978a). The distribution of motoneurons supplying chick hindlimb muscles. *J. Physiol.*, **284**, 371-389.
- LANDMESSER L., (1978b). The development of motor projection patterns in the chick hindlimb. *J. Physiol.*, **284**, 391-414.
- LANDMESSER L., (1980). The generation of neuromuscular specificity. *Ann. Rev. Neurosci.*, **3**, 279-302.
- LANDMESSER L. and MORRIS D.G., (1975). The development of functional innervation in the hindlimb of the chick embryo. *J. Physiol.*, **249**, 301-326.
- LEWIS J., CHEVALIER A., KIENY M. and WOLPERT L., (1981). Muscle nerve branches do not develop in chick wings devoid of muscles. *J. Embryol. exp. Morph.*, **64**, 211-232.
- LHEUREUX E., (1978). *Recherches expérimentales sur la morphogenèse régénératrice du membre de Pleurodèle*. Thèse Doct. Etat Lille.
- LHEUREUX E., THOMS S.D. and CAREY F., (1986). The effects of two retinoïds on limb regeneration in *Pleurodeles waltl* and *Triturus vulgaris*. *J. Embryol. exp. Morph.*, **92**, 165-182.
- MORRIS D.G., (1978). Development of functional motor innervation in supernumerary hindlimb of the chick embryo. *J. Neurophysiol.*, **41**, 1450-1465.
- OPPENHEIM R.W., CHU-WANG I. and MADERDRUT J.L., (1978). Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. III. The differentiation of motoneurons prior to their induced degeneration following limb bud removal. *J. Comp. Neurol.*, **177**, 87-112.

- PIATT J., (1957a). Studies on the problem of nerve pattern. II : Innervation of the intact forelimb by different parts of the central nervous system in *Amblystoma*. *J. exp. Zool.*, **134**, 103-126.
- PIATT J., (1957b). Studies on the problem of nerve pattern. III : Innervation of the regenerated forelimb in *Amblystoma*. *J. exp. Zool.* **136**, 229-247.
- PRESTIGE M.C., (1967). The control of cell number in the lumbar ventral horns during the development of *Xenopus laevis* tadpoles. *J. Embryol. exp. Morphol.*, **18**, 359-387.
- PRESTIGE M.C. and WILSON M.A., (1974). A quantitative study of the growth and development of the ventral root in normal and experimental conditions. *J. Embryol. exp. Morph.*, **32**, 819-833.
- PURVES D. and LICHTMAN J.W., (1980). Elimination of synapses in the developing nervous system. *Science*, **210**, 153-157.
- RACE J.R. and TERRY R.J., (1967). Further studies on the development of the lateral motor column in Anuran larvae. I : Normal development in *Rana temporaria*. *Anat. Rec.*, **152**, 99-106.
- REYNOLDS E.S., (1963). The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, **142**, 310-325.
- ROMANES G.J., (1951). The motor cell columns of the lumbosacral spinal cord of the cat. *J. Comp. Neurol.*, **94**, 313-363.
- ROMANES G.J., (1964). The motor pools of the spinal cord. *Prog. Brain Res.*, **11**, 93-119.
- STEPHENS N. and HOLDER N., (1985). A horseradish peroxidase study of motoneuron pools of the forelimb and hindlimb musculature of the Axolotl. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **224**, 325-339.
- STEPHENS N., HOLDER N., MADEN M., (1985). Motoneuron pools innervating muscle in vitamin A - induced proximal - distal duplicate limbs in the Axolotl. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **224**, 341-354.
- STEPHEN N. and HOLDER N., (1987). Reformation of the pattern of neuromuscular connections in the regenerated axolotl hindlimb. *Development*, **99**, 221-230.

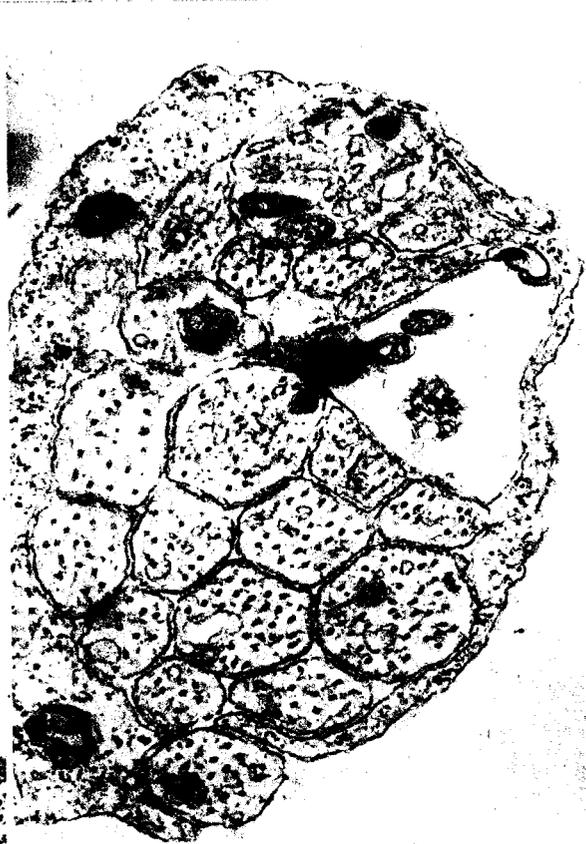
- STIRLING R.V. and SUMMERBELL D., (1977). The development of functional deletions of the proximal - distal axis. *J. Embryol. exp. Morph.*, **41**, 189-207.
- STIRLING R.V. and SUMMERBELL D., (1985). The behavior of growing axons invading developing chick wing buds with dorsoventral or antero-posterior axis reversed. *J. Embryol. exp. Morph.*, **85**, 251-269.
- SUMMERBELL D. and STIRLING R., (1981). The innervation of dorsoventrally reversed chick wings : evidence that motor axons do not actively seek out their appropriate targets. *J. Embryol. exp. Morph.*, **61**, 233-247.
- SUMMERBELL D. and STIRLING R.V., (1982). Development of the pattern of innervation of the chick limb. *Amer. Zool.*, **22**, 173-184.
- TANK P.W. and HOLDER N., (1981). Pattern regulation in the regenerating limb in urodele amphibians. *Q. Rev. Biol.*, **56**, 113-141.
- TOSNEY K.W. and LANDMESSER L., (1985a). Specificity of motoneuron growth cone outgrowth in the chick hindlimb. *J. Neurosci.* **5**, 2336- 2344.
- TOSNEY K.W. and LANDMESSER L., (1985b). Development of the major pathways for neurite outgrowth in the chick hindlimb. *Develop. Biol.*, **109**, 193-214.
- VOGEL M. and LANDMESSER L., (1987). Distribution of fiber types in embryonic chick limb muscles innervated by foreign motoneurons. *Develop. Biol.*, **119**, 481-495.
- WALLACE H., (1981). *Limb regeneration..* 276p. J. Wiley and Sons. Chichester.
- WHITELAW V. and HOLLYDAY M., (1983). Neural pathway constraints in the motor innervation of the chick hind limb following dorso-ventral rotations of distal limb segments. *J. Neurosci.*, **3**, 1226-1233.
- WIEDERSHEIM R., (1880). Das Skelet von *Pleurodeles waltlii*. *Jeu. Z. Nat Leipzig*, **14**, 25-38.
- WIGSTON D.J., (1986). Selective innervation of transplanted limb muscles by regenerating motor axons in the Axolotl. *J. Neurosci.* **6**, 2757-2763.



BU
LILLE



A



B

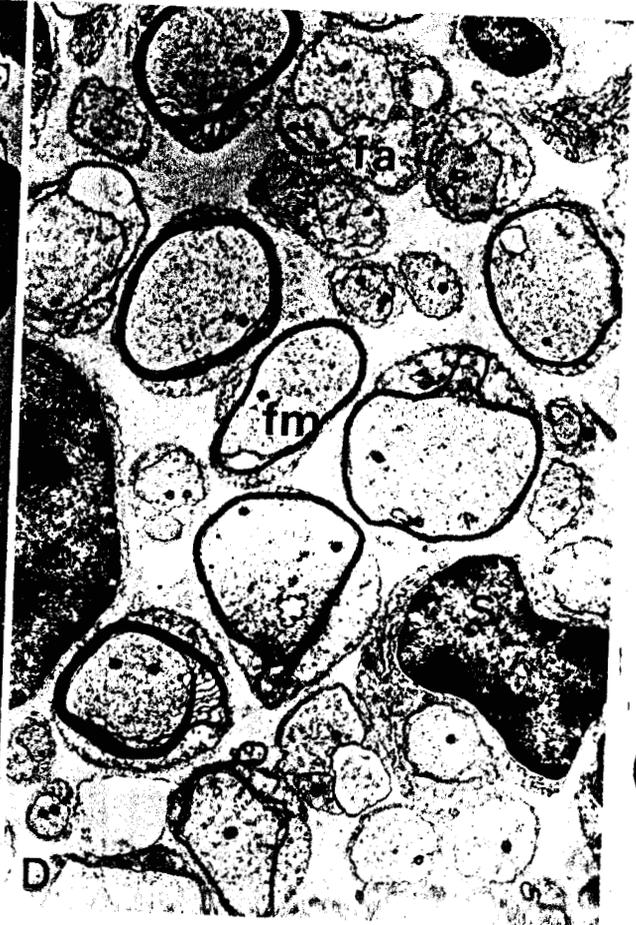
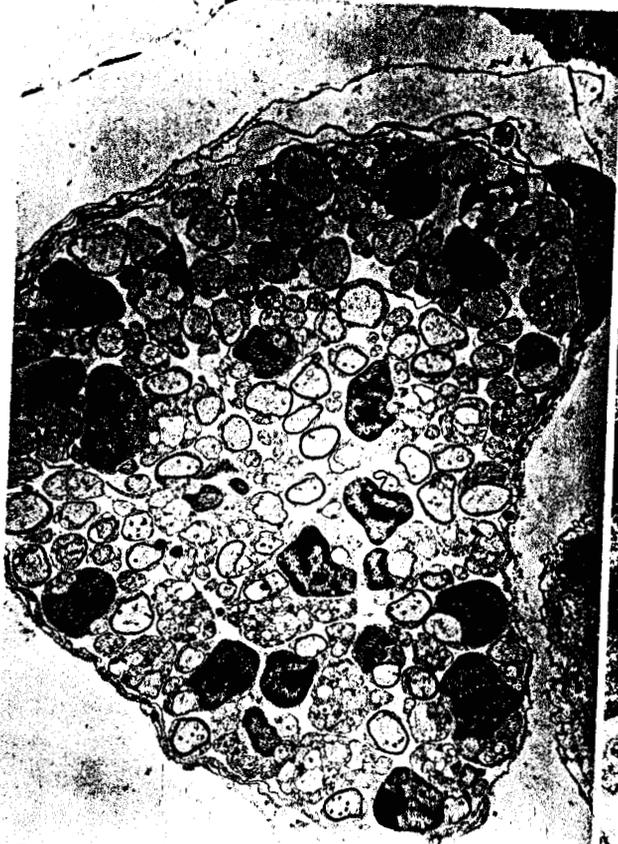


C

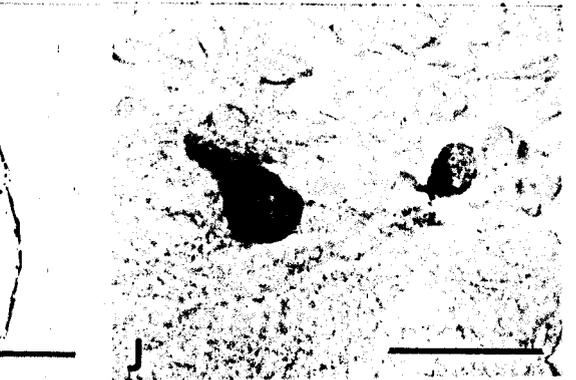
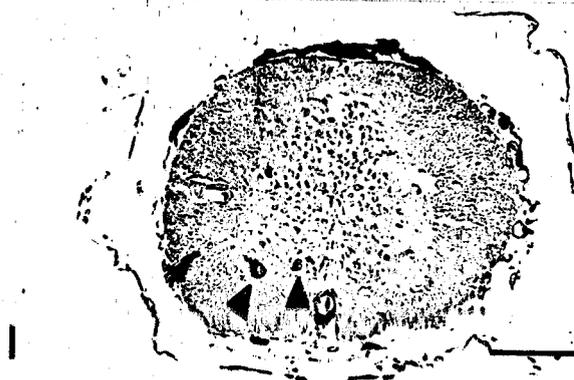
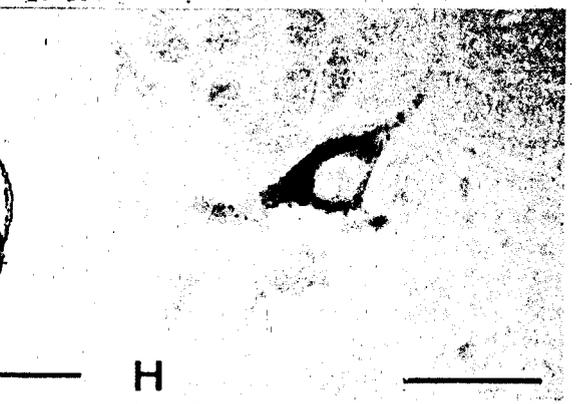
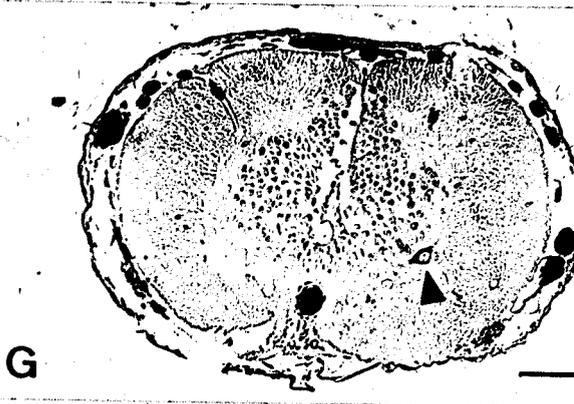
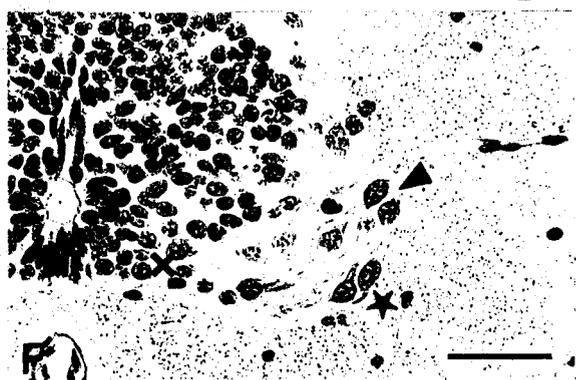
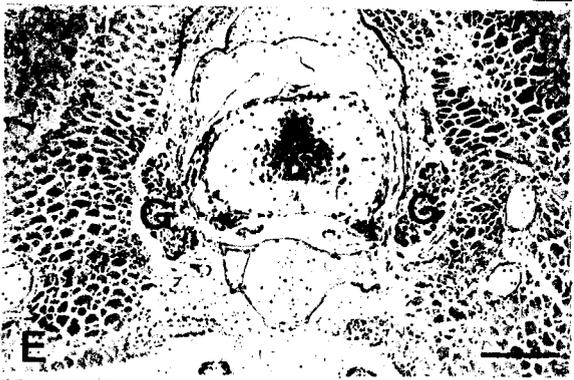
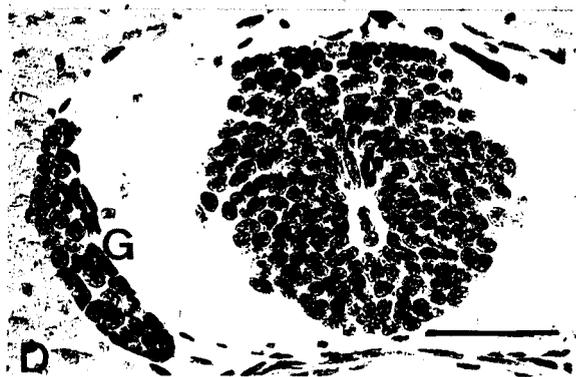
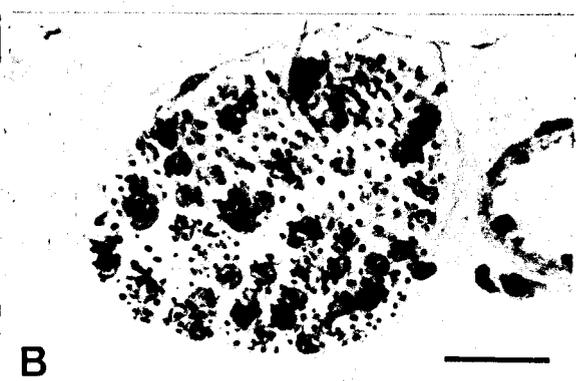
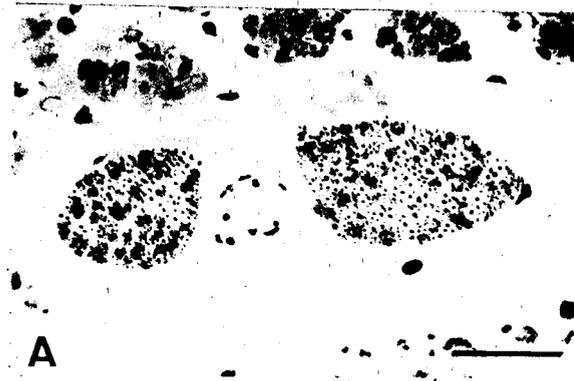


D





BU
LILLE



CONTRIBUTION TO LEARNING OF *PLEURODELES* LIMB
INNERVATION DURING GROWTH AND REGENERATION.
INFLUENCE OF SUPERNUMERARIES ON LIMB INNERVATION

SUMMARY

The object of this study concerns the innervation of the forelimb of the newt *Pleurodeles*.

The pattern of both muscles and nerves was described through a histological study. The localization of the motoneurons projecting on the main muscles of the limb was established by using retrograde transport of horseradish peroxidase. A well-patterned motoneuron pool in the spinal cord is fitted with each muscle.

The Bodian technique being insufficient to detect the first nerve fibres that were invading the limb bud, early nerve structures were resolved in the electron microscope. The first appearance of nerve in the limb bud occurred in stage 36 embryos. During the period of larval growth, the number of nerve fibres progressively increased. It remained proportional to the limb size.

Another part of this study is related to the innervation of the regenerating limb. The pattern of the regenerate and the corresponding motoneuron pools were similar to those of the normal limb.

The last part of this memoir is focused on the innervation of the supernumerary limbs. Two or three homologous muscles originating from the different parts of a double or a triple limb, shared the same motoneuron pool. It was not possible to establish a quantitative increase of the motor pool by direct observation of spinal cord sections because the motor pools of this newt were not histologically distinct from the other neurons. However, by counting nerve fibers in sections of the supernumeraries, both the increase of motoneuron pools and the nerve sprouting were assessed. In the multiple limbs obtained in the old larvae by contralateral transplantation of blastemas, the increase of nerve fibres probably originated from local nerve sprouting. In contrast, in the double limbs resulting from contralateral transplantation of embryonic limb fields, the increase of nerve fibres probably originated from additional neurons. The study related to the innervation of proximo-distal duplicate limbs, were not extensive enough to bring well founded conclusions.

RESUME

L'objet de cette étude concerne l'innervation des membres du triton *Pleurodeles*.

Le patron des nerfs et des muscles a été décrit par une étude histologique. Au moyen de la peroxydase du raifort, on a localisé la position des corps cellulaires des motoneurones qui innervent les principaux muscles du membre. A chaque muscle correspond un pool de motoneurones dont les coordonnées au sein de la moelle épinière sont bien définies.

L'invasion des bourgeons de membres par les nerfs a été détectée à l'aide de la microscopie électronique dès le stade 36. Au cours de la croissance larvaire, le nombre de fibres nerveuses détectées par la coloration de Bodian, s'accroît mais reste proportionnel à la taille du membre.

L'innervation du membre en régénération a aussi fait l'objet d'une étude. Le patron des nerfs et des muscles tout comme les pools de motoneurones correspondant aux principaux muscles du membre sont conformes à ceux du membre normal non amputé.

La dernière partie de ce travail est relative à l'étude des membres à formations surnuméraires. Les deux ou les trois muscles homologues présents dans les membres doubles ou triples partagent un même pool de motoneurones suggérant une spécificité des connexions neuromusculaires. Il n'a pas été possible de détecter directement un accroissement du nombre de motoneurones de ces pools, car les critères histologiques utilisés chez d'autres Vertébrés sont absents chez ce triton. Toutefois par comptage du nombre de fibres nerveuses à différents niveaux des membres multiples, on a pu estimer les parts revenant au recrutement de nouveaux neurones et au bourgeonnement des fibres nerveuses au niveau des duplications. Dans les membres multiples obtenus chez les larves âgées par greffe contralatérale de blastèmes, l'augmentation du nombre de fibres nerveuses est principalement liée au bourgeonnement des fibres présentes lors de l'opération. Par contre, chez les membres multiples résultant de transplantations contralatérales de champs de membres embryonnaires, l'augmentation du nombre de fibres nerveuses est probablement liée à un recrutement additionnel de neurones. Enfin, l'étude de l'innervation des duplications proximo-distales concerne un trop faible nombre de cas pour pouvoir détecter l'existence ou non de liaisons synaptiques appropriées.

