

50376  
1987  
185

50376  
1987  
185

N° d'ordre : 739

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour le

DOCTORAT D'ETAT EN SCIENCES NATURELLES

par

Xavier DESBIENS



## **ETUDE EXPERIMENTALE DES INTERACTIONS ECTO-MESODERMiques IMPLIQUEES DANS L'ORGANOGENESE SQUELETTIQUE DU BOURGEON DE MEMBRE EMBRYONNAIRE DE SOURIS EN CULTURE *IN VITRO***

Soutenu le 29 Septembre 1987 devant le jury :

Président :	A. CAPURON
Rapporteurs :	M. GUMPEL-PINOT J. MILAIRE
Examineur :	A. BART (Directeur de Thèse) A. COLLENOT

## RESUME

L'étude des interactions ecto-mésodermiques impliquées dans l'organogenèse squelettique du bourgeon de membre embryonnaire de souris a été réalisée *in vitro* à l'aide des techniques de culture organotypique et cellulaire.

En culture organotypique, le mésoderme de jeunes ébauches privé expérimentalement de sa couverture ectodermique (digestion trypsique ou incubation dans l'EDTA) s'engage dans une chondrogenèse anarchique comme en témoignent les analyses histologiques, l'augmentation de l'incorporation de  $^{35}\text{SO}_4$  dans les glycosaminoglycannes sulfatés ou l'augmentation de la quantité des formes monomériques et agrégées de protéoglycannes spécifiques du cartilage. Les traitements utilisés pour dissocier les deux feuillets ou l'absence d'une couverture épithéliale protectrice ne semblent pas être impliqués dans l'orientation vers la chondrogenèse. L'ectoderme de bourgeon semble responsable du maintien d'une intense prolifération cellulaire dans le mésoderme et empêche la différenciation cartilagineuse dans son voisinage immédiat. De plus, il semble contrôler la mise en place du patron squelettique: en apportant plusieurs modifications au protocole de culture, nous avons pu maintenir *in vitro* des relations ecto-mésodermiques améliorant considérablement la croissance des jeunes bourgeons dont les prestations *in vitro* étaient jusqu'alors médiocres. Dans ces conditions, ces explants mettent en place un squelette très élaboré où l'on reconnaît les différents segments du membre y-compris un autopode rayonné. Les bourgeons plus âgés s'affranchissent de l'influence ectodermique: un squelette organisé apparaît dans les explants comportant les deux feuillets et dans les explants mésodermiques dénudés.

Les cultures cellulaires à haute densité nous ont permis d'étudier la capacité chondrogène du mésoderme en fonction de l'âge des bourgeons. Cette capacité, d'abord réduite, augmente jusqu'à un âge intermédiaire avant de chuter pour les stades plus âgés. L'association de divers épithéliums à des cultures hautement chondrogènes a confirmé le rôle inhibiteur spécifique de l'ectoderme sur la chondrogenèse.

Enfin, nous avons étudié les effets de l'acide rétinoïque sur la morphogenèse squelettique de jeunes bourgeons en culture organotypique. Les observations morphologiques complétées par analyse d'images ont montré que l'acide rétinoïque à faible dose stimule la chondrogenèse alors que les fortes doses sont hautement tératogènes.

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. DYMMENT 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 Ladislav	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. BKOUCHE 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
Mle 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. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPRez Gilbert	Physique du solide - Cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mle 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 hertziennne
M. DUBERULLE Alain	Spectroscopie hertziennne
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. GRENY 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
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle 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. MESMACQUE 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

Qu'il me soit permis d'exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur A. BART, Laboratoire de Morphogenèse Animale de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, qui m'a jadis accueilli, puis guidé dans la réalisation de ce travail.

Cette thèse n'aurait pu être menée à bien sans l'amicale et stimulante collaboration de Madame F. REVILLION-CARETTE, ni la précieuse et constante disponibilité de Madame L. MEUNIER.

Je remercie Monsieur le Professeur A. CAPURON, Laboratoire de Morphogenèse Animale de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, d'avoir accepté la présidence du jury de cette thèse, ainsi que Madame M. GUMPEL-PINOT, Laboratoire de Neurochimie, INSERM U 134, La Salpêtrière, Paris et Monsieur le Professeur J. MILAIRE, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles qui ont assuré la charge de rapporteurs. J'associe à ces remerciements Monsieur le Professeur J. COLLENOT, Laboratoire de Biologie du Développement, Université Pierre et Marie Curie, Paris, qui a bien voulu se joindre à mon jury.

Enfin, je n'oublierai pas l'aide de Mesdames A. ROUSSEAU et E. FERREIRA, Techniciennes, celle de Monsieur B. LASSALLE, Responsable et Animateur du Centre Commun de Mesure d'Histométrie et de Cytométrie en Analyse d'Images.

La frappe et la mise en page de cette thèse ont été réalisées par Madame F. LALOUX, les planches photographiques par Monsieur D. LAZARECKI et Madame A. AUGER. Madame R. LYOEN, Messieurs G. DOBIN et F. CHUIN ont entretenu l'élevage de souris. Que tous trouvent, dans ces lignes, l'expression de ma profonde gratitude.

## **SOMMAIRE**

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
I. - LE DEVELOPPEMENT PRECOCE DU BOURGEON DE MEMBRE.....	2
II. - LA MORPHOGENESE SQUELETTIQUE.....	3
III. - LA DIFFERENCIATION CARTILAGINEUSE DANS LE BOURGEON DE MEMBRE .....	7
<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	12
I. - MODELE BIOLOGIQUE .....	13
II. - TECHNIQUES OPERATOIRES.....	19
III. - TECHNIQUES DE CULTURE .....	21
A - Cultures d'apex de bourgeons.....	21
1) Prélèvement des bourgeons de membres.....	21
2) Système de culture.....	22
3) Conditions de culture.....	22
B - Cultures cellulaires de mésoderme apical.....	22
1) Préparation des cultures en micromasses. ....	22
2) Conditions de culture.....	23
3) Réassociation avec des feuillets embryonnaires.....	23
C - Cultures de bourgeons entiers.....	23
1) Prélèvement des bourgeons.....	24
2) Système de culture.....	24
3) Conditions de culture.....	25
IV. - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES ET HISTOCHIMIQUES.....	25
A - Fixation, coloration et traitement des cultures organotypiques.....	25
B - Fixation, coloration et traitement des cultures cellulaires.....	26
C - Etude des surfaces cellulaires.....	26
D - Etude des matrices intercellulaires. ....	27
V. - CONTROLES ULTRASTRUCTURAUX.....	28
VI. - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES.....	28
A - Mesures d'incorporation de sulfate de sodium radioactif dans les glycosaminoglycannes sulfatés. ....	28
B - Mesure de la teneur en DNA.....	29
C - Caractérisation des protéoglycannes.....	29
1) Extraction des protéoglycannes .....	29
2) Tamisage moléculaire.....	30
VII. - ANALYSE D'IMAGES .....	31

VIII. - ANALYSES STATISTIQUES .....	31
<b>CHAPITRE I</b> .....	32
<b>LA CHONDROGENESE DANS LES APEX DE BOURGEONS DE MEMBRES DE SOURIS</b> .....	32
<b>I. - EFFETS DE L'ECTODERME SUR LA CHONDROGENESE</b> .....	33
<b>A - Introduction</b> .....	33
<b>B - Protocole expérimental</b> .....	33
<b>C - Résultats</b> .....	35
1) Evolution des bourgeons de stade 17.....	35
2) Evolution des apex de bourgeons de stade 19.....	36
3) Evolution des apex de bourgeons de stade 20.....	40
<b>D - Discussion</b> .....	41
1) Considérations techniques .....	41
2) Rôle de l'ectoderme des bourgeons de stades 17 et 19.....	43
3) Rôle de l'ectoderme des bourgeons de stade 20.....	44
<b>II. - INFLUENCE DE L'ECTODERME SUR LES PROTEOGLYCANNES DE LA MATRICE CARTILAGINEUSE</b> .....	46
<b>A - Introduction</b> .....	46
<b>B - Protocole expérimental</b> .....	46
<b>C - Résultats</b> .....	48
1) Conditions dissociantes.....	48
2) Conditions associatives .....	49
<b>D - Discussion</b> .....	49
<b>III. - INFLUENCE DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL SUR LA CHONDROGENESE</b> .....	52
<b>A - Introduction</b> .....	52
<b>B - Protocole expérimental</b> .....	52
<b>C - Résultats</b> .....	53
1) Contrôles ultrastructuraux .....	53
2) Fixation des anticorps dirigés contre les constituants de la matrice intercellulaire .....	55
3) Fixation des lectines .....	57
4) Cultures d'apex dénudés par l'EDTA. ....	59
<b>D - Discussion</b> .....	61
<b>IV. - SPECIFICITE DE L'EFFET DE L'ECTODERME DE MEMBRE</b> .....	65
<b>A - Introduction</b> .....	65
<b>B - Protocole expérimental.</b> .....	65

<b>C - Résultats</b> .....	66
1) Protection épithéliale.....	66
2) Implantation de lambeaux d'ectoderme de membre ou d'ectoderme dorsal.....	66
<b>D - Discussion</b> .....	68
<b>CHAPITRE II</b> .....	70
<b>LA CHONDROGENESE DANS LES CULTURES CELLULAIRES DE MESODERME DE BOURGEONS DE MEMBRES DE SOURIS</b> .....	70
<b>I.- ETUDE DE LA CAPACITE CHONDROGENE DES CULTURES EN           MICROMASSES</b> .....	71
<b>A - Introduction</b> .....	71
<b>B - Protocole expérimental</b> .....	72
<b>C - Résultats</b> .....	72
1) Evolution générale des cultures .....	72
2) Estimation de la capacité chondrogène des suspensions cellulaires.....	73
<b>D - Discussion</b> .....	76
1) Relations stade de prélèvement-capacité chondrogène.....	76
2) Densité cellulaire et chondrogenèse.....	78
3) La chondrogenèse en culture cellulaire et en culture organotypique .....	79
<b>II.- EFFETS DES FEUILLETS EPITHELIAUX SUR LA DIFFERENCIATION DES CULTURES CELLULAIRES</b> .....	82
<b>A - Introduction</b> .....	82
<b>B - Protocole expérimental</b> .....	82
<b>C - Résultats</b> .....	83
1) Association de feuillets épithéliaux avec des cultures hautement chondrogènes.....	83
2) Association de feuillets épithéliaux avec des cultures non chondrogènes.....	84
<b>D - Discussion</b> .....	84
<b>CHAPITRE III</b> .....	88
<b>LA MORPHOGENESE SQUELETTIQUE DANS LES CULTURES DE BOURGEONS DE MEMBRES ENTIERS</b> .....	87
<b>I.- TECHNIQUES DE CULTURE ET MORPHOGENESE           SQUELETTIQUE</b> .....	88
<b>A - Introduction</b> .....	88
<b>B - Protocole expérimental</b> .....	90
<b>C - Résultats</b> .....	90

1) Analyse morphologique.....	90
2) Analyse de la teneur en DNA.....	92
<b>D - Discussion</b> .....	94
<b>II.- ACIDE RETINOIQUE ET MORPHOGENESE SQUELETTIQUE</b> .....	94
<b>A - Introduction</b> .....	97
<b>B - Protocole expérimental</b> .....	99
1) Bourgeons antérieurs de stade 18 .....	99
2) Bourgeons antérieurs de stade 17 .....	99
3) Analyse d'images .....	100
<b>C - Résultats</b> .....	100
1) Bourgeons antérieurs de stade 18 .....	100
2) Bourgeons antérieurs de stade 17 .....	103
<b>D - Discussion</b> .....	104
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	108

## **INTRODUCTION**

Le travail que nous avons entrepris il y a quelques années s'inscrit dans un secteur particulier de la Biologie du Développement focalisé sur les problèmes de la morphogenèse embryonnaire du membre de Vertébré. Afin de bien situer notre étude et avant d'exposer nos objectifs, méthodes et résultats, il nous a paru indispensable de récapituler en trois points les données expérimentales et les courants de pensée qui paraissent émerger de l'énorme documentation disponible sur ce vaste sujet.

## I. - LE DEVELOPPEMENT PRECOCE DU BOURGEON DE MEMBRE

Les mécanismes qui régissent le développement du membre se ressemblent beaucoup chez tous les tétrapodes. Le membre est issu de territoires somatopleuraux situés de chaque côté de l'embryon et, par conséquent, est **initialement constitué d'un feuillet peu épais d'origine mésodermique séparé d'un feuillet ectodermique par une lame basale**. L'apparition du territoire de membre est sous la dépendance des somites (KIENY, 1969 ; PINOT, 1970 ; RAYNAUD, 1977), son évolution est marquée par une croissance asymétrique : l'allongement de l'ébauche dans l'axe proximo-distal sera prépondérant par rapport à son développement dans l'axe antéro-postérieur ou dans l'axe dorso-ventral. Dans toutes les espèces, le membre antérieur est en avance sur le membre postérieur. Au début du développement, **des cellules d'origine somitique envahissent le bourgeon** (AMANO, 1960 ; FINNEGAN, 1963 ; BOURGEOIS et HOUBEN, 1975 ; HOUBEN, 1976 ; MILAIRE, 1976 ; AGNISH et KOCHHAR, 1977 ; CHEVALLIER et al, 1977-1978 ; CHRIST et al, 1977 ; RAYNAUD 1977) et seront (comme on l'a montré chez l'oiseau) à **l'origine des fibres musculaires striées** du membre alors que les cellules somatopleurales engendreront pour leur part les lignées conjonctives et chondrogène. Les vaisseaux sanguins colonisent le bourgeon précocement (CAPLAN et KOUTROUPAS, 1973) et constituent un réseau tridimensionnel important qui n'atteint pas, toutefois, la lame basale. Un vaisseau (le sinus marginal) draine la partie apicale du bourgeon dans l'axe antéro-postérieur (AMPRINO et AMBROSI, 1973 ; FEINBERG et SAUNDERS, 1982 ; FEINBERG et al, 1983). Peu après, des fibres nerveuses s'enfoncent également dans le mésoderme du bourgeon (SWANSON et LEWIS, 1982) sans jouer, semble-t-il, de rôle prépondérant dans la morphogenèse.

L'ectoderme du bourgeon se compose d'une assise cuboïdale basale sur laquelle se plaque une assise de cellules péridermiques aplaties. Chez les Amphibiens Urodèles, aucun remaniement notable n'affecte l'évolution de l'ectoderme (TANK et al, 1977 ; LAUTHIER, 1977). Au contraire, chez les Amphibiens Anoures (TARIN et STURDEE, 1971-1974 ; KELLEY et BLUEMINK 1974), chez les reptiles (RAYNAUD, 1976), chez les oiseaux (EDE et al, 1974), chez les mammifères (JURAND, 1965 ; KELLEY et FALLON, 1976), **un épaississement ou un repli apparaît à l'apex du bourgeon dans l'axe antéro-postérieur**. Cette crête apicale ectodermique (Apical Ectodermal Ridge ; SAUNDERS, 1948) haute et pseudostratifiée chez les Reptiles et

Oiseaux, lenticulaire chez les Mammifères persistera jusqu'à l'apparition des pièces squelettiques cartilagineuses les plus distales. Des gap-junctions (KELLEY et FALLON, 1982) des faisceaux de microfilaments (KELLEY et FALLON, 1976), l'accumulation de fibronectine (TOMASEK et al, 1982) ou l'altération de la lame basale (TOMASEK et al, 1980) pourraient prendre part à la formation puis au maintien de la crête apicale. Les cellules mésodermiques liées les unes aux autres par des gap-junctions (KELLEY, 1973 ; KELLEY et FALLON, 1978 ; KELLEY et FALLON, 1982 ; ZIMMERMANN et al, 1982) ou des tight-junctions (EDE et al, 1974) émettent des prolongements jusqu'à la lame basale. Le nombre de prolongements cytoplasmiques et la densité des fibrilles d'ancrage évoluent au cours du développement (KAPRIO, 1977 ; DATU, 1985).

## II. - LA MORPHOGENESE SQUELETTIQUE

De nombreux travaux tendent à montrer que **la mise en place des segments du membre s'opère selon une séquence proximo-distale** ( SAUNDERS, 1948 ; HAMPE, 1956-1959 ; TSCHUMI, 1957 ; ROWE et FALLON, 1982). Les cellules souches des segments les plus distaux pourraient occuper une zone située juste sous la crête apicale dès les plus jeunes stades (STARK et SEARLS, 1973). Mais, il a aussi été montré que des particules de carbone insérées à l'interface ecto-mésodermique juste sous la crête de jeunes bourgeons se retrouvaient ultérieurement au coeur des territoires mésodermiques à des niveaux d'autant plus proximaux que la manipulation était menée précocement (SAUNDERS, 1948 ; HAMPE, 1959). En dépit de cette ambiguïté, c'est bien au niveau de la zone distale du bourgeon que se programme le patron de développement de l'ébauche tandis que l'exécution de ce programme fait appel à plusieurs mécanismes dont la prolifération sélective de certaines populations cellulaires avant et après leur différenciation (LEWIS, 1977), et la dégénérescence d'autres populations.

On sait que **le mésoderme de très jeune bourgeon est incapable de s'engager dans la voie de la chondrogenèse s'il est séparé de sa couverture ectodermique** (MILAIRE et MULNARD, 1968 ; GUMPEL-PINOT, 1972, 1973, 1980, 1981). Des contacts cellulaires et un facteur diffusible semblent responsables de cette induction.

**Dans une étape ultérieure du développement, le même mésoderme est capable d'autodifférenciation** après une phase préliminaire de condensation, mais la chondrogenèse est alors anarchique (AHRENS et al, 1977 ; KOSHER et al, 1979 a-b ; OWENS et SOLURSH, 1981 ; HADHAZY et al, 1982 ; DESBIENS, 1983 ; DESBIENS et al, 1985). A ce moment, **l'ectoderme devient globalement inhibiteur de la chondrogenèse** et son effet est décelable sans nécessité de contact intime entre les 2 feuillets (GLOBUS et VETHAMANY-GLOBUS, 1976 ; SOLURSH et al, 1981 ; SINGLEY et SOLURSH, 1981). Des travaux récents mettent en évidence plusieurs mécanismes possibles : l'ensemble de la couverture ectodermique pourrait synthétiser (ou

faire synthétiser par le mésoderme) l'acide hyaluronique qui s'accumule entre les cellules mésodermiques et les empêche de s'agréger (SOLURSH et al, 1979 ; KOSHER et SAVAGE, 1981 ; KOSHER et al, 1981). L'ectoderme pourrait aussi, par un mécanisme spécifique, modifier la composition de la matrice extracellulaire et plus particulièrement agir sur le collagène de type I qui, normalement, est un substrat permettant aux cellules mésodermiques de s'arrondir et de se différencier. Le collagène "dénaturé" par l'ectoderme ne permet plus le passage à la configuration spatiale sphérique nécessaire à la différenciation (SOLURSH et al, 1984 ; ZANETTI et SOLURSH, 1986).

Si l'ectoderme dorsal ne semble pas directement impliqué dans l'établissement du patron squelettique (MARTIN et LEWIS, 1986), **la crête apicale joue, quant à elle, un rôle indéniable sur la croissance du mésoderme et sur son devenir** : l'ablation chirurgicale de la crête apicale entraîne des déficiences distales d'autant plus importantes que l'opération a lieu précocement (SAUNDERS, 1948). La crête apicale assure la survie des jeunes cellules mésodermiques sous-jacentes (CAIRNS, 1975 ; SUMMERBELL, 1977). Puis le mésoderme apical s'affranchit progressivement de cette dépendance (ROWE et al, 1982). **Le pouvoir mitogène de la crête**, qu'on ne peut mettre en évidence au début du développement (SEARLS et JANNERS, 1971) s'établit ensuite progressivement (KOSHER et al, 1979a ; REITER et SOLURSH, 1982 ; DESBIENS, 1983). La région mésodermique directement sous le contrôle de la crête (200 à 300  $\mu\text{m}$ ) semble à l'origine de la croissance proximo-distale et de la mise en place séquentielle des différents segments du membre : plus le séjour des cellules dans cette "Progress Zone" est long et plus les structures cartilagineuses auxquelles les cellules donneront naissance sont distales (SUMMERBELL et al, 1973 ; SUMMERBELL et LEWIS, 1975). Outre cette théorie liant l'information de position proximo-distale à une "horloge mitotique" (la durée du séjour dans la Progress Zone peut se compter en cycles), il a été suggéré que la crête pourrait produire une substance morphogène distribuée à des concentrations croissantes (MEINHARDT, 1983). Des membres pratiquement normaux se développent lorsque l'on inverse l'orientation proximo-distale de la calotte ectodermique en la retournant en doigt de gant sur le coeur mésodermique (ERRICK et SAUNDERS, 1974) ou lorsque des massifs mésodermiques sont coiffés d'une crête expérimentale formée par réassociation de cellules de crête mises au préalable en suspension (ERRICK et SAUNDERS, 1976) ce qui met en relief les propriétés morphogénétiques très particulières de cette structure. Les échanges ecto-mésodermiques à l'apex du bourgeon ne sont cependant pas à sens unique. **Le mésoderme pourrait jouer un rôle important dans la formation puis le maintien de la crête apicale en produisant lui aussi un facteur spécifique** (SWILLING et HANSBOROUGH, 1956 ; SAUNDERS et GASSELING, 1963 ; MAC CABE et PARKER, 1975 ; MAC CABE et al, 1977 ; MAC CABE et RICHARDSON, 1982).

Il a été également proposé un rôle mécanique protecteur pour la calotte ectodermique. De plus

la croissance de l'enveloppe ectodermique elle-même et plus particulièrement le glissement des faces ventrales et dorsales vers l'apex qui en découle (AMPRINO et CAMOSSO, 1958 ; AMPRINO et AMBROSI, 1973 ; KIENY et PAUTOU, 1976) créeraient un espace libre sous la crête, immédiatement colonisé par quelques cellules mésodermiques. La densité cellulaire très faible dans cette région serait un facteur favorisant les divisions (AMPRINO et AMBROSI, 1973 ; SUMMERBELL et WOLPERT, 1972).

Il ne faut cependant pas oublier que chez les Amphibiens Urodèles, le développement du membre s'effectue tout à fait normalement en absence de structure ectodermique apicale. Pour LAUTHIER (1982), l'épiderme d'Urodèle est neutre et ne fait que s'adapter aux transformations du mésoderme. D'autre part, chez les autres tétrapodes, la crête apicale n'apparaît que bien après l'émergence du bourgeon.

L'établissement des polarités dorso-ventrales et antéro-postérieures paraît être également lié à de nombreuses interactions. Bien que ZWILLING (1956) ait montré que le mésoderme possédait en lui toutes les informations nécessaires, des travaux plus récents ont mis en évidence **l'importance de l'ectoderme dans l'acquisition de la polarité dorso-ventrale** au niveau des parties distales du membre (PAUTOU et KIENY, 1973 ; MAC CABE et al, 1974 ; PAUTOU, 1977). De par son asymétrie naturelle, l'aile d'embryon d'Oiseau a été le support expérimental le plus exploité dans l'étude des mécanismes déterminant la **polarité antéro-postérieure** du bourgeon. Une rotation de 180° autour de l'axe proximol-distal imposée à des apex de bourgeons alaires conduit à une duplication des segments distaux (AMPRINO et CAMOSSO, 1959-1963) mais aussi au développement de membres triples (JAVOIS et ITEN, 1986). Le transfert de fragments de mésoderme prélevés en position postaxiale sur le bord préaxial de bourgeons receveurs conduit aux mêmes résultats (SAUNDERS et GASSELING, 1968 ; BALCUNS et al, 1970 ; MAC CABE et al, 1973 ; TICKLE et al, 1975). Le siège de cette activité se situe dans une région mésodermique précise appelée Z.P.A. (zone d'activité polarisante). Cette zone prélevée sur d'autres espèces appartenant à la classe des Reptiles ou à la classe des Mammifères exerce son effet chez le poulet (MAC CABE et PARKER, 1976 ; TICKLE et al, 1976 ; FALLON et CROSBY, 1977). **La zone d'activité polarisante pourrait produire et libérer une substance qui assurerait le maintien de l'AER** (SUMMERBELL, 1974 ; MAC CABE et PARKER, 1975-1976 ; CALANDRA et MAC CABE, 1978 ; TICKLE, 1981). **La distribution de cette substance selon un gradient pourrait expliquer la polarité antéro-postérieure des autopodes normaux et surnuméraires** (TICKLE et al, 1975). Une barrière imperméable placée de manière à isoler les régions préaxiales et postaxiales d'un bourgeon normal empêche la formation des structures squelettiques préaxiales en bloquant la diffusion de la substance morphogène (SUMMERBELL, 1979). La même expérience réalisée sur un bourgeon de patte n'empêche pas le développement des pièces squelettiques préaxiales (ROWE et FALLON, 1982). L'ablation de la

zone polarisante n'entraîne pas de déficiences notoires pour FALLON et CROSBY (1975) mais empêche toute morphogenèse pour HINCHLIFFE et GUMPEL-PINOT (1981) qui considèrent que leurs prédécesseurs n'ont pas entièrement excisé la ZPA. D'autres tissus (flanc-somite-mésonéphros) paraissent dotés d'une activité similaire (SAUNDERS 1977). Enfin, l'implantation en position préaxiale de matériaux permettant le relargage d'acide rétinoïque détermine la formation de doigts et structures surnuméraires tout à fait comparables aux morphogenèses obtenues après greffe de ZPA (TICKLE et al, 1982 ; TICKLE, 1983 ; SUMMERBELL, 1983 ; SUMMERBELL et HARVEY, 1983 ; TICKLE et al, 1985).

La programmation de la morphogenèse d'un membre est donc le résultat de nombreuses interactions tendant à attribuer aux cellules des valeurs de position proximo-distales, antéro-postérieures et dorso-ventrales. Les modèles proposés mettent en jeu des interactions à longue distance (SUMMERBELL, 1981) ou au contraire des interactions locales (BRYANT et al, 1981).

Des **phénomènes de régulation** ont pu être mis en évidence dans le membre embryonnaire d'Oiseau à condition qu'aucun signe de différenciation ne soit décelable au moment des expériences (HAMPE, 1959 ; KIENY, 1964a-b, 1967, 1977 ; KIENY et PAUTOU, 1976, 1977 ; HORNBRUCH, 1980). Dans ces conditions, on peut assister à une reprogrammation des valeurs de position. Néanmoins, nous sommes très loin des énormes capacités régulatrices exprimées par les membres d'Amphibiens (STOCUM, 1984) bien que l'on considère que les mécanismes des morphogenèses embryonnaire et régénératrice soient communs (MUNEOKA et BRYANT, 1982). Le membre embryonnaire de mammifère a été trop peu étudié pour accréditer les observations préliminaires de DEUCHAR (1976) tendant à lui conférer un certain potentiel régulateur. Les expériences de MIZELL (1968), MIZELL et ISAACS (1970) sur la régénération chez l'opossum ont été contestées après contrôle histologique : pour FLEMING et TASSAVA (1981) cette régénération du membre postérieur n'existe pas.

Signalons enfin que des **zones de dégénérescence** apparaissent au cours de la morphogenèse du bourgeon permettant le modelage de l'ébauche mais régulant aussi le nombre et la forme des rayons digitaux de différentes espèces (SAUNDERS et al, 1962 ; HINCHLIFFE et THOROGOOD, 1974 ; MILAIRE, 1976 ; CAIRNS, 1977 ; KNUDSEN et KOCHHAR, 1981a). Enfin, des zones de dégénérescence permettent l'individualisation des doigts (FALLON et CAMERON, 1977 ; MACONNACHIE, 1979), leur absence chez certains mutants ou leur élimination expérimentale conduisent à une syndactylie (KIENY et PAUTOU, 1970 ; HINCHLIFFE et THOROGOOD 1974 ; PAUTOU, 1974, 1976).

### III. - LA DIFFERENCIATION CARTILAGINEUSE DANS LE BOURGEON DE MEMBRE

Au cours de l'allongement de l'ébauche se ségrègent d'abord au coeur du mésoderme proximal puis de plus en plus distalement des zones où la densité cellulaire augmente. Ces zones représentent les blastèmes préchondrogènes à l'origine du squelette cartilagineux de l'embryon. C'est en fait le premier indice d'une différenciation chondrogène imminente : les cellules prennent une forme arrondie caractéristique des cellules sécrétrices de matrice cartilagineuse (THOROGOOD et HINCHLIFFE, 1975 ; ARCHER et al, 1982 ; ZANETTI et SOLURSH, 1984, 1986) et cessent leur prolifération (HERKEN, 1975 ; SOLURSH et REITER, 1975 ; MILLER et al, 1979 ; REVILLION-CARETTE, 1986). Les mécanismes qui régissent cette phase d'agrégation sont mal connus : les cations (SAN ANTONIO et TUAN, 1986), la fibronectine et les collagènes de type I et III pourraient faciliter le rapprochement des cellules (MELNICK et FRISCH, 1979; DESSAU et al, 1980; MELNICK et al, 1981 ; SILVER et al, 1981; TOMASEK et al, 1982) qui n'est par ailleurs possible que grâce à une destruction massive de l'acide hyaluronique présent en abondance dans la matrice intercellulaire (SINGLEY et SOLURSH, 1981 ; KOSHER et al, 1981 ; TOOLE et al, 1984 ; KNUDSON et TOOLE, 1985 ; OSTER et al, 1985). Considéré comme inhibiteur de synthèse de matrice s'il est en solution dans le milieu, (TOOLE et al, 1972 ; HANDLEY et LOWTHER, 1976 ; SOLURSH et al, 1980), l'acide hyaluronique, s'il sert de substrat à de jeunes cellules mésodermiques, peut jouer un rôle activateur dans la chondrogenèse ultérieure (KUJAWA et CAPLAN, 1986 ; KUJAWA et al, 1986). Quoi qu'il en soit, des remaniements de surface affectent les cellules en cours d'agrégation (ZIMMERMANN et THIES, 1984) et l'addition de lectines exogènes qui augmentent le processus d'agrégation stimule la chondrogenèse (MATSUTANI et KURODA, 1982 ; MATSUTANI et YAMAGATA, 1982).

*In vitro*, la chondrogenèse du mésoderme dans des milieux enrichis en sérum ne peut être obtenue que si les cellules sont cultivées à des densités élevées (UMANSKY, 1966 ; CAPLAN, 1970 ; AHRENS et col, 1977 ; OWENS et SOLURSH, 1981 ; DESBIENS, 1983). *In vivo*, le nombre de contacts (gap-junctions) et l'étendue de ces contacts augmentent sensiblement lors de la phase de condensation tandis que la taille des cellules diminue (ZIMMERMANN et col, 1982). Si le rapprochement des cellules paraît nécessaire, un excès d'adhésivité et une trop grande compaction peuvent inhiber la chondrogenèse comme chez le mutant "brachypode" (DUKE et ELMER, 1977, 1978, 1979).

La différenciation cartilagineuse de certaines cellules mésodermiques semble directement liée à la forme arrondie acquise par ces cellules pendant la phase d'agrégation. Expérimentalement, des cellules isolées les unes des autres après avoir été prélevées avant la phase de condensation ou même après leur différenciation cartilagineuse, n'expriment le phénotype cartilagineux qu'à la

condition d'avoir été maintenues dans une configuration spatiale sphérique (ARCHER et al, 1982 ; SOLURSH et al, 1982 ; GLOWACKI et al, 1983 ; ZANETTI et SOLURSH, 1984 ) ce qui laisse supposer que la forme de la cellule a un rôle au moins aussi important que les interactions qui surviennent lors de la constitution des blastèmes.

Pourtant, nombreux sont les chercheurs qui croient à **l'échange d'informations entre cellules au cours de leur agrégation** : ces interactions seraient notamment nécessaires à **l'augmentation du taux intracellulaire d'AMPc** indispensable au démarrage des synthèses des constituants de la matrice cartilagineuse (SOLURSH et al, 1979 ; HO et al, 1982). *In vitro*, une série de travaux précise le rôle de l'AMP cyclique. Réalisés sur cultures organotypiques d'apex ou sur cultures de cellules mésodermiques, ils montrent que le dibutyryl AMPc (dbAMPc) qui provoque l'augmentation du taux intracellulaire d'AMPc induit et stimule la chondrogenèse en jouant un rôle antagoniste de celui de la crête apicale (AHRENS et al, 1977 ; MERKER et GUNTHER, 1979 ; KOSHER et al, 1979b ; KOSHER et SAVAGE, 1980 ; SOLURSH et al, 1981 ; OWENS et SOLURSH, 1981). Les travaux réalisés dans notre laboratoire (REVILLION-CARETTE et al, 1986) ont confirmé et précisé le rôle joué par le dbAMPc dans la chondrogenèse à l'intérieur des bourgeons de membres de souris *in vitro*. Dans les jeunes bourgeons, l'AMPc favorise nettement la différenciation cartilagineuse même en présence d'ectoderme normalement inhibiteur de la chondrogenèse. Un peu plus tard au cours du développement, cette augmentation n'est significative qu'en absence d'ectoderme. Dans des bourgeons âgés, on assiste à une inhibition de la chondrogenèse que les bourgeons soient pourvus ou non d'ectoderme. L'analyse de ces résultats suggère que des cellules normalement non chondrogènes sont converties en cellules chondrogènes sous l'effet de l'AMPc, cette population réceptive disparaissant avec le vieillissement du bourgeon.

Selon le schéma exposé, l'augmentation du taux intracellulaire d'AMPc par apport de dbAMPc exogène à des cellules non agrégées doit déclencher leur différenciation cartilagineuse. Ceci a été clairement montré par HATTORI et IDE (1985) sur des cultures de mésoderme de bourgeon en faible densité dans des milieux appauvris en sérum. Mais le dbAMPc se montre incapable d'initier la chondrogenèse de cellules isolées, étalées dans un gel de collagène préconditionné par de l'ectoderme (ZANETTI et SOLURSH, 1986). D'autre part, certains des traitements que nous avons pratiqués sur des apex de souris semblent bien déterminer l'intégration des cellules recrutées aux blastèmes préchondrogènes en cours de formation ou déjà élaborés au moment du traitement (REVILLION-CARETTE, 1986). Il paraît donc difficile d'établir des relations causales entre l'agrégation cellulaire et l'augmentation du taux intracellulaire d'AMPc. Par ailleurs, notre étude a permis de préciser qu'en plus du recrutement cellulaire le dbAMPc pouvait stimuler le métabolisme des chondrocytes matures en place, mais aussi bloquer l'évolution des jeunes chondroblastes. Un mécanisme nucléaire possible a été décrit récemment (LEONARD et NEWMAN, 1987). Une protéine chromatinienne est phosphorylée spécifiquement dans la lignée

chondrogène du bourgeon de membre, très tôt pendant le processus de différenciation. Or, la protéinkinase responsable de ce remaniement est activée par l'AMPc. Cette modification de la protéine chromatinienne pourrait influencer l'expression génique et réguler l'acquisition du phénotype cartilagineux. Le traitement de cultures cellulaires de mésoderme alaire se traduit d'ailleurs par une augmentation très nette de la quantité des ARN messagers codant pour la synthèse du coeur protéique des protéoglycannes et pour la synthèse du collagène de type II (KOSHER et al, 1986).

Un autre facteur métabolique, le NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) a fait l'objet d'investigations (voir la revue de ELMER, 1982) mais un travail récent (MIDURA et al, 1986) n'a pu montrer de corrélations nettes entre les taux de NAD et la différenciation cartilagineuse du mésenchyme de bourgeon.

**Les prostaglandines de type E** stimulent fortement la chondrogenèse mais semblent en fait agir sur le taux intracellulaire d'AMPc (KOSHER et WALKER, 1983 ; BIDDULPH et al, 1984 ; GAY et KOSHER, 1984 ; KOSHER et GAY, 1985).

Certains extraits embryonnaires peuvent stimuler la chondrogenèse (RICHMOND et ELMER, 1980). Des concentrations faibles en sérum dans les milieux de culture favorisent également la chondrogenèse (HATTORI et IDE, 1984).

Le phénotype cartilagineux s'exprime par le **dépôt d'une abondante matrice autour des chondrocytes**. Cette matrice extracellulaire est formée de **collagène de type II et de protéoglycannes**. Les protéoglycannes résultent de l'association covalente d'un squelette protéique avec des chaînes de glycosaminoglycannes (HASCALL et HASCALL, 1981) : chondroïtine sulfate et sulfate de kératane.

Le noyau protéique du protéoglycanne peut être divisé en trois régions distinctes en fonction des variations qualitatives et quantitatives des glycosaminoglycannes auxquels il est lié :

- une région étendue située à une extrémité de la protéine, portant de nombreuses chaînes de chondroïtine sulfate,

- à l'autre extrémité, une région globulaire, pratiquement exempte de chaînes de glycosaminoglycannes mais portant des N-oligosaccharides et possédant un site de fixation non covalent, hautement spécifique pour l'acide hyaluronique,

- une région intermédiaire, où se greffent des chaînes de sulfate de kératane et des O-oligosaccharides.

Ces molécules monomériques de protéoglycannes s'associent à l'acide hyaluronique pour

constituer des agrégats dont le poids moléculaire peut atteindre 100 millions de daltons. Ces complexes multimoléculaires sont stabilisés par la présence de petites protéines de liaison qui consolident l'association (Pl. VII). La biosynthèse des protéoglycannes a lieu en deux temps : une phase intracellulaire au cours de laquelle le monomère est constitué et une phase extracellulaire au cours de laquelle les monomères sécrétés interagissent avec l'acide hyaluronique et les protéines de liaison pour constituer les agrégats (DORFMAN, 1981 ; HANDLEY et al, 1985).

L'étude de l'évolution de la structure des protéoglycannes au cours du vieillissement du cartilage a révélé que la maturation des chondrocytes s'accompagne :

- d'une diminution de la taille des chaînes de chondroïtine sulfate,
- d'une diminution de la proportion de chondroïtine 6-sulfate et d'une augmentation de celle de chondroïtine 4-sulfate,
- d'une augmentation du nombre et de la taille des chaînes de sulfate de kératane,
- d'une augmentation de la taille des monomères,
- d'une augmentation de leur capacité à interagir avec l'acide hyaluronique,
- d'une augmentation de la proportion de protéoglycannes agrégés par rapport à celle des monomères (HASCALL et al, 1976 ; DE LUCA et al, 1977; ROYAL et GOETINCK, 1977 ; MILAIRE, 1978 ; STOCUM et al, 1979 ; VASAN et LASH, 1979 ; OVADIA et al, 1980 ; ROYAL et al, 1980 ; CARRINO et al, 1983 ; CARRINO et CAPLAN, 1985 ; MATSUI et al, 1986 ; REVILLION-CARETTE et al, soumis).

Contrairement à ce qui a été montré au cours de la chondrogenèse somitique (KOSHER et al, 1973 ; KOSHER et CHURCH, 1975 ; VASAN et MILLER, 1985), différents constituants isolés de la matrice ne semblent pas influencer la synthèse des protéoglycannes du cartilage dans le membre, mais les glycosaminoglycannes sulfatés et les protéoglycannes sont essentiels à l'assemblage terminal du collagène de type II (TAKEDA et al, 1986).

Par contre, comme nous l'avons signalé antérieurement, l'acide hyaluronique en solution dans le milieu de culture inhibe la synthèse des protéoglycannes (TOOLE et al, 1972 ; HANDLEY et LOWTHER, 1976 ; SOLURSH et al, 1980) alors qu'il la stimule s'il sert de substrat à la culture cellulaire (KUJAWA et CAPLAN, 1986 ; KUJAWA et al, 1986).

La grande majorité des connaissances exposées de façon synthétique dans notre préambule a

été acquise grâce aux expérimentations menées chez les Oiseaux. L'accès aux embryons ne posant, en effet, pas de problème majeur, de nombreuses études expérimentales ont été réalisées et ont montré :

a) l'importance des interactions ecto-mésodermiques,

b) l'importance des interactions cellulaires locales au sein du mésoderme, dans la mise en place des membres de ce groupe particulier.

Par contre, chez les Mammifères, le développement *in utero* rend les observations difficiles et surtout s'oppose à l'expérimentation micro-chirurgicale.

Le but de notre travail a été de développer des techniques permettant d'approfondir les connaissances sur la morphogenèse squelettique dans le membre embryonnaire de souris *in vitro*. Nous avons mené nos recherches parallèlement sur trois modèles expérimentaux mais dans le seul but d'étudier certains des mécanismes régissant la mise en place d'un squelette cartilagineux organisé dans des ébauches de membres et certains des mécanismes présidant à la différenciation des cellules mésodermiques en chondrocytes. Nous exposerons et discuterons ici les données apportées par :

1) Les cultures organotypiques de jeunes bourgeons et d'apex de bourgeons plus âgés, de courte durée, destinées à étudier les interactions ecto-mésodermiques. (Pour simplifier la suite de l'exposé, ces cultures ont été rassemblées sous le vocable "cultures d'apex").

2) Les cultures cellulaires à haute densité de mésoderme de bourgeons, destinées à étudier la capacité chondrogène des cellules mésodermiques.

3) Les cultures organotypiques de bourgeons entiers, de longue durée, destinées à étudier la mise en place du patron squelettique *in vitro*.

## **MATERIEL ET METHODES**

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

## I. - MODELE BIOLOGIQUE

Des souris de la souche Swiss sont élevées au laboratoire. Les femelles sont groupées par 5 dans une même cage. Les accouplements sont assurés en plaçant dans chaque cage un seul mâle pendant une nuit. Le lendemain matin, la découverte d'un bouchon vaginal, considéré comme indice d'accouplement, détermine le jour 0 du calendrier de gestation. Les données de base de ce calendrier ont été établies par THEILER (1972). Nous les avons complétées à l'aide d'informations diverses (JURAND, 1965 ; MILAIRE, 1976) (Pl. I et II).

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

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

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

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

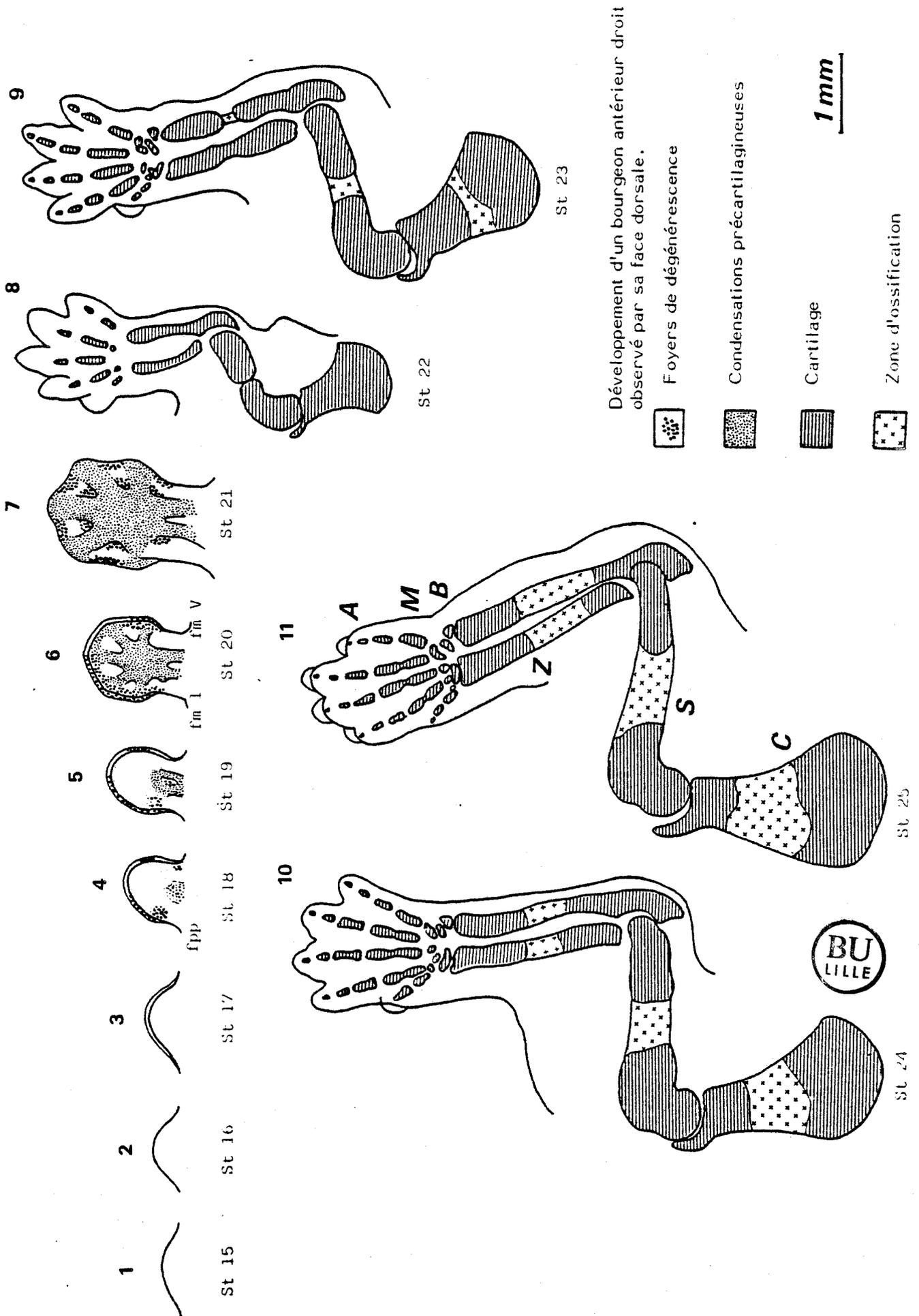
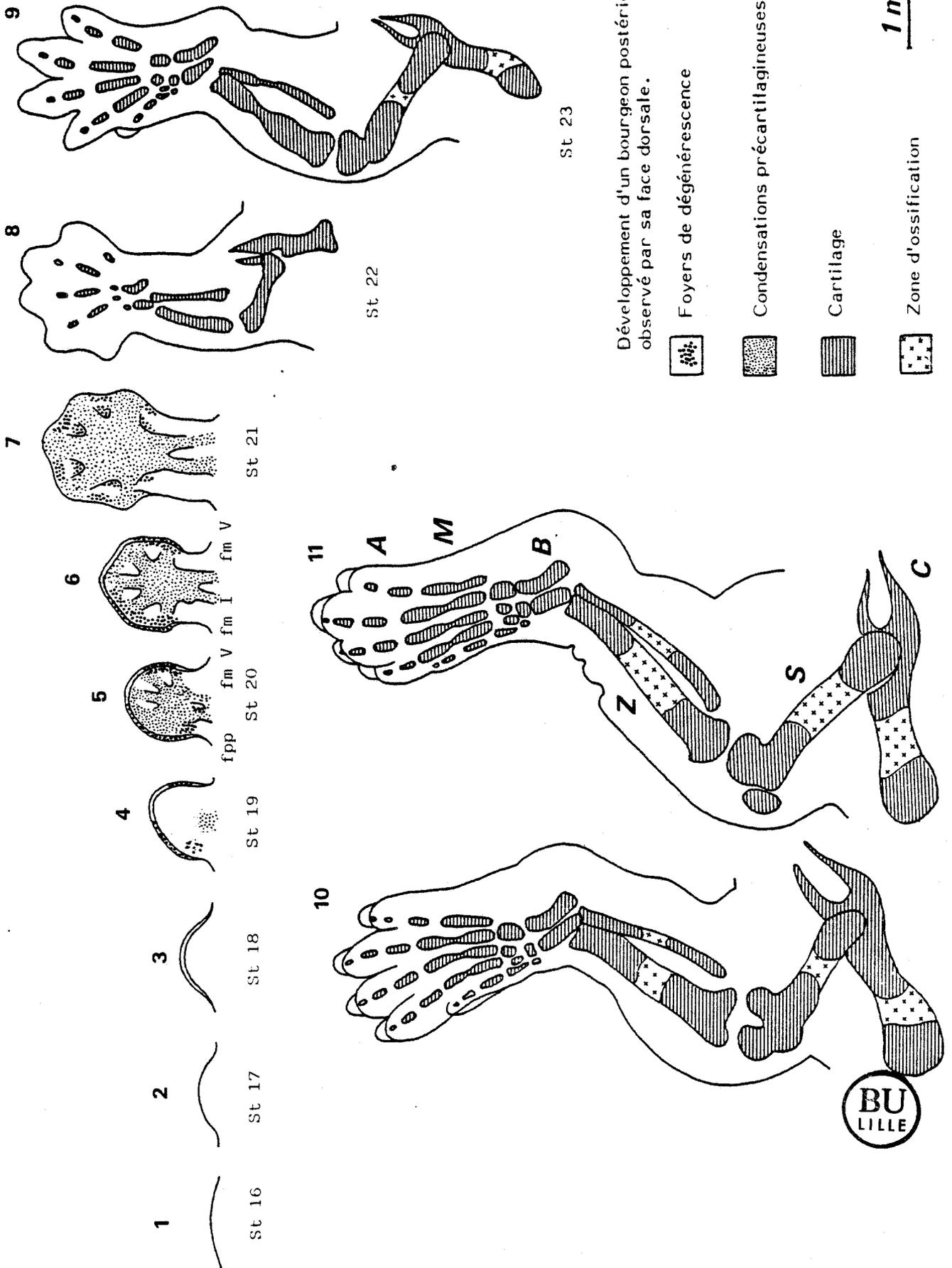


PLANCHE II : Développement d'un bourgeon de membre postérieur droit de souris, observé par sa face dorsale.



St 16

St 17

St 18

St 19

St 20

St 21

St 22

St 23

St 24

St 25

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

Foyers de dégénérescence

Condensations précartilagineuses

Cartilage

Zone d'ossification

1 mm

BU LILLE

Stade 18 : Au stade 18 (11 jours), la longueur de l'embryon est comprise entre 5 et 6 mm, on dénombre de 40 à 44 paires de somites. Le bourgeon antérieur, observé par sa face dorsale, montre une dissymétrie nette, il a la forme d'un cône dont la pointe est tournée vers la queue de l'embryon. (Pl. I, Fig. 4). Son bord postaxial est régulier alors que la base du futur autopode s'inscrit nettement sur son bord préaxial. Pour MILAIRE (1976), c'est à partir de ce stade que la crête apicale acquiert sa véritable configuration, elle a alors la forme d'une lentille saillante sur le bord libre du bourgeon.

Paradoxalement, cet auteur note l'apparition de foyers nécrotiques importants tant au niveau de la crête apicale qu'au niveau du mésoderme préaxial de la jeune palette (foyer préaxial primaire). Deux foyers dégénératifs affectent la crête : le plus étendu se situe sur toute la partie préaxiale de cette structure et ne disparaîtra que lors de la poussée des doigts, le second, très ponctuel, touchant l'extrémité postaxiale de la crête, disparaît rapidement.

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

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

Le bourgeon postérieur (Pl. II, Fig. 4) a la morphologie du bourgeon antérieur de stade 18. Sa crête apicale subit également des phénomènes de dégénérescence étendus mais le foyer préaxial primaire qui apparaît tardivement, n'est pas encore vraiment installé.

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

Avec le début de la poussée des bourgeons digitaux antérieurs s'amorce une seconde vague de dégénérescence. Un foyer marginal préaxial s'attaque à une épaisse couche de mésoblaste périphérique depuis le premier bourgeon digital jusqu'au milieu du troisième. Un foyer marginal postaxial affecte le mésoblaste interdigital du quatrième espace et celui du blastème qui constituera le cinquième rayon. Corrélativement, on note l'amincissement général de la crête apicale annonçant sa

régression imminente. La portion située en face des troisième espace interdigital et quatrième bourgeon digital est la seule à n'avoir subi aucun phénomène de dégénérescence au cours de l'existence de la crête apicale.

L'aspect des bourgeons postérieurs de stade 20 est comparable à celui des bourgeons antérieurs de stade 19. Les zones de nécrose couvrent l'essentiel de la crête apicale et on trouve encore le foyer préaxial primaire dans le mésoderme. On observe de plus, l'apparition précoce du foyer marginal postaxial à l'opposé de la palette (Pl. II, Fig. 5).

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

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

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

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

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

Stade 23 : Le quinzième jour de développement se caractérise par l'individualisation des orteils. La disposition radiée des doigts et des orteils persiste. Les segments squelettiques cartilagineux déjà en place s'allongent. L'autopode antérieur montre un basipode complet. Le

squelette de l'acropode est complet dans les trois rayons médians (Pl. I, Fig. 9). Au niveau du membre postérieur se constitue le basipode définitif mais les orteils II, III, IV, V ne comptent que deux phalanges, l'orteil I une phalange (Pl. II, Fig. 9). Les zones d'ossification s'étendent, on les trouve au niveau des ceintures, des stylo-podes et du zeugopode antérieur.

Stade 24 : Le foetus de 16 jours a un autopode où les doigts II, III, IV, V sont parallèles et commencent à fusionner (MACONNACHIE, 1979) au niveau de leur partie proximale. Les orteils restent isolés à ce stade. Les squelettes sont complets tant au niveau du basipode que de l'acropode (Pl. I et Pl. II, Fig. 10). Les zones d'ossification restent cantonnées au niveau de la ceinture, du stylo-pode et du zeugopode mais elles s'étendent vers les extrémités de ces segments.

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

## II. - TECHNIQUES OPERATOIRES

Après dislocation des vertèbres cervicales, les femelles supposées gravides sont opérées aux jours 10, 11 et 12 de gestation, ce qui permet de sélectionner des embryons parvenus respectivement aux stades 17, 18, 19 et 20, phases essentielles dans la mise en place des ébauches de membres (Pl. III).

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

- NaCl	6,8 g
- KCl	0,4 g
- CaCl <sub>2</sub>	0,2 g
- Mg SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
- Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	0,14 g
- Na H CO <sub>3</sub>	2,2 g
- Glucose	1 g
- Rouge de Phénol	0,01 g
- Eau bidistillée	1l
- Antibiotiques : Pénicilline 50 UI/ml	
Streptomycine 50 µg/ml	

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

S = somites

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

Foyers de dégénérescence



Condensations précartilagineuses



1mm



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

### III. - TECHNIQUES DE CULTURE

#### A - Cultures d'apex de bourgeons.

##### 1) Prélèvement des bourgeons de membres

Au stade 17, les bourgeons complets de membres antérieurs et postérieurs de petite taille sont excisés complets des flancs de chaque embryon. Pour les stades 19 et 20, seule la partie apicale des bourgeons (400 à 500  $\mu\text{m}$ ) est prélevée. Les explants de chaque type sont divisés en deux lots identiques. Le premier ne subit aucun traitement particulier et constitue le lot d'explants intacts ou "Ecto +". Le second est lavé dans une solution saline stérile dépourvue de calcium :

- NaCl	8 g
- KCl	0,2 g
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
- MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,1 g
- Rouge de Phénol	0,01 g
- Eau bidistillée	1l
- Antibiotiques : Pénicilline	50 UI/ml
	Streptomycine 50 $\mu\text{g/ml}$

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

Dans certains cas, des explants dénudés sont immédiatement "emballés" dans des lambeaux d'amnios ou des lambeaux de vésicule vitelline. Dans d'autres cas, des fragments d'ectoderme de bourgeon comportant la crête apicale ou des fragments d'ectoderme dorsal prélevés au niveau des somites sont introduits au coeur du massif mésodermique.

En dernier lieu, afin d'évaluer les éventuels effets secondaires du traitement enzymatique utilisé pour séparer l'ectoderme, des bourgeons et apex prélevés aux 3 stades ont été immergés dans une solution d'EDTA (25 mM dans la solution sans calcium) à température ambiante pendant 2 h. L'ectoderme est alors éliminé mécaniquement par pipetages successifs et isolement des lambeaux avec des pinces fines.

## **2) Système de culture**

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

## **3) Conditions de culture**

Le milieu de culture est constitué de MEM (minimum essential medium) avec sels de Earle additionné de 10% de sérum de veau foetal (Gibco) et d'antibiotiques (Pénicilline 50 UI/ml, Streptomycine 50  $\mu\text{g/ml}$ ). Les boîtes de Pétri sont placées en incubateur à 37° C dans une atmosphère contenant 5% de  $\text{CO}_2$ . La moitié du milieu est renouvelée toutes les 24 h. Les explants sont cultivés 3 jours.

## **B - Cultures cellulaires de mésoderme apical.**

### **1) Préparation des cultures en micromasses.**

Les bourgeons de stade 17 ou la partie apicale des bourgeons de stades 19 et 20 sont prélevés dans les conditions indiquées précédemment. Ces explants sont ensuite soumis à l'action de la trypsine pour éliminer la couverture ectodermique. Les massifs mésodermiques obtenus sont rassemblés et lavés dans la solution saline stérile dépourvue de calcium. Ils sont alors soumis à l'action d'un mélange trypsine-collagénase (0,05%-0,05% dans la solution saline sans calcium) pendant 5 mn à 37°C. La suspension cellulaire est obtenue par aspirations et refoulements successifs à travers une pipette Pasteur étirée. L'action enzymatique est stoppée en ajoutant un excès de milieu MEM contenant 10% de sérum de veau foetal. Les cellules sont récupérées par centrifugation, le

milieu surnageant est rapidement remplacé par du milieu de culture dans lequel les cellules sont remises en suspension. La concentration cellulaire est estimée à l'aide d'une cellule de THOMA. Les corrections nécessaires sont effectuées afin d'obtenir une concentration finale de  $2 \times 10^7$  cellules par ml. Le plus souvent, une fraction aliquote de cette suspension a été diluée de moitié afin d'estimer l'importance de la concentration cellulaire dans le devenir de la culture. Chaque suspension cellulaire est déposée directement sur le fond de boîtes de cultures (Falcon) ou sur des lamelles Thermanox par gouttes de 10  $\mu$ l (5 ou 6 dépôts par boîte ou lamelle. Les échantillons sont placés en incubateur pendant 1 h 15 mn pour permettre aux cellules de se fixer au substrat.

## **2) Conditions de culture.**

2 ml de milieu (MEM + 10% de sérum de veau foetal) sont ensuite ajoutés avec précaution pour éviter de décoller les nappes cellulaires. Les boîtes de Pétri sont maintenues à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub> et la moitié du milieu est renouvelée toutes les 24 heures. Les cultures sont fixées après 3 ou 4 jours.

## **3) Réassociation avec des feuillets embryonnaires.**

Les cultures de mésoderme en micromasses permettent des associations avec divers feuillets embryonnaires : 24 h après le dépôt de la suspension, l'ectoderme apical de bourgeons de membres obtenu après digestion enzymatique (trypsine à 2%), retourné en doigt de gant lors de son prélèvement, est placé au centre de certaines cultures de mésoderme tandis que des lambeaux d'ectoderme dorsal (obtenus également après digestion enzymatique) ou des lambeaux d'amnios sont greffés sur d'autres cultures. Leur fixation sur le mésoderme est possible à condition de baisser le niveau de milieu dans la boîte de façon à plaquer le greffon sur son support par le jeu des tensions superficielles. Après 2 heures à 37°C, un complément de milieu peut être fourni aux cultures sans détachement du greffon. Dans toutes nos manipulations, les feuillets réassociés ont le même âge que le mésoderme receveur : à titre d'exemple, des suspensions de mésoderme de stade 17 recevront 24 h après leur dépôt des feuillets épithéliaux provenant d'embryons de stade 19 et des suspensions de mésoderme de stade 19 recevront 24 h après leur dépôt des feuillets épithéliaux provenant d'embryons de stade 20 âgés.

## C - Cultures de bourgeons entiers.

### 1) Prélèvement des bourgeons.

Des bourgeons de membres antérieurs de stades 17 et 18 sont disséqués selon une ligne parallèle à la rangée de somites soit au niveau de leur insertion sur le flanc de l'embryon (Fig. 1-2), soit au niveau du pédoncule pour les stades 18 (Fig. 3).

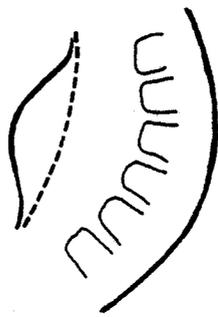


Fig.1

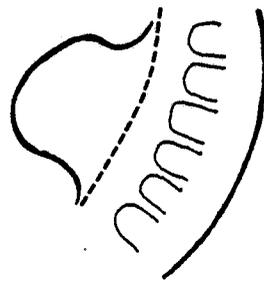


Fig.2

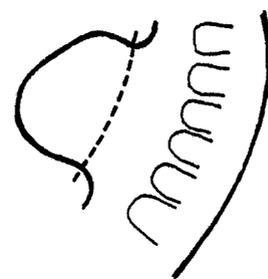


Fig.3

Dans une série d'expériences préliminaires destinées à améliorer les conditions de culture, des implants de papier lentille, de membrane Millipore (porosité  $0,8 \mu\text{m}$ ) ou de catgut (Réf. 56415, Laboratoires Robert et Carrière) ont été introduits à l'apex des bourgeons juste avant l'excision. Les résultats de ces expériences nous ont amenés à sélectionner le catgut qui améliore considérablement la qualité des prestations fournies par les bourgeons. L'effet de l'acide rétinoïque sur la morphogenèse squelettique a été étudié après insertion apicale d'implants de catgut calibrés ( $600 \mu\text{m}$  de long) imprégnés de cet acide par immersion prolongée (6 à 12h) dans des solutions allant de  $50 \mu\text{g}$  à  $5 \text{mg}$  par ml de DMSO.

### 2) Système de culture.

Le système employé pour ces cultures est rigoureusement comparable à celui décrit précédemment pour les cultures d'apex de bourgeons.

### 3) Conditions de culture.

Les 4 milieux suivant ont été employés seuls ou en combinaisons :

- le "BGJ de base" : ce milieu se compose de 75% de milieu de Bigger (1961) modifié selon S. Fitton-Jackson (non publié) et de 25% d'une solution contenant pour 100 ml :

700 mg de NaCl

42 mg de KCl

66 mg de CaCl<sub>2</sub>

Ce mélange est enrichi en acide ascorbique (0,9mM) en L-Glutamine (1,3 mM) et en antibiotiques (LESSMÖLLMANN et al, 1976).

- le "BGJ modifié" : au BGJ de base que nous venons de décrire, on ajoute 10% de sérum de veau foetal (lot sélectionné - Gibco)

- le "MEM de base" : il s'agit de MEM avec sels de Earle auquel on inclut 10% de sérum de veau foetal (lot sélectionné - Gibco) et des antibiotiques.

- le "MEM modifié" : le "MEM de base" est modifié selon KAPLOWITZ et al (1982) en ajoutant du facteur de croissance épidermique (EGF, 10 ng/ml), de l'insuline (1 µg/ml) et 10% de milieu conditionné par du foie foetal. Ce dernier composant est préparé en recueillant chaque jour le BGJ dans lequel sont cultivés sans sérum et pendant 3 jours des fragments de foie de foetus de 17 ou 18 jours. Une centrifugation permet d'éliminer les débris cellulaires flottant dans ce milieu.

Quel que soit le milieu ou la combinaison de milieux employés, la durée totale de la culture est de 6 jours. Le milieu est renouvelé par moitié chaque jour pendant les 4 premiers jours. Les boîtes sont placées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

## IV. - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES ET HISTOCHIMIQUES.

### A - Fixation, coloration et traitement des cultures organotypiques.

Les explants sont fixés pendant 24 h dans du Bouin Hollande acétique. Après lavage dans l'eau puis dans une solution de NH<sub>4</sub>OH à 2% dans l'alcool 70°, ils sont réhydratés et une première coloration au bleu Alcian 0,5%, pH 1, spécifique des groupements sulfatés (LEV et SPICER, 1964) est effectuée *in toto*. Après lavage et déshydratation, les explants sont éclaircis par le mélange salicylate de méthyle (4 parties) benzoate de benzyle (1 partie) afin de pouvoir apprécier

l'étendue de la chondrogenèse. Ils sont ensuite rincés à l'éthanol absolu puis placés dans le butanol avant leur inclusion dans la paraffine. Les blocs sont débités en coupes de 6 µm d'épaisseur. Les lames sont colorées à nouveau au bleu Alcian 0,5%, pH 1, puis à l'hématoxyline de Groat afin d'examiner l'étendue et la localisation de la matrice extracellulaire, la fréquence et la localisation des mitoses et, lorsqu'il est présent, l'étendue et l'aspect de l'ectoderme.

### **B - Fixation, coloration et traitement des cultures cellulaires.**

Après lavage des boîtes avec 2 ml de solution saline opératoire, les cultures en micromasses sont traitées au fixateur de Kahle pendant 15 mn

- Acide acétique 1 vol
- Alcool 95 15 vol
- Formol 6 vol
- H<sub>2</sub>O distillée 30 vol

puis rincées à l'eau distillée avant d'être colorées au bleu Alcian (0,5%, pH 1) pendant 30 mn. Les préparations subissent alors un nouveau lavage à l'eau et une contre-coloration à l'hématoxyline de Groat. 2 ml d'une solution d'alcool polyvinylique à 5% dans l'eau distillée sont ensuite introduits dans chaque boîte. Les cultures sont laissées en atmosphère sèche à 37°C jusqu'à évaporation totale, l'alcool polyvinylique subsistant sous la forme d'un film transparent qui emprisonne les cellules. Ce film, détaché du fond de la boîte, est placé dans un agrandisseur photographique, l'image projetée est dessinée pour le comptage ultérieur des nodules cartilagineux. Le traitement histologique de ce matériel est réalisé comme nous l'avons exposé plus haut, après dissolution du film dans l'eau, déshydratation progressive et inclusion dans la paraffine.

### **C - Etude des surfaces cellulaires.**

L'impact des traitements permettant l'élimination de l'ectoderme sur les surfaces cellulaires mésodermiques a été estimé après fixation de différentes lectines conjuguées au FITC (Isothiocyanate de fluorescéine)

- agglutinine de *Canavalia ensiformis*: Concanavaline A (Con A)
- agglutinine de *Phaseolus vulgaris*: Phytohémagglutinine (PHA)
- agglutinine de *Triticum vulgare* (WGA)
- agglutinine de *Ulex europaeus* (UeA)
- agglutinine de Soja (SBA)
- agglutinine de *Arachis hypogea* (PNA)

Des apex de bourgeons antérieurs de stade 19 soumis à l'action de la trypsine ou de l'EDTA dans les conditions décrites précédemment ainsi que les apex intacts témoins ont été fixés au liquide de Bouin (SODERSTROM et al, 1984 ; TAKAI et al, 1986) puis inclus dans la paraffine. 4 groupes de 2 ou 3 coupes (6  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) ont été montés par lame : 2 groupes "Ecto +" adjacents, 2 groupes "Ecto -" adjacents. Après déparaffinage et rinçage dans du tampon phosphate à pH 7,4 (PBS), les 1er et 3e groupes sont recouverts par 50  $\mu\text{l}$  de PBS, le 2e et 4e groupes sont recouverts par 50  $\mu\text{l}$  de PBS contenant la lectine. Sur un autre jeu de lames, les 1e et 3e groupes sont recouverts par 50  $\mu\text{l}$  de PBS contenant la lectine, les 2e et 4e groupes sont recouverts par 50  $\mu\text{l}$  de PBS contenant la lectine préincubée avec son sucre inhibiteur spécifique (Tableau I).

TABLEAU I : Lectines et sucres inhibiteurs utilisés

Lectine	Sucre inhibiteur utilisé
Con A	Mannose
PHA	N-acétyl galactosamine
WGA	N-acétyl glucosamine
UeA	L-Fucose
SBA	Galactose
PNA	Galactose

Les lectines ont été utilisées à la concentration de 250  $\mu\text{g/ml}$  de tampon phosphate avec en supplément pour la Con A du  $\text{CaCl}_2$  (1mM) et du  $\text{MnCl}_2$  (1mM). Les sucres inhibiteurs ont été utilisés à la concentration 0,2 M.

Après 30 mn d'incubation, les lames sont lavées au PBS (3x10 mn) puis les coupes sont colorées au bleu Evans (1/10000 dans le PBS). Enfin, les lames sont montées au mélange glycérol/PBS (1v/1v) et observées avec un microscope à fluorescence (OLYMPUS, BHZ RFL).

#### D - Etude des matrices intercellulaires.

Des échantillons traités par la trypsine ou l'EDTA et des échantillons intacts témoins (apex antérieurs de stade 19) ont été fixés dans le mélange préconisé par PUCHTLER et al (1970):

- Méthanol            6 v
- Chloroforme        3 v
- Acide Acétique    1 v

puis préparés comme précédemment pour une étude en immunofluorescence.

Des anticorps dirigés contre les collagènes de type I et IV humains fabriqués chez le lapin (Institut Pasteur Lyon) ont été utilisés dilués respectivement au 1/20<sup>ème</sup> et au 1/160<sup>ème</sup> avec du PBS (pH 7,4). L'anticorps dirigé contre la fibronectine humaine (Institut Pasteur Lille) a été utilisé dilué au 1/10<sup>ème</sup>.

Après déparaffinage et lavage au PBS les 1<sup>er</sup> et 3<sup>e</sup> groupes de coupes sont recouverts par 50 µl de PBS, les 2<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> groupes par 50 µl de la solution d'anticorps. Sur un autre jeu de lames, les 1<sup>er</sup> et 3<sup>e</sup> groupes de coupes sont recouverts par 50 µl de sérum de lapin non immunisé, les 2<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> groupes sont recouverts par 50 µl de la solution d'anticorps. Après 30 mn d'incubation, les coupes sont lavées au PBS (3 x 10 mn) puis recouvertes pendant 30 mn d'une solution au 1/100 d'anti IgG de lapin fabriquées chez le mouton et marquées au FITC. 2 lavages au PBS (10 mn) précèdent la coloration au bleu Evans (1/10000, 10 mn) et le montage final dans le mélange PBS-Glycérol.

## V. - CONTROLES ULTRASTRUCTURAUX

Ces contrôles ont été réalisés sur des apex traités à la trypsine ou à l'EDTA et sur des apex intacts (apex antérieurs de stade 19) selon une technique décrite par SINGLEY et SOLURSH (1980).

Les échantillons sont fixés à 4°C dans un mélange de paraformaldéhyde, de glutaraldéhyde et d'acide tannique respectivement à 2%, 1,5% et 2% dans du tampon cacodylate 0,075 M dont le pH est ajusté à 5,2. Le fixateur est renouvelé après 30 mn. La durée de fixation est de 20 heures. Après un rinçage dans le tampon, les pièces sont post-fixées à l'acide osmique à 1% dans du tampon cacodylate 0,1 M (pH 6,8) pendant 1 heure à 4°C. Les pièces sont ensuite incluses dans l'Epon. Les coupes ultra-fines sont colorées avec une solution à 3% d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb avant d'être observées au microscope électronique à transmission (JEOL).

## VI. - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

### A - Mesures d'incorporation de sulfate de sodium radioactif dans les glycosaminoglycannes sulfatés.

La chondrogenèse a été estimée par les mesures d'incorporation de sulfate <sup>35</sup>S dans les

glycosaminoglycannes sulfatés (GAG). Le marquage radioactif est assuré en apportant au milieu du sulfate de sodium ( $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ , Amersham, activité spécifique 100 mCi/mmol), à raison de 1  $\mu\text{Ci/ml}$  de façon continue au cours de la culture. Après 24 h et 72 h de culture, les explants d'une même catégorie sont homogénéisés par deux à l'appareil de Potter et soumis 30 secondes aux ultrasons (MSE, 150 Watt Ultrasonic Desintegrator). Des fractions aliquotes des homogénats sont prélevées pour effectuer les dosages de DNA alors que le reste est soumis à une digestion protéolytique à 37°C pendant 48 h. Celle-ci est assurée par l'action d'une solution (Tampon Tris/HCl 0,2 M, avec acétate de calcium 0,1 M, pH 8) contenant 400  $\mu\text{g/ml}$  de pronase (Calbiochem) ajoutée au broyat afin d'obtenir un rapport enzyme-substrat de 1/50 (la teneur en protéines a été déterminée au préalable par la méthode de LOWRY modifiée par MARKWELL et al, 1978). Les glycosaminoglycannes sont alors précipités pendant 3 h à température ambiante par du chlorure de cétilypyridinium (CPC) à 1% dans le NaCl 0,02 M (SAARNI et TAMMI, 1977). Le précipité est recueilli sur filtre Millipore (porosité 0,45  $\mu\text{m}$ ) après filtration sous vide partiel. Les filtres lavés au CPC sont ensuite séchés à l'étuve à 37°C puis dissous dans 6 ml de liquide scintillant (Lipofluor, J.T. Baker Chemicals). La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (LKB Wallac 1215). La radioactivité exprimée en coups par minutes (Cpm) est rapportée à la teneur en DNA.

## **B - Mesure de la teneur en DNA**

La teneur en DNA des explants est déterminée après homogénéisation par la technique de BRUNK et al (1979). Le principe de cette méthode est basé sur la propriété du 4,6 diamidino 2 phénylindole (DAPI) de se combiner spécifiquement aux paires de bases adénine-thymine pour donner un complexe fluorescent dont les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont respectivement 360 nm et 450 nm. La gamme étalon est réalisée dans une solution tampon pH7 (NaCl 100 mM, Tris 10 mM, EDTA 10mM) à partir de DNA de thymus de veau. Les mesures sont effectuées à l'aide d'un spectrofluorimètre (Perkin Elmer, LS3).

## **C - Caractérisation des protéoglycannes**

Des explants antérieurs de stade 17, intacts ou dénudés, sont incubés pendant 3 jours dans un milieu de culture contenant 10  $\mu\text{Ci/ml}$  de sulfate de sodium ( $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ , New England Nuclear, activité spécifique 500 mCi/mmol).

### **1) Extraction des protéoglycannes**

A l'issue de la culture, des explants (50 d'une même série expérimentale) sont rincés dans la

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

Dans ces conditions dites "dissociantes", les protéoglycannes présents dans la matrice cartilagineuse sous forme d'agrégats multimoléculaires sont dissociés en monomères. L'extraction a lieu sous agitation pendant 48 h à 4°C. L'extrait est ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 10 mn (Beckmann, Microfuge 12).

La moitié de cet extrait est dialysée à 4°C pendant 24 h (membrane Spectrapor 3, Spectrum Medical Industries) contre 2 bains d'acétate de sodium 0,5 M en présence d'inhibiteurs de protéases. Dans ces conditions, dites "associatives", les protéoglycannes reforment des agrégats (HASCALL et KIMURA, 1982) et l'on peut déterminer le pourcentage de monomères capables d'interagir avec l'acide hyaluronique et les protéines de liaison endogènes présents dans l'extrait.

## 2) Tamisage moléculaire

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

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

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

Dans la présente étude, les protéoglycannes sont fractionnés selon leur taille sur des colonnes (Pharmacia, 0,9 cm X 60 cm) de Sépharose CL-2B. En fonction des conditions, dissociantes ou associatives, les éluions sont pratiquées respectivement par du GuHCl 4 M ou par de l'acétate de sodium 0,5 M, à une vitesse de 10 ml/h. Dans le second cas, le gel est au préalable saturé en sérumbumine bovine (Sigma, 1 mg/ml) afin de limiter les adsorptions non spécifiques des

protéoglycannes. Les fractions recueillies ont un volume de 0,8 ml. La radioactivité contenue dans chaque fraction est déterminée après addition de 10 ml de liquide scintillant (ACS, Amersham). Les mesures, exprimées en Cpm sont effectuées pendant une durée de 4 mn dans un compteur à scintillation (Intertechnique, SL 4000).

## VII. - ANALYSE D'IMAGES

Les effets de l'acide rétinolique sur la chondrogenèse des bourgeons de membres ont été analysés par estimation des surfaces squelettiques colorées au bleu Alcian grâce au système d'analyse d'images SAMBA 200 (THOMSON-TITN). Les bourgeons entiers fixés après 6 jours de culture, colorés et éclaircis par le mélange salicylate de méthyle - benzoate de benzyle sont placés sur la platine du microscope équipé d'un objectif à faible grossissement (x4) de façon à obtenir une image bidimensionnelle complète des squelettes sur l'écran de contrôle. L'ordinateur est programmé pour calculer alors automatiquement la surface totale de l'explant ainsi que celle des zones différenciées en cartilage.

## VIII. - ANALYSES STATISTIQUES

Tous nos résultats sont exprimés en valeurs moyennes et écart-types. Le nombre de mesures figure à côté de chaque valeur. La significativité des résultats a été contrôlée à l'aide du test t de Student.

## CHAPITRE I

# LA CHONDROGENESE DANS LES APEX DE BOURGEONS DE MEMBRES DE SOURIS.

## I. - EFFETS DE L'ECTODERME SUR LA CHONDROGENESE.

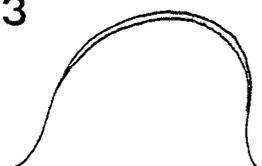
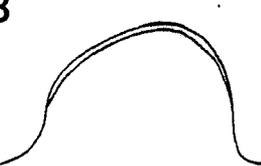
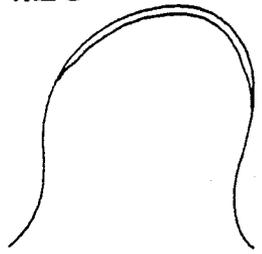
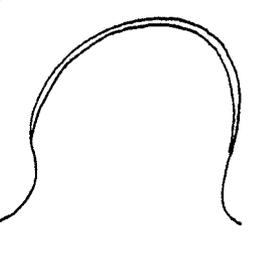
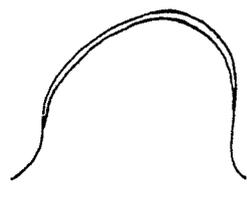
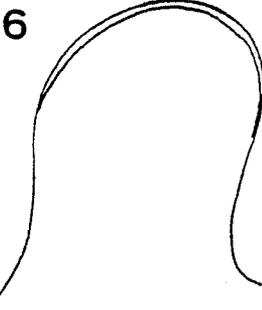
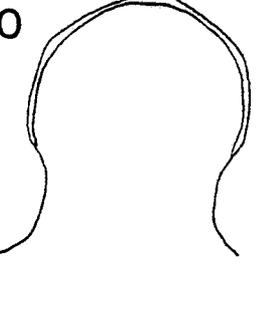
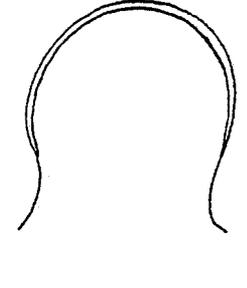
### A - Introduction

Les études expérimentales des corrélations ecto-mésodermiques intervenant lors de la différenciation squelettique dans les membres embryonnaires tendent à montrer l'existence de 3 phases successives où l'ectoderme se montre d'abord indispensable pour la survie du mésoderme et nécessaire pour promouvoir la différenciation cartilagineuse de certaines de ses cellules, puis une phase où l'ectoderme empêche la chondrogenèse anarchique du mésoderme et dirige la morphogenèse du bourgeon, enfin une phase où le mésoderme déterminé effectue une organogenèse squelettique normale. Ainsi GUMPEL-PINOT (1972-1973) chez l'oiseau aux stades 15-16 (HAMBURGER et HAMILTON, 1951; Pl. IV), MILAIRE et MULNARD (1968) chez la souris aux stades 16 et 17 (THEILER 1972), ont montré que le noyau mésodermique de très jeunes bourgeons de membres, privé de sa couverture ectodermique, dégénère dans la plupart des cas ; il peut, par contre, former du cartilage s'il est associé à de l'ectoderme de membre, mais les nodules cartilagineux différenciés sont séparés de l'ectoderme par un tissu conjonctif lâche (MILAIRE et MULNARD, 1968). Pour les bourgeons de membre plus âgés, le mésoderme apical indifférencié séparé expérimentalement de sa couverture ectodermique et cultivé *in vitro* se chondrifie sans présenter de morphogenèse normale (stade 25 chez l'embryon de poulet : KOSHER et al., 1979a). A ce stade, l'ectoderme conditionnerait donc le devenir des cellules du mésoderme sous-jacent en favorisant leur prolifération et en inhibant temporairement leur différenciation en cartilage. Dans cette partie de notre travail, nous avons étudié *in vitro* les capacités chondrogènes du mésoderme de bourgeons de membres de souris privé ou non de son ectoderme à différents stades de sa croissance.

### B - Protocole expérimental

En raison de leur petite taille, les bourgeons de membres antérieurs et postérieurs complets sont excisés des flancs d'embryons de stade 17. Pour les stades 19 et 20, seule la partie apicale des bourgeons (400 à 500  $\mu\text{m}$ ) est prélevée. Pour chaque stade examiné, les bourgeons postérieurs présentent un léger retard de développement par rapport aux antérieurs et, à ce titre, constituent une source d'information complémentaire. Les bourgeons sont mis en culture en présence ou non de leur couverture ectodermique, l'élimination mécanique de la calotte ectodermique étant pratiquée à la suite d'un traitement à la trypsine. Les examens morphologique et histologique sont menés sur des bourgeons ayant séjourné 72 heures *in vitro*.

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

<p><b>POULET</b>                      Bourgeon Antérieur                      Table de Hambur-                      ger et Hamilton</p>	<p><b>SOURIS</b>                      Bourgeon Antérieur      Bourgeon Postérieur                      Table de Theiler</p>	
<p>21</p> 	<p>17</p> 	
<p>23</p> 	<p>18</p> 	
<p>24.25</p> 	<p>19</p> 	
<p>26</p> 	<p>20</p> 	



La teneur en DNA et l'accumulation des glycosaminoglycannes sulfatés considérée comme indice de différenciation cartilagineuse sont estimées après 24 et 72 heures de culture dans des bourgeons incubés en présence de  $1\mu\text{Ci/ml}$  de  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  dès le début de la culture.

## **C - Résultats**

### **1) Evolution des bourgeons de stade 17**

#### **a) Etude morphologique.**

A l'issue de la culture, les bourgeons antérieurs et postérieurs pourvus d'ectoderme (22 cas de chaque type), présentent un allongement important : leur partie proximale fixée au support montre une chondrogenèse importante après coloration *in toto* (Pl. V, Fig. 1 et 5) les bourgeons antérieurs mettent en place des éléments squelettiques identifiables dans les meilleurs cas (Pl. V, Fig. 1). Les bourgeons dénudés (21 antérieurs, 9 postérieurs) évoluent très différemment : ils se sont affaissés sur le filtre support. En général, le bleu Alcian les colore en grande partie. L'intensité de cette coloration est plus faible dans les explants postérieurs "Ecto -". En aucun cas, on n'a pu reconnaître des éléments squelettiques organisés (Pl. V, Fig. 3 et 7).

#### **b) Etude histologique**

Au moment du prélèvement, les bourgeons de stade 17 présentent un mésoderme homogène. Après 3 jours de culture, l'ectoderme des explants antérieurs emballe un mésenchyme lâche où l'on observe de nombreuses mitoses. Au coeur du mésoderme apparaissent du côté distal une ou deux zones de condensation cellulaire. La présence d'un mince liseré bleu entre les cellules de certaines condensations indique le début des synthèses des composants sulfatés de la matrice. Ces zones se prolongent du côté proximal par une baguette de cartilage dont les cellules hypertrophiées sont séparées par une matrice épaisse. La partie de l'explant qui n'est pas couverte d'ectoderme présente des nodules aux limites nettes. Les chondrocytes observés à ce niveau ont une matrice particulièrement abondante (Pl. V, Fig. 2).

Les bourgeons antérieurs dénudés (Pl V, Fig. 4) ont un aspect sensiblement différent : chaque explant est constitué d'un massif de cellules entourées d'une matrice colorable épaisse, mais ces cellules n'atteignent pas le stade de chondrocyte hypertrophié. En général, quand on s'éloigne du centre du massif, la matrice cartilagineuse s'amincit progressivement et on passe sans transition nette à des cellules non entourées de matrice regroupées en quelques îlots de taille faible par rapport à l'ensemble du massif chondrogène. On observe enfin quelques zones de dégénérescence cellulaire

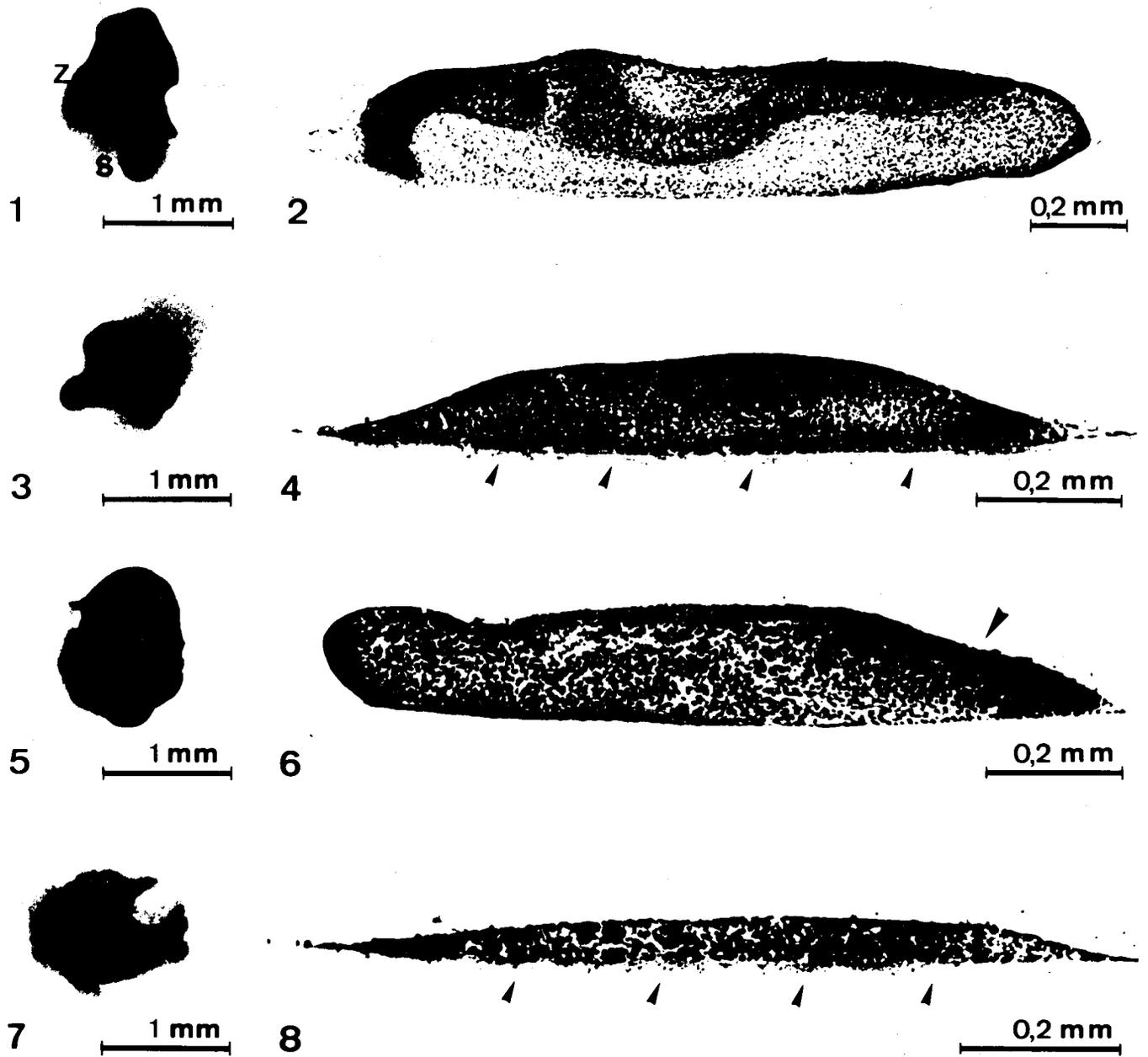
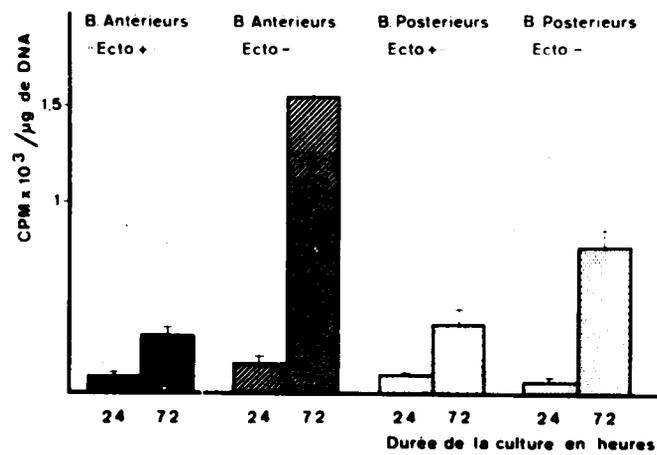


Fig. 9



à la périphérie des bourgeons ou exceptionnellement contre le filtre.

La calotte ectodermique des bourgeons postérieurs (Pl. V, Fig. 6) recouvre un massif mésodermique encore indifférencié. La matrice cartilagineuse n'apparaît qu'autour des cellules situées dans des zones éloignées de l'ectoderme. Les mitoses sont nombreuses dans le mésoderme, plus rares dans les nodules en cours de différenciation.

Dans des conditions de culture identiques, les explants postérieurs dénudés ont une survie très aléatoire. Les bourgeons qui ont pu être analysés (9/19 cas) se sont aplatis complètement. Les quelques assises cellulaires encore vivantes sont entourées d'une matrice peu épaisse (Pl. V, Fig. 8). Il reste très peu de cellules non entourées de matrice. Les zones de dégénérescence sont nombreuses et très étendues.

#### c) Evolution de la teneur en DNA (Tableau 2).

L'évolution de la teneur en DNA des jeunes bourgeons mis en culture en présence de sulfate radioactif montre leur pouvoir de prolifération : seuls les bourgeons postérieurs dénudés voient leur contenu en DNA diminuer au cours de la culture, ce qui confirme la fragilité de ce type d'explant *in vitro*. En règle générale, on note que les valeurs obtenues pour les explants dénudés sont inférieures à celles de leurs homologues pourvus d'ectoderme.

#### d) Synthèse des GAG sulfatés (Tableau 5; Pl. V, Fig. 9)

Dans tous les cas, les explants incorporent et accumulent le sulfate radioactif fourni, mais l'absence d'ectoderme (qu'il s'agisse de bourgeons antérieurs ou postérieurs) oriente nettement le métabolisme des cellules vers la synthèse des composants du cartilage.

## 2) Evolution des apex de bourgeons de stade 19

### a) Etude morphologique

A la fin de la culture, les apex antérieurs intacts (21 cas) ont élaboré une palette autopodiale caractérisée par l'émergence de rayons digitaux. Chaque explant contient le squelette rudimentaire du métapode et, dans sa partie proximale, un ou deux gros nodules parfois fusionnés (Pl. VI, Fig. 1). Les explants antérieurs dénudés (24 cas) ont un devenir différent : ils ont une forme de dôme affaissé et sont constitués d'un assemblage de nodules cartilagineux (Pl. VI, Fig. 3).

Les apex postérieurs "Ecto +" (25 cas) ont une chondrogenèse limitée à la zone axiale dans leur partie distale, mais présentent de gros nodules fusionnés dans leur partie proximale.

à la périphérie des bourgeons ou exceptionnellement contre le filtre.

La calotte ectodermique des bourgeons postérieurs (Pl. V, Fig. 6) recouvre un massif mésodermique encore indifférencié. La matrice cartilagineuse n'apparaît qu'autour des cellules situées dans des zones éloignées de l'ectoderme. Les mitoses sont nombreuses dans le mésoderme, plus rares dans les nodules en cours de différenciation.

Dans des conditions de culture identiques, les explants postérieurs dénudés ont une survie très aléatoire. Les bourgeons qui ont pu être analysés (9/19 cas) se sont aplatis complètement. Les quelques assises cellulaires encore vivantes sont entourées d'une matrice peu épaisse (Pl. V, Fig. 8). Il reste très peu de cellules non entourées de matrice. Les zones de dégénérescence sont nombreuses et très étendues.

#### c) Evolution de la teneur en DNA (Tableau 2).

L'évolution de la teneur en DNA des jeunes bourgeons mis en culture en présence de sulfate radioactif montre leur pouvoir de prolifération : seuls les bourgeons postérieurs dénudés voient leur contenu en DNA diminuer au cours de la culture, ce qui confirme la fragilité de ce type d'explant *in vitro*. En règle générale, on note que les valeurs obtenues pour les explants dénudés sont inférieures à celles de leurs homologues pourvus d'ectoderme.

#### d) Synthèse des GAG sulfatés (Tableau 5; Pl. V, Fig. 9)

Dans tous les cas, les explants incorporent et accumulent le sulfate radioactif fourni, mais l'absence d'ectoderme (qu'il s'agisse de bourgeons antérieurs ou postérieurs) oriente nettement le métabolisme des cellules vers la synthèse des composants du cartilage.

## 2) Evolution des apex de bourgeons de stade 19

### a) Etude morphologique

A la fin de la culture, les apex antérieurs intacts (21 cas) ont élaboré une palette autopodiale caractérisée par l'émergence de rayons digitaux. Chaque explant contient le squelette rudimentaire du métapode et, dans sa partie proximale, un ou deux gros nodules parfois fusionnés (Pl. VI, Fig. 1). Les explants antérieurs dénudés (24 cas) ont un devenir différent : ils ont une forme de dôme affaissé et sont constitués d'un assemblage de nodules cartilagineux (Pl. VI, Fig. 3).

Les apex postérieurs "Ecto +" (25 cas) ont une chondrogenèse limitée à la zone axiale dans leur partie distale, mais présentent de gros nodules fusionnés dans leur partie proximale.

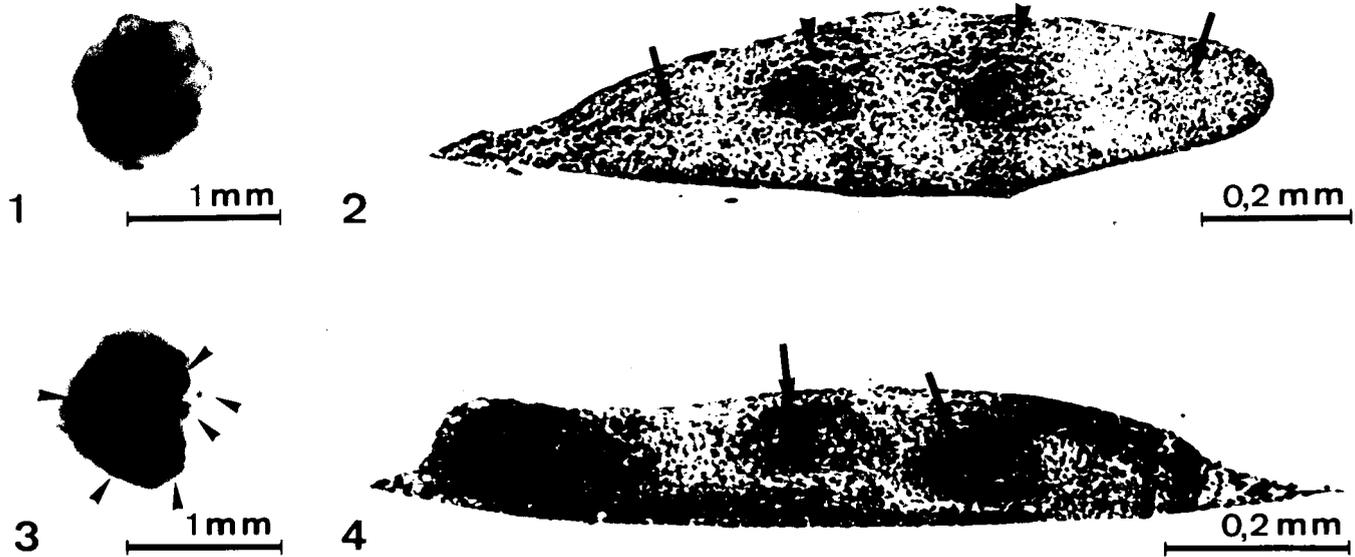


Fig. 5

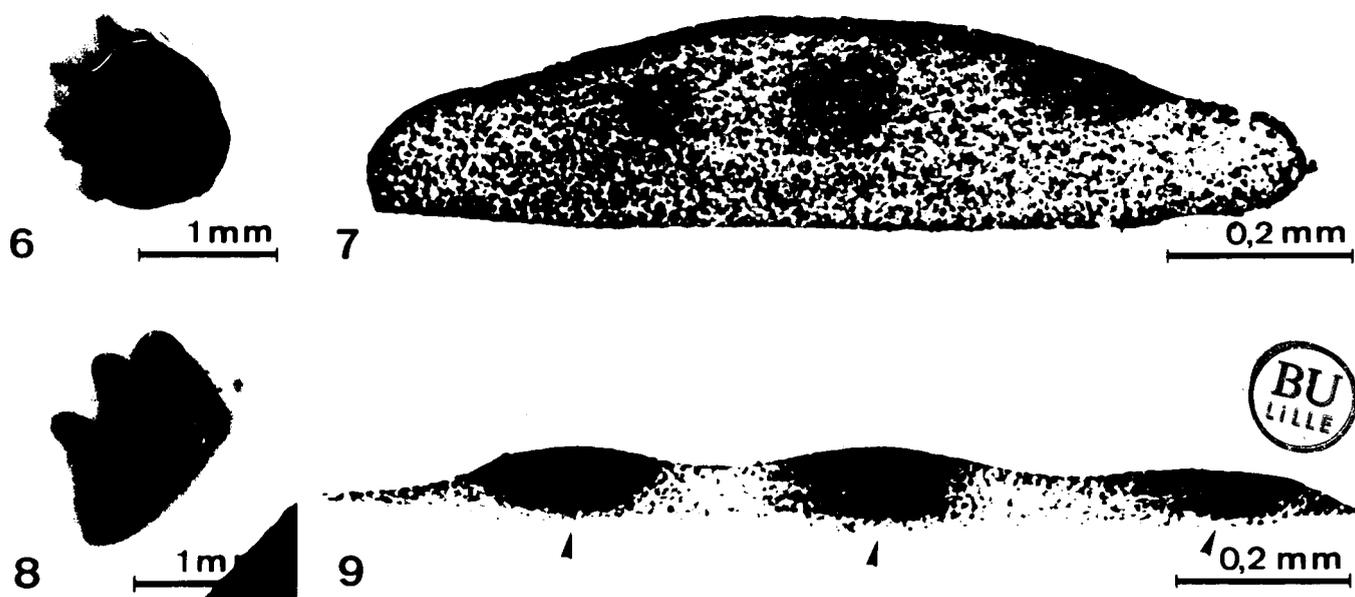
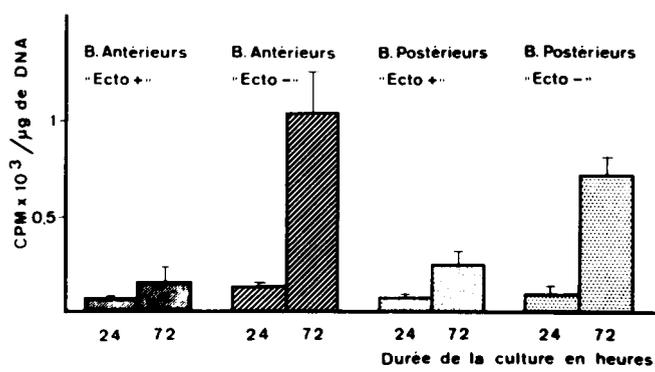
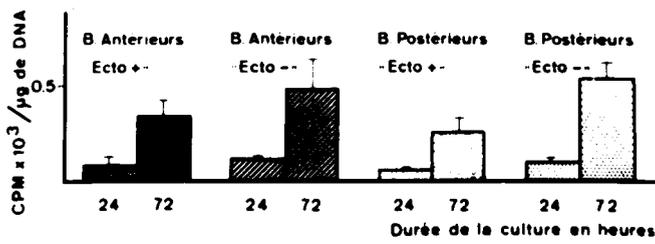


Fig. 10



L'évolution des apex postérieurs dénudés est comparable à celle des apex antérieurs "Ecto -" (20 cas).

#### b) Etude histologique

Au stade 19, les bourgeons antérieurs présentent une palette distale arrondie où le mésoderme est homogène. Leur partie proximale plus étroite contient une zone centrale où la densité cellulaire importante annonce une chondrogenèse imminente. Le mésoderme des bourgeons postérieurs est homogène, sans condensation proximale.

Après 3 jours de culture, on trouve deux zones principales dans les apex antérieurs "Ecto +". L'une proximale, non recouverte d'ectoderme, se compose de nodules cartilagineux formés de chondrocytes hypertrophiés. Ces nodules correspondent vraisemblablement à l'extrémité du zeugopode. L'autre zone recouverte d'ectoderme présente de petits nodules cartilagineux disposés de façon rayonnée (Pl. VI, Fig. 2). La matrice y est d'autant plus discrète qu'on s'éloigne de la zone dénudée et, dans certains explants, cet autopode n'est représenté que par 3 ou 4 zones de condensation cellulaire. Un mésenchyme abondant entoure les nodules et occupe la partie distale de l'explant. De nombreuses mitoses sont observées, la plupart dans le mésenchyme, quelques unes dans le cartilage différencié, mais aucune dans les zones de condensation.

Les coupes réalisées à partir d'explants antérieurs dénudés montrent plusieurs nodules constitués de chondrocytes hypertrophiés entourés de cellules à matrice épaisse (Pl. VI, Fig. 4). A la périphérie des nodules, la matrice disparaît progressivement tandis que la densité cellulaire s'élève. Entre les nodules persistent quelques travées de cellules où l'on n'observe aucune matrice colorable. Quelques traces de dégénérescence apparaissent parfois à la limite externe des explants.

Les apex postérieurs, d'un point de vue histologique, évoluent de façon identique : abondant mésenchyme, chondrogenèse limitée à la zone axiale dans les explants pourvus d'ectoderme (le squelette autopodial n'apparaît pas), chondrogenèse anarchique et intense dans les explants dénudés.

#### c) Evolution de la teneur en DNA (Tableau 3)

Les valeurs obtenues pour les explants couverts d'ectoderme montrent une diminution non significative du taux de DNA en fin de culture. Cette diminution est plus importante pour les apex de bourgeons "Ecto -". Ces derniers examinés 24 heures ou 72 heures après le début de la culture contiennent toujours une quantité de DNA très inférieure à celle de leurs homologues "Ecto +".

TABLEAU 2

Teneur en DNA (en  $\mu\text{g}$ ) des bourgeons de stade 17 après 24 h et 72 h de culture.

	Antérieurs "Ecto +"	Antérieurs "Ecto -"	Postérieurs "Ecto +"	Postérieurs "Ecto -"
24 heures	$2,25 \pm 0,52$ n = 6	$0,76 \pm 0,14$ n = 5	$1,31 \pm 0,09$ n = 4	$1,74 \pm 0,34$ n = 4
72 heures	$3,37 \pm 1,03$ n = 5 *	$1,37 \pm 0,26$ n = 5 **	$2,82 \pm 0,7$ n = 5 **	$1,41 \pm 0,33$ n = 2

TABLEAU 3

Teneur en DNA (en  $\mu\text{g}$ ) des apex de bourgeons de stade 19 après 24 h et 72 h de culture.

	Antérieurs "Ecto +"	Antérieurs "Ecto -"	Postérieurs "Ecto +"	Postérieurs "Ecto -"
24 heures	$3,44 \pm 1,16$ n = 4	$1,57 \pm 0,26$ n = 4	$3,14 \pm 0,24$ n = 4	$2,20 \pm 0,59$ n = 4
72 heures	$2,78 \pm 0,85$ n = 5	$1,03 \pm 0,26$ n = 5	$2,25 \pm 0,45$ n = 5	$0,97 \pm 0,23$ n = 5

TABLEAU 4

Teneur en DNA (en  $\mu\text{g}$ ) des apex de bourgeons de stade 20 après 24 h et 72 h de culture.

	Antérieurs "Ecto +"	Antérieurs "Ecto -"	Postérieurs "Ecto +"	Postérieurs "Ecto -"
24 heures	$3,89 \pm 0,79$ n = 6	$2,90 \pm 0,12$ n = 5	$3,89 \pm 0,64$ n = 6	$2,65 \pm 0,36$ n = 5
72 heures	$4,40 \pm 1,18$ n = 6	$2,23 \pm 0,43$ n = 6 **	$3,20 \pm 0,67$ n = 6	$2,18 \pm 0,40$ n = 6

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

Le test t de Student est calculé pour comparer les valeurs du contenu en DNA entre les explants à 24 h et les explants à 72 h dans chaque catégorie (\*= $P < 0,05$  ; \*\*= $P < 0,01$ ) ou entre les explants "Ecto +" et "Ecto -" de même type (•= $P < 0,05$  ; ••= $P < 0,01$ ).

TABLEAU 5

Accumulation des GAG sulfatés dans les bourgeons de stade 17 après 24 h et 72 h de culture (en cpm/ $\mu$ g de DNA.).

	Antérieurs "Ecto +"	Antérieurs "Ecto -"	Postérieurs "Ecto +"	Postérieurs "Ecto -"
24 heures	104 $\pm$ 20 n = 6	165 $\pm$ 41 n = 5	111 $\pm$ 12 n = 4	68 $\pm$ 23 n = 4
72 heures	308 $\pm$ 37 n = 5 **	1552 $\pm$ 278 n = 5 **	370 $\pm$ 76 n = 5 **	769 $\pm$ 92 n = 2 **

TABLEAU 6

Accumulation des GAG sulfatés dans les apex de bourgeons de stade 19 après 24 h et 72 h de culture (en cpm/ $\mu$ g de DNA).

	Antérieurs "Ecto +"	Antérieurs "Ecto -"	Postérieurs "Ecto +"	Postérieurs "Ecto -"
24 heures	82 $\pm$ 7 n = 4	137 $\pm$ 20 n = 4	83 $\pm$ 18 n = 4	102 $\pm$ 36 n = 4
72 heures	162 $\pm$ 82 n = 5	1038 $\pm$ 216 n = 5 **	247 $\pm$ 70 n = 5 **	726 $\pm$ 91 n = 5 **

TABLEAU 7

Accumulation des GAG sulfatés dans les apex de bourgeons de stade 20 après 24 h et 72 h de culture (en cpm/ $\mu$ g de DNA).

	Antérieurs "Ecto +"	Antérieurs "Ecto -"	Postérieurs "Ecto +"	Postérieurs "Ecto -"
24 heures	93 $\pm$ 16 n = 6	119 $\pm$ 12 n = 5	68 $\pm$ 12 n = 6	113 $\pm$ 25 n = 5
72 heures	344 $\pm$ 78 n = 6 **	482 $\pm$ 158 n = 6 **	256 $\pm$ 68 n = 6 **	540 $\pm$ 77 n = 6 **

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

Le test t de Student est calculé pour comparer les valeurs d'accumulation entre les explants à 24 h et les explants à 72 h dans chaque catégorie (\*=P<0,05 ; \*\*=P<0,01) ou entre les explants "Ecto +" et "Ecto -" de même type (\*=P<0,05 ; \*\*=P<0,01).

#### d) Synthèse des GAG sulfatés (Tableau 6; Pl. VI, Fig. 5)

Dans des conditions de culture équivalentes, les apex de bourgeons de stade 19 dépourvus d'ectoderme accumulent le sulfate radioactif de façon significativement plus importante que leurs homologues complets. Les mesures traduisent de nouveau une orientation du métabolisme global des explants "Ecto -" vers la différenciation cartilagineuse.

### 3) Evolution des apex de bourgeons de stade 20

#### a) Etude morphologique

Après 3 jours de culture, les apex antérieurs "Ecto +" (13 cas) montrent des rayons digitaux saillants (Pl. VI, Fig. 6). Le squelette autopodial se compose de 3 ou 4 rayons cartilagineux bien individualisés comportant métacarpiens et phalanges.

Dénudés, ces apex (13 cas) mettent en place les mêmes rayons digitaux (Pl. VI, Fig. 8).

Les bourgeons postérieurs fournissent des prestations équivalentes, l'émergence des rayons digitaux est simplement moins accentuée lorsqu'on observe les explants "Ecto +" (10 cas) en fin de culture. On rencontre parfois des fusions entre les rayons digitaux des explants "Ecto -" (9 cas).

#### b) Etude histologique

Au moment du prélèvement, les bourgeons antérieurs et postérieurs ont une palette autopodiale où l'on distingue les futurs rayons digitaux sous forme de condensations cellulaires. La partie proximale contient l'ébauche du stylopode et du zeugopode. Les cellules les plus proximales ont commencé le dépôt de matrice cartilagineuse.

Après 3 jours de culture, l'étude histologique des apex antérieurs et postérieurs "Ecto +" révèle la présence de 3 ou 4 rayons cartilagineux enrobés d'un abondant mésenchyme (Pl. VI, Fig. 7). Des mitoses sont présentes dans les 2 tissus.

Le squelette autopodial des apex dénudés de stade 20, plaqué contre le filtre, est entouré de mésenchyme, mais les zones interdigitales contiennent moins de cellules que dans les explants "Ecto +" (Pl. VI, Fig. 9).

#### c) Evolution de la teneur en DNA (Tableau 4)

Dans cette série expérimentale, nous n'avons pas observé d'évolution significative de la teneur en DNA pour chaque type d'explant pendant les 3 jours de culture. Qu'on se situe au jour I

ou au jour 3, le contenu en DNA des apex dénudés est toujours significativement inférieur à celui de leurs homologues pourvus d'ectoderme.

#### d) Synthèse des GAGs sulfatés (Tableau 7; Pl. VI, Fig. 10)

Après 3 jours de culture, l'accumulation des GAG sulfatés dans les explants antérieurs "Ecto +" et "Ecto -" ne diffère plus significativement. Il apparaît que les différences dans le rapport GAG/DNA peuvent s'interpréter en partie par la diminution de la quantité de DNA entre ces deux types d'explants.

Les apex postérieurs dénudés ont un métabolisme encore légèrement orienté vers la différenciation cartilagineuse mais dans des proportions très inférieures à celles des explants plus jeunes.

### D - Discussion

Les résultats obtenus *in vitro* chez la souris confirment l'importance du rôle de l'ectoderme au cours de la morphogenèse du bourgeon de membre tout en soulignant les différences de compétence entre, d'une part, les bourgeons prélevés aux stades 17 et 19, et d'autre part, ceux prélevés au stade 20.

Nous commenterons donc successivement les prestations de ces différents types d'explants à la fois qualitativement et quantitativement. Toutefois, dans un premier temps, il convient d'apprécier l'incidence éventuelle des techniques utilisées sur nos résultats et de préciser les limites de notre apport de données quantitatives.

#### 1) Considérations techniques

a) Soulignons d'abord que la petite taille des explants et la sensibilité des techniques n'ont permis que des mesures globales effectuées sur deux explants pris dans leur ensemble. La variabilité inévitable de la taille initiale des explants peut expliquer en partie la variabilité des écart-types de nos mesures.

b) Au niveau de la teneur globale en DNA, l'absence d'ectoderme entraîne une chute nette après 24 heures de culture suivie d'un maintien et parfois d'une augmentation. Ceci pourrait signifier que nos conditions expérimentales amènent la sélection rapide de certains types cellulaires plus adaptés que d'autres à la culture *in vitro*. Récemment THAL et al (1986) ont montré que les chondroblastes supportent beaucoup mieux la culture que les myoblastes. Ces derniers exigent la

présence de sérum de veau foetal dans le milieu pour survivre et, même dans ces conditions, n'évoluent que dans des zones bien précises.

c) Le métabolisme de synthèse des GAG par les explants a été évalué par l'incorporation de radio-sulfate dans ces explants. Or, les études histologiques montrent que les filtres supportant les explants "Ecto -" en particulier renferment une quantité importante de matériel de type matriciel. Il est donc vraisemblable que des GAG ont diffusé dans le milieu de culture que nous n'avons pas étudié. Dans ces conditions, les mesures faites ne peuvent que sous-estimer la synthèse de ces GAG. Par ailleurs, la quantité de GAG ainsi estimée est celle qui s'est accumulée pendant toute la durée de culture et il est possible qu'une partie de ces GAG provienne de cellules disparues en cours de culture.

d) Pour comparer les intensités de synthèse des GAG dans les différents explants, nous avons évalué le rapport entre la radioactivité globale des explants et leur teneur en DNA qui rend compte du nombre de cellules cultivées. Or, même en l'absence d'ectoderme, on distingue par l'étude histologique plusieurs types cellulaires dans les explants. Plus les cellules non chondrogènes sont nombreuses et plus faible est le rapport entre les GAG marqués et la teneur totale en DNA. Il est donc évident que ce type de rapport ne représente pas l'activité de synthèse moyenne des GAG par cellule chondrogène, et qu'il indique, en fin de compte, une tendance globale de l'activité synthétique de l'explant.

e) Nous avons considéré que le sulfate radioactif fourni aux cultures était incorporé dans les glycosaminoglycannes de la matrice cartilagineuse. L'accumulation du précurseur dans les GAG a été directement assimilée à l'activité chondrogène des explants. En effet, les examens cytochimiques montrent en général que l'incorporation de sulfate radioactif coïncide avec l'apparition d'une matrice cartilagineuse. Cependant, la corrélation entre données histologiques et mesures d'incorporation n'est pas toujours évidente. Par conséquent, le précurseur pourrait être incorporé dans des glycosaminoglycannes non spécifiques de cette matrice comme l'héparane sulfate ou le dermatane sulfate ou encore dans des GAG sulfatés appartenant à des monomères "ubiquistes" non spécifiques (OKAYAMA et al, 1976 ; VASAN et LASH, 1979 ; ROYAL et al, 1980 ; CARRINO et al, 1983 ; MATSUI et al, 1986). Des expériences complémentaires ont donc été menées afin de lever cette ambiguïté. Leurs résultats, exposés en détail dans le chapitre suivant, tendent à montrer que le sulfate radioactif est bien incorporé dans des monomères de grande taille capables de s'agréger pour former les protéoglycannes spécifiques du cartilage.

## 2) Rôle de l'ectoderme des bourgeons de stades 17 et 19

Aux stades 17 et 19, l'ectoderme favorise la croissance du bourgeon et empêche les cellules mésodermiques voisines de se différencier en cartilage. Libérées de l'influence ectodermique (au coeur des bourgeons et apex "Ecto +", dans les explants "Ecto -") les cellules s'engagent dans la voie de la différenciation. En d'autres termes, aux stades considérés, sous l'influence de l'ectoderme, on assiste :

- a) à la multiplication des cellules mésodermiques du bourgeon,
- b) à leur ségrégation progressive en deux populations, l'une périphérique à l'origine des tissus conjonctifs et musculaires, l'autre centrale à l'origine des éléments squelettiques cartilagineux.

Il a été montré ici que, privés de leur couverture ectodermique, les bourgeons de membres de souris de stade 17 et 19 sont incapables de s'allonger et de mettre en place la population périphérique et que, de plus, la plupart des cellules du mésoderme s'engagent dans une chondrogenèse très active. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez le poulet par KOSHER et al. (1979a). Les apex de bourgeons de membres de stade 25 utilisés par cet auteur (Pl. IV) présentent, dans des conditions de culture différentes de celles décrites ici, une évolution tout-à-fait comparable. En outre, KOSHER a montré que c'est la crête apicale qui contrôle la croissance des explants en empêchant les cellules distales sous-jacentes de se différencier : la disparition de la crête en fin de culture permet l'apparition de cartilage dans cette zone.

L'absence d'ectoderme détermine une mortalité cellulaire importante (comme chez la souris où nous avons observé des dégénérescences cellulaires et la chute des teneurs en DNA) et KOSHER suppose que seules les cellules à potentialité chondrogène survivent dans ces conditions : pourtant, la teneur en DNA des apex complètement dénudés est identique à celle des apex où seule la crête apicale a été excisée. Ces derniers contiennent sous l'ectoderme une proportion non négligeable de cellules conjonctives et sans doute musculaires (KOSHER et al, 1979a, Fig. 8). De cet ensemble de données, une hypothèse peut être formulée : une partie des cellules apicales indifférenciées et des cellules souches des zones périphériques disparaît lorsqu'on dénude les bourgeons, mais une autre partie est très certainement recrutée pour former l'abondant cartilage trouvé dans les explants "Ecto -". L'identification de ces cellules reste hypothétique. Si les cellules somitiques envahissent le bourgeon de membre de souris (HOUBEN, 1976 ; MILAIRE, 1976 ; AGNISH et KOCHHAR, 1977) pour établir la lignée myogène comme cela se passe dans le bourgeon de membre de poulet (revue de BRAND et al, 1985), il est raisonnable de considérer que la partie proximale des explants utilisés dans cette étude est constituée de plusieurs lignées cellulaires tandis que leur partie distale est formée d'une population assez homogène de cellules indifférenciées d'origine somatopleurale comme elle existe dans des bourgeons plus âgés (NEWMAN et al, 1981 ; GAY et KOSHER, 1984). Un recrutement en absence d'ectoderme

implique la transformation de cellules appartenant soit à la lignée myogène, soit à la lignée conjonctive. Dans des conditions expérimentales particulières, des cellules myogènes issues des somites peuvent se transformer en chondroblastes et s'intégrer aux éléments squelettiques (NATHANSON et HAY, 1980 ; KIENY et al, 1981 ; SEARLS et SMITH, 1982 ; SEARLS, 1983). D'autres chercheurs affirment que les cellules d'origine somatopleurale et somitique constituent des lignées distinctes totalement séparées (WACHTLER et al, 1981, 1982). Pourtant, dans le bourgeon de membre de poulet, le mésoderme somatopleural prélevé dans des zones non chondrogènes peut former du cartilage au moins jusqu'au stade 26 (WACHTLER et al, 1981), du mésenchyme interdigital de bourgeons de stade 29 peut former des nodules de cartilage entre les phalanges (HURLE et GANAN, 1986). Bien que les cellules mésodermiques d'origine somatopleurale paraissent plus aptes à se transformer que les cellules d'origine somitique, nous ne pouvons pas exclure totalement des conversions en cellules chondrogènes dans ces 2 catégories cellulaires.

Outre le contrôle quantitatif de la chondrogenèse du mésoderme de bourgeon, nos résultats montrent l'importance de l'ectoderme dans la localisation des éléments squelettiques du membre. Dans les massifs mésodermiques dénudés, nous n'observons aucune organisation spatiale définie du cartilage. Au contraire, en présence d'ectoderme, nous obtenons des éléments cartilagineux axiaux dans les jeunes bourgeons et, dans les apex plus âgés, un autopode comportant plusieurs rayons digitaux. MILAIRE et MULNARD (1984) ont obtenu cette prestation avec des bourgeons entiers un peu plus âgés, lorsque les territoires squelettiques sont déterminés (embryon de 50 somites et plus). Chez des embryons plus jeunes, le milieu employé par ces auteurs selon la technique de LESSMOLLMANN et al (1976) conduit à une "stérilisation" rapide du complexe ecto-mésodermique apical qui limite les performances au niveau de l'autopode comme nous l'avions montré antérieurement (DESBIENS, 1979). L'obtention de prestations distales plus complètes nécessite un apport nutritif accru dans cette zone sensible, la qualité du sérum utilisé s'avère déterminante. La distribution de "centres" de différenciation est perturbée dans les bourgeons et les apex sans ectoderme. Si, comme le propose STOCUM (1984), l'information de position s'inscrit au niveau du cell-coat des cellules, l'utilisation de la trypsine connue pour ses effets perturbateurs sur les surfaces cellulaires (KELLEY, 1975 ; KOHNERT-STAVENHAGEN et ZIMMERMANN, 1980) est peut-être la cause des modifications morphogénétiques observées. Il paraît donc important d'estimer dans quelle mesure l'enzyme affecte notre système expérimental.

### 3) Rôle de l'ectoderme des bourgeons de stade 20

Le vieillissement des bourgeons s'accompagne d'un relâchement du contrôle exercé jusqu'alors par l'ectoderme sur le taux de chondrogenèse et sur la qualité des prestations

squelettiques. Des rayons digitaux cartilagineux se forment dans les deux types d'explants "Ecto +" et "Ecto -". Ces explants possèdent déjà des condensations précartilagineuses au moment du prélèvement et on peut admettre que les populations cellulaires sont déterminées de façon stable puisqu'elles occupent en fin de culture les mêmes territoires dans les apex complets et les apex dénudés. On ne peut cependant exclure un recrutement minimum de cellules périphériques qui expliquerait les quantités légèrement supérieures de GAG synthétisés dans les explants postérieurs "Ecto -" et les fusions observées au niveau de leurs rayons digitaux. A ce stade, si les apex dénudés mettent en place un squelette comparable à celui des apex complets, il subsiste une différence très nette quant à la quantité des cellules mésenchymateuses présentes en fin de culture dans les deux types d'explants. Ce résultat est confirmé par le tout récent travail de MARTIN et LEWIS (1986) où des bourgeons de poulet privés de leur ectoderme dorsal *in vivo* conduisent à des membres où les dérivés conjonctifs et musculaires dorsaux sont pratiquement absents. L'ectoderme pourrait donc continuer à stimuler la prolifération des cellules non chondrogènes sous-jacentes et pourrait être responsable de leur différenciation ultérieure.

En conclusion, la compétence à se différencier en cartilage pourrait être acquise sous l'influence de l'ectoderme au niveau des cellules somatopleurales du territoire de membre (GUMPEL-PINOT, 1972-1973 ; MILAIRE et MULNARD, 1968). Au cours du vieillissement du bourgeon, la détermination des cellules mésodermiques se fixerait progressivement sous le contrôle de l'ectoderme. A partir du stade 20, la différenciation de la partie proximale du squelette autopodial s'effectue en l'absence d'ectoderme. Le programme de formation de cette partie du squelette est alors mis en place.

## II. - INFLUENCE DE L'ECTODERME SUR LES PROTEOGLYCANNES DE LA MATRICE CARTILAGINEUSE

(en collaboration avec Françoise REVILLION-CARETTE)

### A - Introduction

Dans le bourgeon de membre, la différenciation cartilagineuse s'effectue à partir de cellules mésodermiques qui, sous le contrôle de l'ectoderme vont se condenser en des zones bien spécifiques. Cette phase préliminaire semble être liée au dépôt de collagène de type I et de fibronectine dans les espaces intercellulaires (DESSAU et al, 1980). La chondrogenèse proprement dite est caractérisée par la disparition du collagène de type I et son remplacement par le collagène de type II (LINSENMAIER et al, 1973). La fibronectine est progressivement masquée par une quantité importante de protéoglycannes spécifiques (VERTEL et DORFMAN, 1978 ; LEWIS et al, 1978 ; MELNICK et al, 1981 ; SILVER et al, 1981, GLANT et al, 1985). Il a été admis que la taille des protéoglycannes augmente en même temps que leur quantité lors de la maturation cartilagineuse (HASCALL et al, 1976 ; DE LUCA et al, 1977 ; OVADIA et al, 1980 ; KIM et CONRAD, 1982). Toutefois, une molécule de protéoglycane de taille supérieure à celle des composants spécifiques du cartilage vient d'être mise en évidence par KIMATA et al (1986) dans le mésoderme : avant sa différenciation. L'analyse de la taille des protéoglycannes et de leur faculté d'agrégation en complexes multimoléculaires (Pl. VII) constitue donc un bien meilleur indice de différenciation cartilagineuse que ne l'est la mesure d'accumulation de sulfate radioactif dans des glycosaminoglycannes qui ne sont pas tous spécifiques de cette matrice. En conséquence, nous avons cherché à mieux définir dans nos cultures, les macromolécules dans lesquelles le sulfate radioactif est incorporé et si l'ectoderme a une influence sur leur synthèse.

### B - Protocole expérimental

Pour cette étude, nous avons choisi d'utiliser des bourgeons de stade 17 qui incorporent *in vitro* les plus grandes quantités de précurseur radioactif. 2 lots de 50 bourgeons, constitués d'explants intacts ou d'explants dénudés après traitement à la trypsine, ont été mis en culture dans les conditions décrites antérieurement.

Seules, la quantité et l'origine du sulfate radioactif ont été modifiées : du  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  (New England Nuclear, activité spécifique 500 mCi/ml) a été introduit dans le milieu habituel à la concentration de 10  $\mu\text{Ci/ml}$ . Après 3 jours de culture, les protéoglycannes synthétisés par les bourgeons ont été extraits selon la technique préconisée par OVADIA et al (1980). L'extrait a été

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

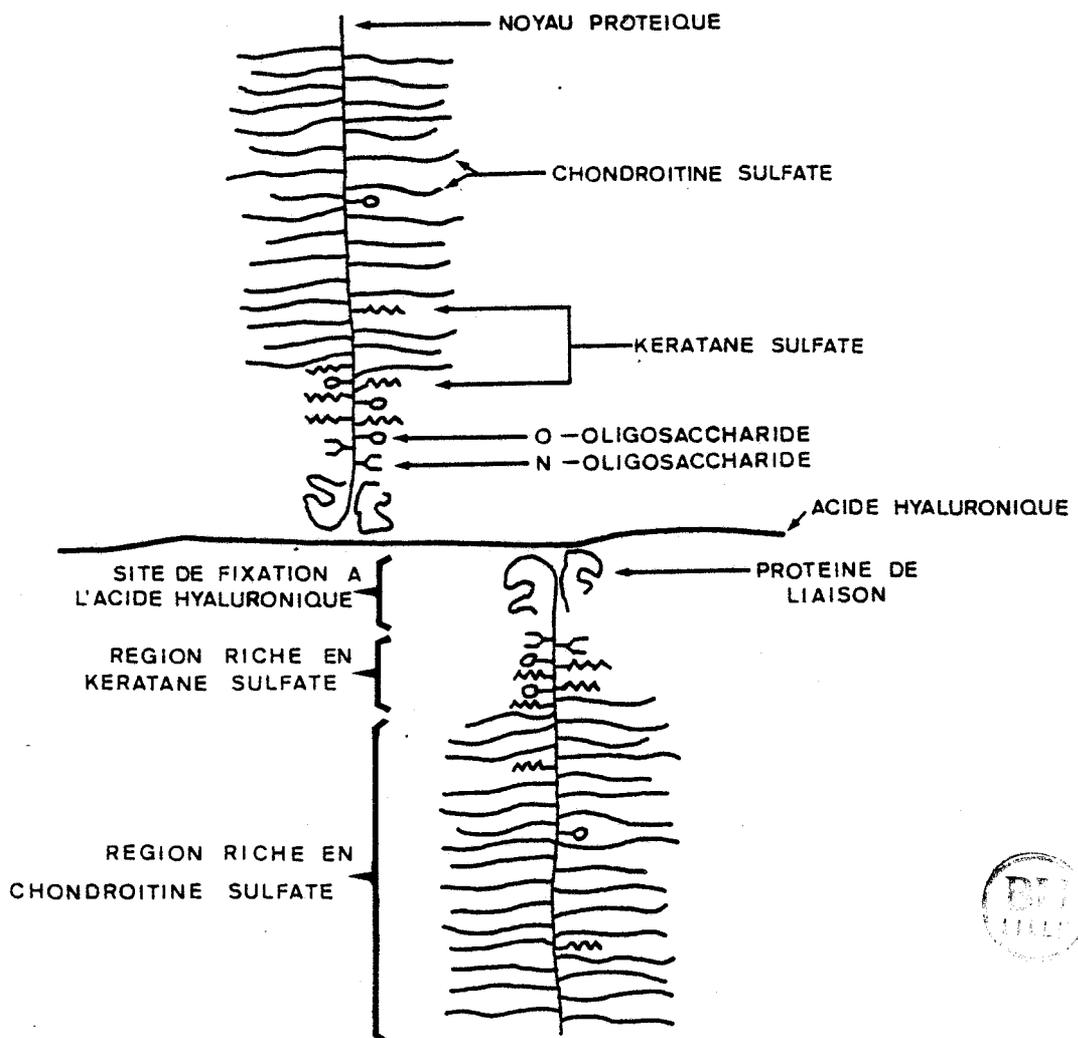
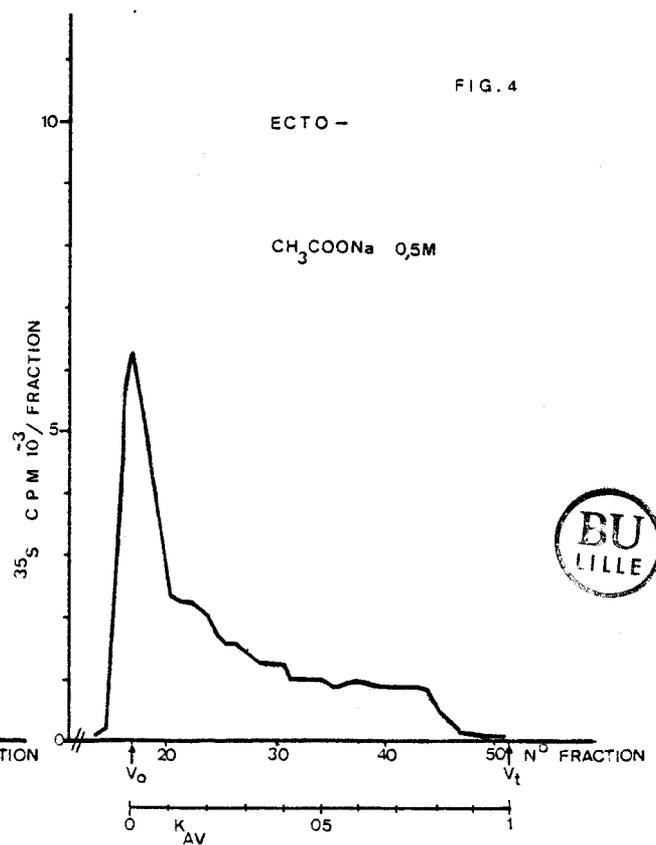
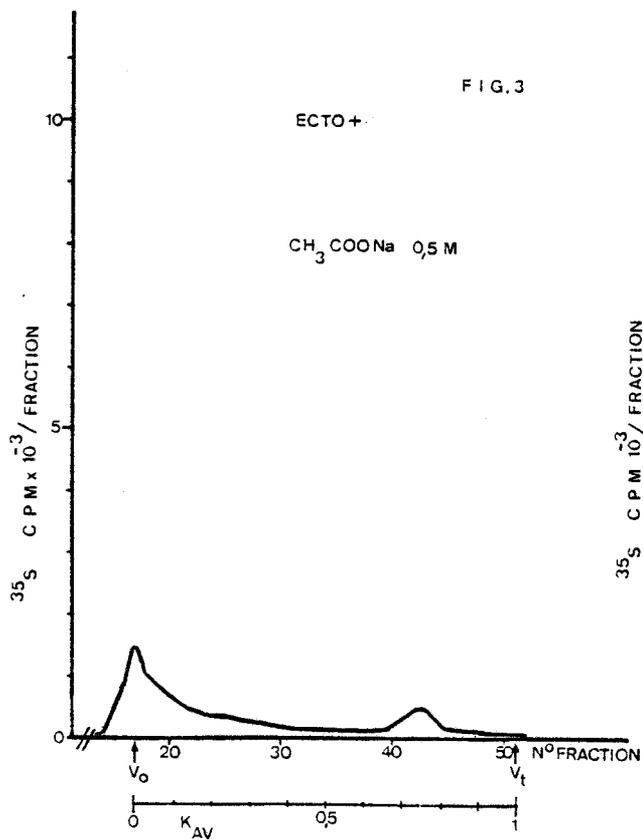
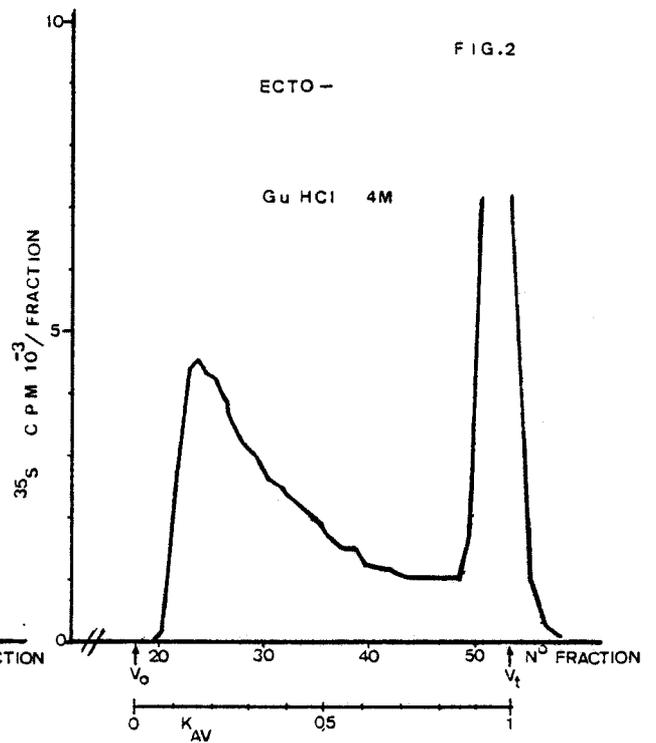
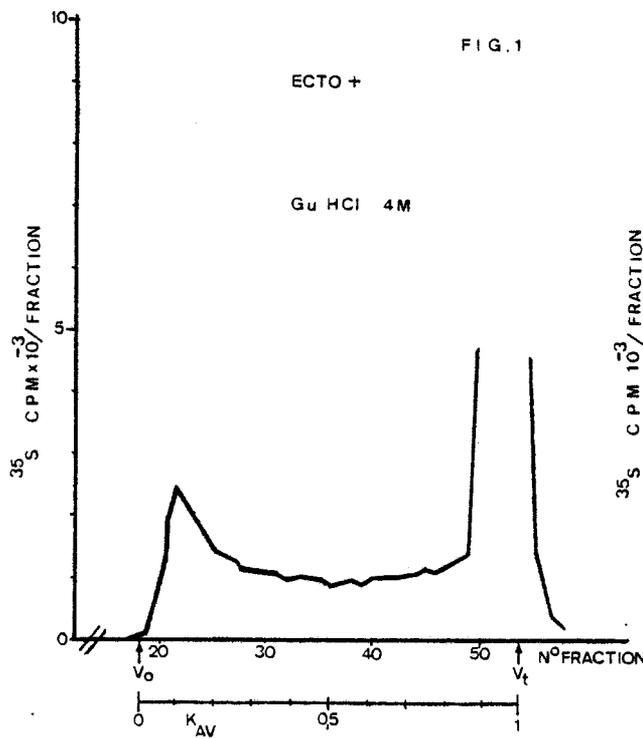


PLANCHE VIII : Profils d'élution des protéoglycannes fractionnés sur Sépharose 2B.

- Conditions dissociantes (Gu HCl 4 M) : Figures 1 et 2.

- Conditions associatives (acétate de sodium 0.5 M) : Figures 3 et 4.



divisé en 2 parties égales, l'une a été maintenue dans le milieu dissociant permettant aux agrégats multimoléculaires de se convertir en simples monomères, l'autre a été soumise à une dialyse favorisant la réassociation des monomères en agrégats. Ces deux fractions ont été analysées par chromatographie sur sépharose CL-2B.

## C - Résultats

### 1) Conditions dissociantes.

Après chromatographie sur sépharose CL-2B en conditions dissociantes, les molécules marquées au  $^{35}\text{S}$  extraites des explants se répartissent en 2 groupes comme en témoignent les 2 pics d'élution observés sur chaque chromatogramme. Le premier groupe est commun aux 2 types de bourgeons ("Ecto +" et "Ecto -") et se caractérise par un  $K_{av}$  de 0,96 (Pl. VIII, Fig. 1 et 2). Le matériel élué dans ce pic est éliminé après dialyse des extraits contre l'acétate de Na 0,5 M dans des membranes laissant passer les molécules dont le poids n'excède pas 3500 daltons et représente le sulfate libre présent dans l'extrait (CARRINO et al, 1983). Le second pic paraît plus spécifique de chaque extrait. Les bourgeons couverts d'ectoderme ("Ecto +") semblent avoir accumulé des molécules hétérogènes avec, cependant, une famille de monomères bien individualisée dont le  $K_{av}$  est de 0,11. Le profil d'élution de l'extrait de bourgeons dénudés ("Ecto -") diffère de celui des bourgeons intacts ("Ecto +") par le fait que le premier pic est légèrement décalé vers un  $K_{av}$  égal à 0,16 (Pl. VIII, Fig. 2). D'autre part, pour un nombre de bourgeons équivalent, la radioactivité liée aux monomères synthétisés et accumulés par les coeurs mésodermiques isolés est plus importante que celle liée aux monomères produits par les bourgeons intacts. Les monomères, bien que plus petits dans les bourgeons "Ecto -", sont donc plus abondants dans ces bourgeons. Les monomères, dont la taille s'inscrit dans les limites communément admises pour ce type de molécule dans le cartilage ( $0 < K_{av} < 0,33$ ), représentent 41% et 53% de la radioactivité incorporée respectivement dans les bourgeons intacts et dénudés (Tableau 8).

TABLEAU 8  
Effet de l'ectoderme sur la taille et la distribution des monomères de protéoglycannes cartilagineux.

	Bourgeons "Ecto +"	Bourgeons "Ecto -"
Kav des plus grands monomères	0,11	0,16
Pourcentage de radioactivité retrouvée dans les monomères caractéristiques du cartilage ( $0 < K_{av} < 0,33$ )	41 %	53 %

## 2) Conditions associatives

Les chromatogrammes obtenus en conditions associatives (Pl. VIII, Fig. 3 et 4), montrent qu'une partie des molécules se réagrège et n'est plus retenue par la colonne. 31% des protéoglycannes marqués isolés des bourgeons intacts sont ainsi exclus du gel de sépharose CL-2B (Tableau 9) et représentent donc les agrégats multi-moléculaires spécifiques de la matrice cartilagineuse. Dans le matériel retenu, une population moléculaire particulière ( $K_{av}$ : 0,75) s'individualise (Pl. VIII, Fig. 3), 17% de la radioactivité totale récupérée sont liés à cette population (Tableau 9). Il pourrait s'agir là des monomères "ubiquistes" normalement synthétisés par des cellules non chondrogènes ou préchondrogènes. Les explants dénudés ("Ecto -") ont incorporé une quantité plus importante de sulfate radioactif. 39% des molécules synthétisées sont exclues de la colonne et représentent donc les agrégats (Pl. VIII, Fig. 4; Tableau 9). Le reste du matériel, retenu dans la colonne, est très hétérogène, les monomères "ubiquistes" ne sont pas élués séparément. Sur ce profil, les molécules dont le  $K_{av}$  est 0,75 ne représentent que 7% de la radioactivité totale de l'extrait (Tableau 9).

TABLEAU 9

Effet de l'ectoderme sur la distribution des agrégats et des monomères "ubiquistes".

	Bourgeons "Ecto +"	Bourgeons "Ecto -"
Pourcentage de radio-activité retrouvée dans les agrégats	31 %	39 %
Pourcentage de radio-activité retrouvée dans les monomères "ubiquistes"	17 %	7 %

## D - Discussion

Dans le sous-chapitre précédent, nous avons montré que l'élimination expérimentale de l'ectoderme pratiquée sur de jeunes bourgeons ou apex entraînait, *in vitro*, une augmentation de la synthèse puis de l'accumulation des glycosaminoglycannes sulfatés. Mais cette méthode d'estimation de l'activité chondrogène dans nos explants n'est pas satisfaisante en raison du caractère ubiquiste des GAG sulfatés dans les systèmes embryonnaires. Nous avons jugé prudent

de confronter les résultats exposés précédemment aux données fournies par une étude plus rigoureuse du métabolisme de la différenciation chondrogène.

Il ressort de cette étude que, dans nos cultures, une grande partie du sulfate radioactif est incorporée au niveau de molécules de taille comparable à celle des monomères de protéoglycannes cartilagineux et que l'absence d'ectoderme est une condition expérimentale favorisant la synthèse de ces molécules et leur association en agrégats multimoléculaires caractéristiques de la matrice cartilagineuse.

Nos analyses en conditions dissociantes tendent à montrer que les monomères sont un peu plus grands dans les explants intacts que dans les explants dénudés avec des Kav respectifs de 0,11 et 0,16. HASCALL et al (1976) et DE LUCA et al (1977) ont décrit une population homogène de protéoglycannes au Kav de 0,24 isolés d'un cartilage différencié à partir de cellules mésodermiques de bourgeons de membres d'oiseaux prélevés aux stades 23-24. Dans ces cultures, on observe des nodules cartilagineux formés de chondrocytes matures qui ressemblent beaucoup à ceux que nous avons décrits dans nos explants dénudés et qui diffèrent sensiblement des chondrocytes hypertrophiés trouvés dans nos explants intacts. Il est possible que les différences mises en évidence dans nos profils d'élution en conditions dissociantes reflètent un état de maturation différent et, en conséquence, un métabolisme différent des populations chondrogènes. ROUGHLEY et DICKSON (1986) ont montré que le cartilage articulaire contient principalement des petits protéoglycannes (Kav : 0,5) alors que du cartilage prélevé dans la zone de croissance en contient de plus grands (Kav : 0,2). Parallèlement, rappelons que MILAIRE (1978) et STOCUM et al (1979) ont mis en évidence une synthèse de sulfate de chondroïtine plus importante dans les chondrocytes matures que dans les chondrocytes hypertrophiés. Dans nos expériences, où le précurseur radioactif est fourni tout au long de la culture, il est difficile de distinguer la part qui revient à la maturation des chondrocytes nouvellement déterminés de la part inhérente au vieillissement de certaines populations chondrogènes mises en place dès le début du séjour *in vitro*. CARRINO et CAPLAN (1985) ont montré chez le poulet, que la taille moyenne des monomères nouvellement synthétisés diminuait dans des épiphyses de tibia *in ovo* entre le jour 11 et le jour 17 (Kav de 0,19 à 0,28). Ces changements biochimiques liés d'une part à la maturation du cartilage et d'autre part à son vieillissement devront être étudiés ultérieurement par des méthodes d'analyse spécifiques des glycosaminoglycannes et des protéines. En effet, la structure des monomères de protéoglycannes évolue sensiblement au cours du temps : des différences ont été observées au niveau de la taille et de la nature des chaînes latérales de glycosaminoglycannes (CARRINO et CAPLAN, 1985 ; MATSUI et al, 1986). KIMATA et al (1986) ont bien montré que le protéoglycane de très grande taille isolé des bourgeons avant la chondrogenèse n'a pas du tout la même structure que les monomères spécifiques du cartilage : le coeur protéique est plus long, les chaînes latérales ne comportent pas de sulfate de kératane mais un nombre non négligeable de

glycosaminoglycannes non sulfatés ainsi que 5% de résidus de dermatane sulfate.

Les profils d'éluion en conditions associatives montrent que le sulfate radioactif incorporé pendant la culture se retrouve en grande partie dans des agrégats multimoléculaires exclus des colonnes. L'élimination de l'ectoderme détermine une incorporation plus importante de  $^{35}\text{S}$  dans ces agrégats, ce qui confirme que l'ectoderme, à ce stade, joue bien un rôle inhibiteur sur la chondrogenèse, la capacité des monomères de s'associer avec l'acide hyaluronique étant considérée comme un critère de différenciation (HASCALL et al, 1976 ; ROYAL et GOETINCK, 1977 ; OVADIA et al, 1980). La production de monomères "ubiquistes" caractérisés par un  $K_{av}$  voisin de 0,75 chute dans les explants dénudés où ces molécules ne représentent plus que 7% du matériel marqué au lieu des 17% dans les explants intacts. Il est tentant de faire un parallèle entre cette chute et la diminution nette du nombre de cellules indifférenciées que nous avons observée dans les bourgeons privés d'ectoderme. Cependant, dans ces mêmes explants "Ecto -", on constate la synthèse importante de molécules de tailles intermédiaires masquant les monomères "ubiquistes" que nous ne pouvons définir que par le  $K_{av}$  de 0,75. Nous ignorons totalement si ces molécules s'apparentent aux monomères "ubiquistes", si elles représentent des monomères incomplets encore incapables de s'agréger ou, au contraire, des agrégats en voie de dégradation, à moins qu'il ne s'agisse d'une catégorie particulière de protéoglycannes dont l'origine reste à définir.

En conclusion, l'augmentation des quantités de monomères de grande taille ainsi que l'augmentation de la proportion des agrégats de protéoglycannes consécutives à l'élimination de l'ectoderme des bourgeons confirment nos premières conclusions sur le rôle inhibiteur de l'ectoderme dans la différenciation cartilagineuse. En conséquence, bien que la mesure des synthèses de protéoglycannes soit le meilleur indice d'expression chondrogène, l'estimation des synthèses de glycosaminoglycannes sulfatés reste un outil intéressant pour étudier la différenciation cartilagineuse lorsque l'on ne dispose que de petites quantités de matériel.

### III. - INFLUENCE DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL SUR LA CHONDROGENESE

#### A - Introduction

Les bourgeons de stade 17 et les apex de bourgeons de stade 19 couverts d'ectoderme, après un allongement important montrent une différenciation mésodermique tout-à-fait nuancée : des ébauches cartilagineuses squelettiques se mettent en place à une certaine distance de l'ectoderme et restent entourées d'un mésenchyme abondant où la prolifération est active. Si l'ectoderme est absent, la différenciation cartilagineuse affecte tout l'explant, les cellules à l'origine du mésenchyme périphérique ont disparu ou se sont engagées dans la voie de la chondrogenèse. Il ne subsisterait rien du patron squelettique établi en principe dès que les cellules sortent de la Progress Zone (SUMMERBELL et al, 1973 ; SUMMERBELL et LEWIS, 1975). En d'autres termes, les populations cellulaires déterminées ou non évoluent vers le phénotype cartilagineux mais on n'observe pas de morphogenèse dans les bourgeons dénudés. L'information de position qui pourrait s'inscrire au niveau du cell-coat des cellules (STOCUM, 1984) et se traduire par l'existence de molécules spécifiques (OHSUGI et IDE, 1986) est perdue. On peut donc se demander si le traitement enzymatique qu'ont subi les bourgeons dénudés n'est pas responsable d'un décapage de surface à l'origine de cette perte de "mémoire" ou tout au moins si ce traitement à la trypsine ne perturbe pas les corrélations entre cellules mésodermiques au point de favoriser leur différenciation en cartilage.

Différentes techniques ont donc été utilisées pour étudier les surfaces cellulaires ou la matrice intercellulaire dans des bourgeons intacts témoins, dans des bourgeons traités à la trypsine et dans des bourgeons traités à l'EDTA agent chélateur d'ions divalents permettant également l'élimination de la calotte ectodermique. De plus, des bourgeons prélevés aux 3 stades déjà étudiés puis dénudés après action de l'EDTA ont été mis en culture dans des conditions analogues à celles utilisées antérieurement. L'examen histologique de ces échantillons a permis de préciser l'influence des techniques opératoires sur le devenir des bourgeons dénudés.

#### B - Protocole expérimental

L'étude des surfaces cellulaires et de la matrice intercellulaire a été réalisée sur des apex de bourgeons antérieurs de stade 19 fixés dès leur prélèvement (témoins "Ecto +") ou juste après

l'action des agents dissociants : trypsine ("Ecto -" TR) et EDTA ("Ecto -" EDTA). La trypsine a été utilisée en solution à 2% pendant 10 mn à 37°C, l'EDTA (25 mM) pendant 2 heures à température ambiante.

Les apex ont été observés en microscopie électronique à transmission, en microscopie photonique à fluorescence après fixation de lectines conjuguées au FITC et après fixation d'anticorps dirigés contre la fibronectine, le collagène de type I et le collagène de type IV révélés par immunofluorescence indirecte.

Les explants dénudés par l'EDTA ont été déposés sur des filtres support et mis en culture selon la technique de TROWELL (1954). Après 3 jours, ils ont été fixés au Bouin et examinés *in toto* après coloration au bleu Alcian (pH1) avant d'être inclus pour une étude histologique.

## **C - Résultats**

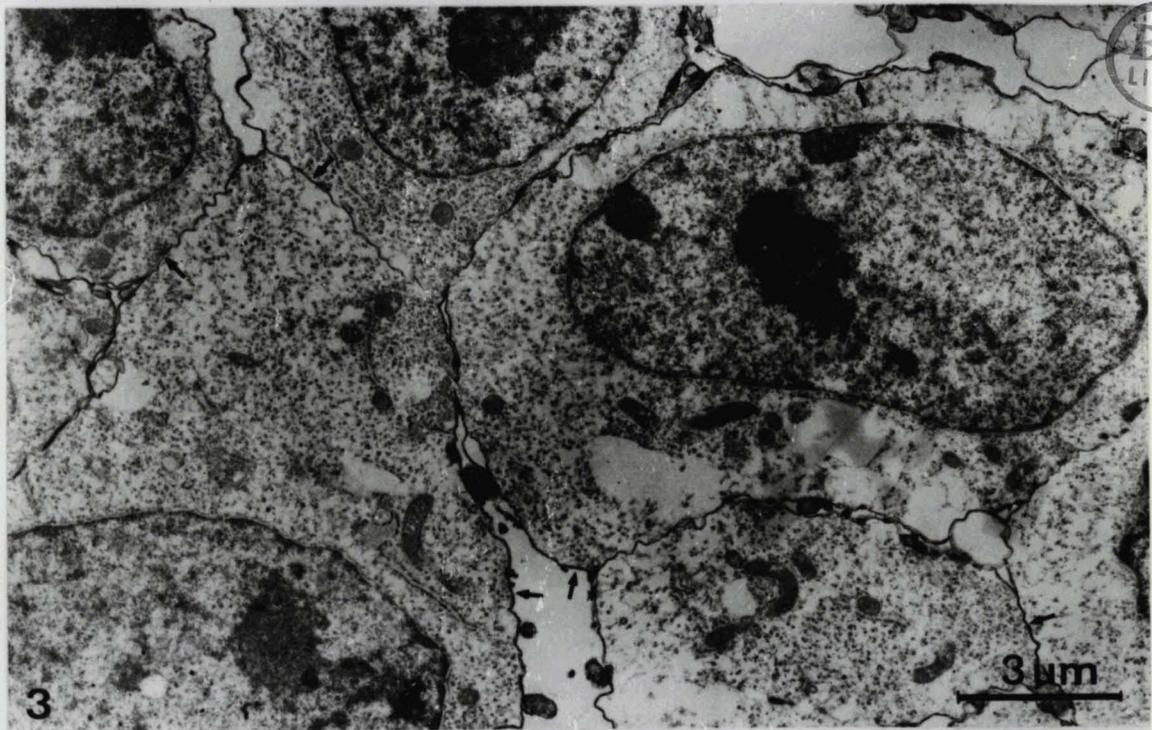
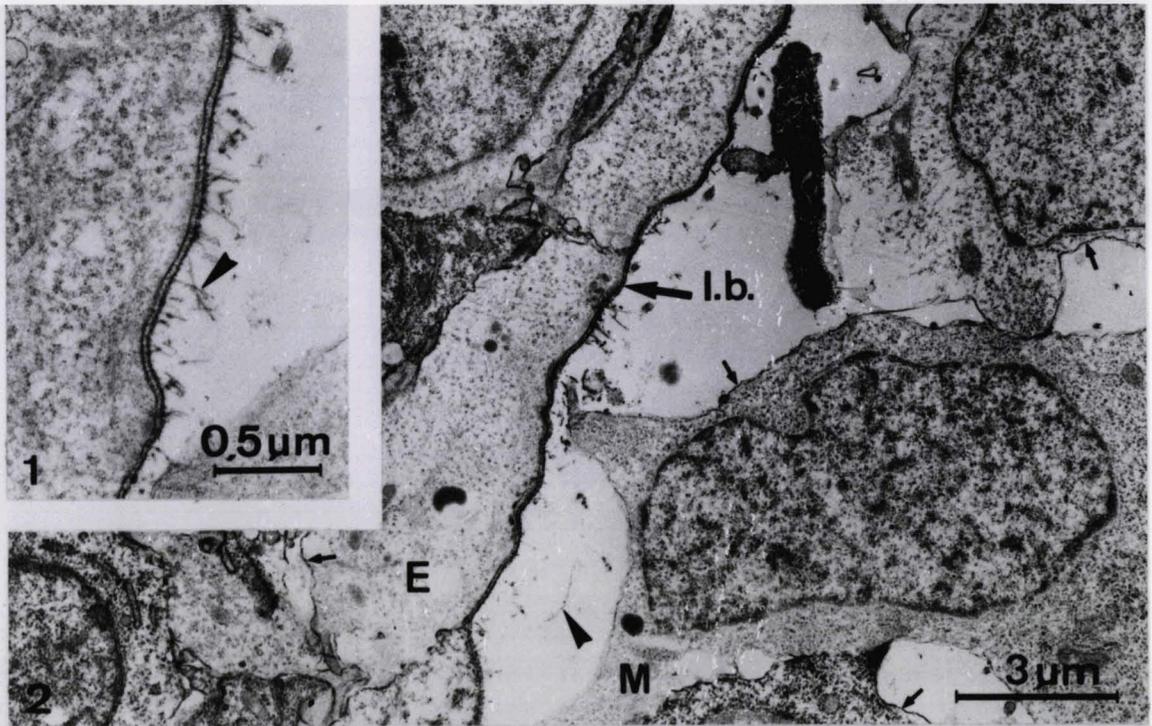
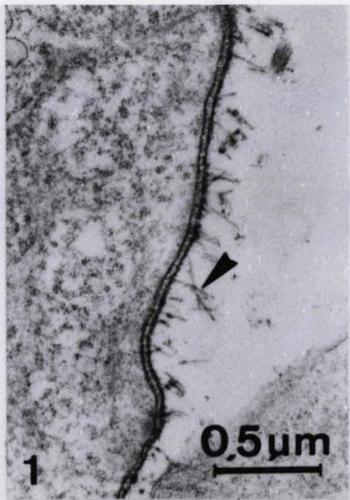
### **1) Contrôles ultrastructuraux**

#### **a) Apex intacts témoins**

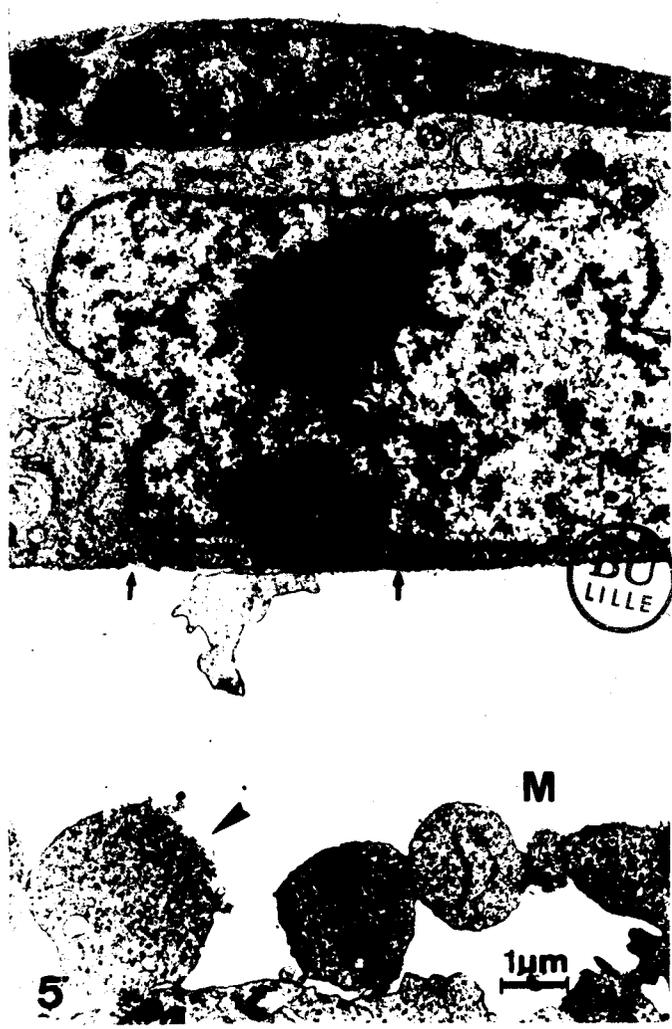
L'interface ecto-mésodermique est caractérisée par la présence d'une lame basale longeant les cellules ectodermiques (Pl. IX, Fig.2). La lame rare contient de très fines granulations (Pl.IX, Fig. 1). Sur la lame dense, épaisse et continue, s'arrime un réseau fibrillaire assez développé à la périphérie du mésoderme (Pl. IX, Fig. 1-2), mais semblant absent de la matrice extracellulaire mésodermique profonde (Pl. IX, Fig. 2-3). Certaines fibres épaisses présentent l'aspect strié du collagène (Pl. X, Fig. 1-2). De nombreux prolongements des cellules mésodermiques côtoient ce réseau, certains d'entre eux prennent contact avec la lame dense sans la traverser (Pl. X, Fig. 4). A l'intérieur des espaces intercellulaires périphériques, on note la présence du matériel précipité par l'acide tannique : il s'agit essentiellement de filaments très fins formant une trame dense réticulée parfois arrimée aux fibres de collagènes ou au prolongement cytoplasmiques (Pl. X, Fig. 4) mais le plus souvent sans lien net avec les autres structures environnantes (Pl. X, Fig. 3). Les contours cellulaires sont nets, le cell-coat particulièrement contrasté. Les cellules mésodermiques, de forme irrégulière, peuvent s'accoler étroitement rendant virtuels certains espaces intercellulaires (Pl. IX, Fig. 3). Au niveau des zones de contact comme en regard des larges espaces intercellulaires, les contours des cellules sont très festonnés (Pl. IX, Fig. 3, Pl. X, Fig. 3-4).

#### **b) Apex après le traitement à la trypsine.**

Après 6 mn de digestion enzymatique, la lame basale commence à s'altérer pour perdre



BU  
LILLE



presque complètement son opacité aux électrons après 9 mn. Des résidus de cette structure restent accrochés au feuillet ectodermique. L'espace entre le mésoderme et l'ectoderme augmente (Pl. X, Fig. 5) mais se vide de la plupart des composants de la matrice. Seules, quelques fibres de collagène sont encore observables (Pl. XI, Fig.1). L'aspect de certaines zones préférentiellement localisées sous la crête apicale reste assez semblable à celui des témoins : cell coat contrasté, contacts étroits entre cellules avec engrènement des membranes cytoplasmiques. Par contre, la partie proximale de l'apex, son mésoderme dorsal et son mésoderme ventral présentent une altération nette des structures décrites : le cell-coat s'est désagrégé (Pl. XI, Fig. 2-3), les cellules mésodermiques bien que polymorphes se sont légèrement séparées les unes des autres. Les espaces intercellulaires observés au niveau de ce que l'on peut supposer être des anciennes zones de contact se sont élargis, les membranes plasmiques qui les délimitent sont linéaires et parallèles (Pl. XI, Fig. 2).

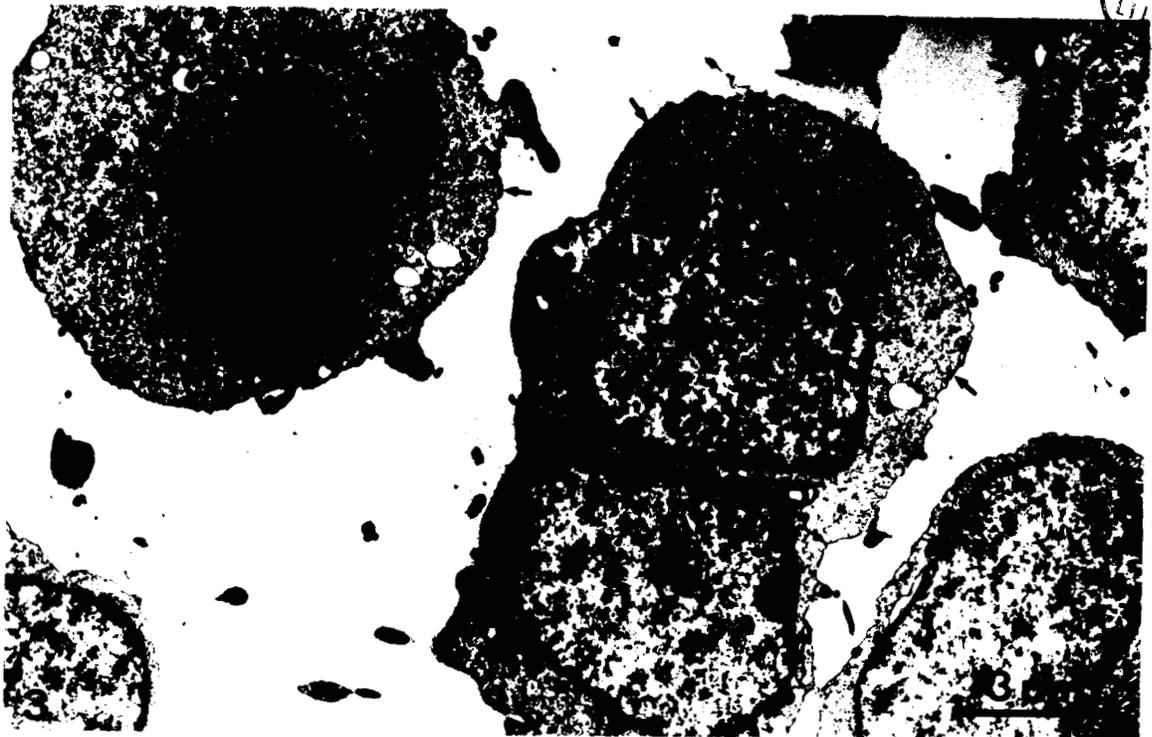
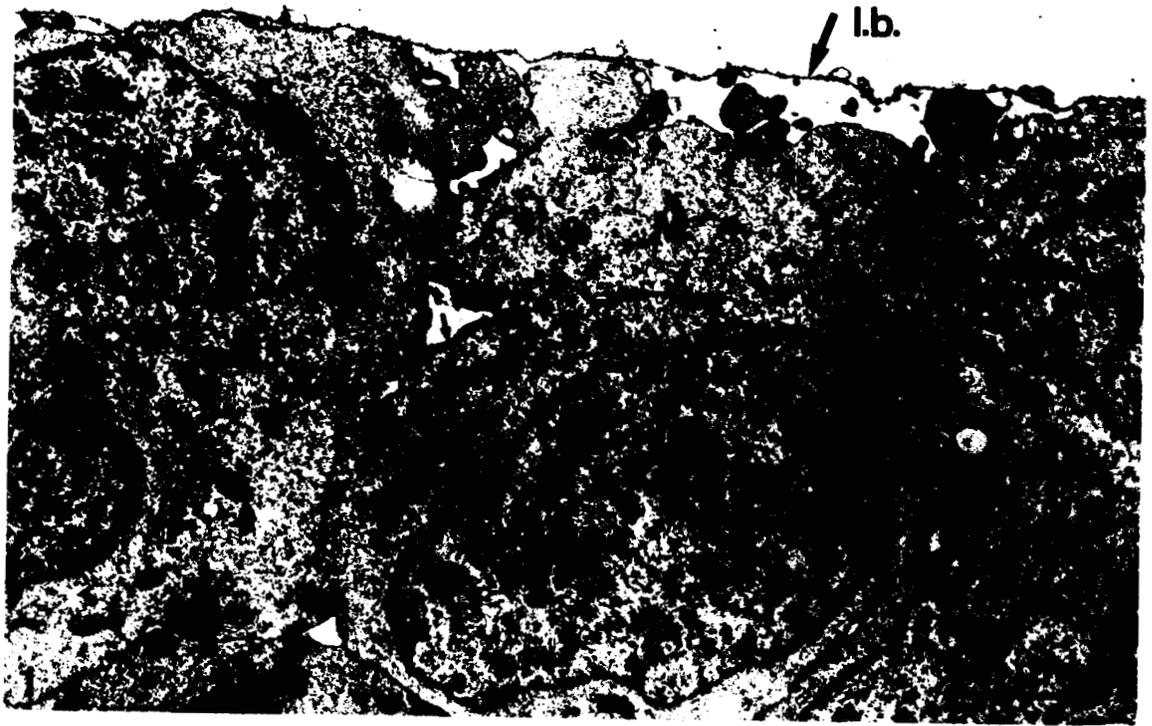
### c) Apex après le traitement à l'EDTA.

Des contrôles optiques effectués durant le traitement nous ont montré que les cellules ectodermiques se dissocient les unes des autres et se soulèvent au-dessus du coeur mésodermique avant d'essaimer sous l'action des pipetages répétés. Quelques lambeaux ectodermiques sont éliminés à l'aide de pinces mais d'autres échappent pendant à l'élimination et contaminent les explants "Ecto -" EDTA.

L'aspect ultrastructural de ces apex est très différent de ce qui a été décrit jusqu'à présent. La composante ectodermique a disparu mais il reste, emballant le coeur mésodermique, une formation rappelant la lame basale (Pl. XII, Fig. 1). Cette structure se présente comme un mince liseré continu sur lequel sont attachées de nombreuses granulations tant du côté externe ectodermique que du côté interne mésodermique (Pl. XII, Fig. 2). Le réseau fibrillaire annexé à la lame basale des témoins a disparu. Le massif mésodermique, quant à lui, comporte 2 zones bien distinctes ; l'une périphérique où les cellules sont étroitement accolées avec une réduction sensible des espaces intercellulaires et parfois une accentuation des engrènements cytoplasmiques (Pl. XII, Fig. 1-2), l'autre interne où les cellules se sont arrondies et isolées les unes des autres. Dans cette région, seules quelques zones de contact localisées persistent. Les très larges espaces apparus entre les cellules sont colonisés par de fins prolongements cytoplasmiques mais aucun composant matriciel n'a pu y être observé (Pl. XII, Fig. 3). Contrairement aux explants trypsinisés, les contours cellulaires sont nets, contrastés, quelles que soient la forme et la place des cellules. Enfin, on observe un nombre important de figures de mitose.

En résumé, les apex témoins se caractérisent par une lame basale nette accolée à l'ectoderme, des composants matriciels fibrillaires et granulaires occupent des espaces intercellulaires





périphériques, un cell-coat toujours contrasté souligne les contours cellulaires. Dans les explants traités par la trypsine, la lame basale est presque entièrement détruite, les cellules mésodermiques commencent à se séparer, le cell-coat et les composants matriciels ne sont plus décelables. Le mésoderme des explants traités par l'EDTA reste entouré d'une lame basale remodelée, la plupart des composants matriciels ont disparu, les relations entre cellules mésodermiques sont fortement perturbées, bien que le cell-coat reste apparemment semblable à celui des témoins.

## 2) Fixation des anticorps dirigés contre les constituants de la matrice intercellulaire (Tableau 10)

### a) Mise en évidence de la fibronectine.

Chez les témoins, une fluorescence uniforme observée à la périphérie des cellules mésodermiques révèle l'existence de la fibronectine dans la matrice intercellulaire du mésoderme indifférencié. La lame basale fixe fortement l'anticorps mais l'ectoderme et plus particulièrement la crête apicale restent négatifs (Pl. XIII, Fig.1).

La fluorescence observée dans les apex traités à la trypsine se localise plus particulièrement dans le mésoderme périphérique où les contours cellulaires semblent mieux marqués que chez les témoins. Aucune fluorescence n'est observée dans les zones de contacts qui peuvent subsister après traitement entre ectoderme et mésoderme (Pl. XIII, Fig. 2).

Après action de l'EDTA, la fluorescence émise par le coeur mésodermique est comparable à celle des témoins mais aucune trace de lame basale ne subsiste (Pl. XIII, Fig. 3).

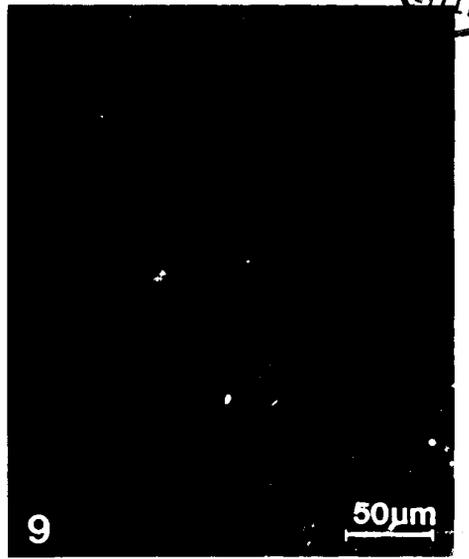
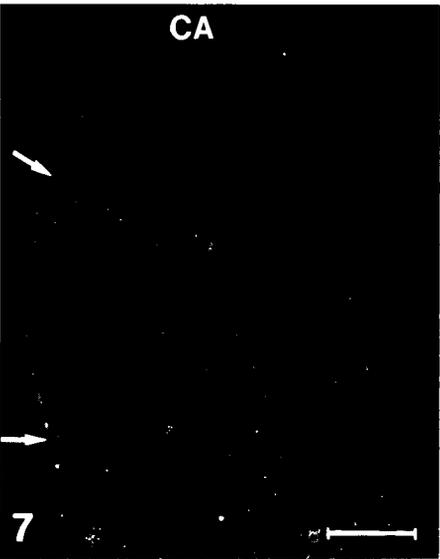
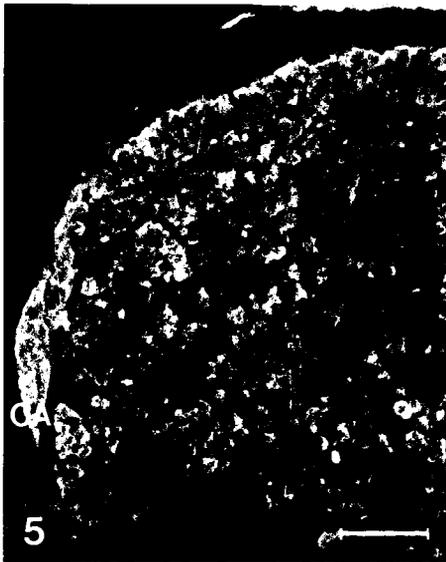
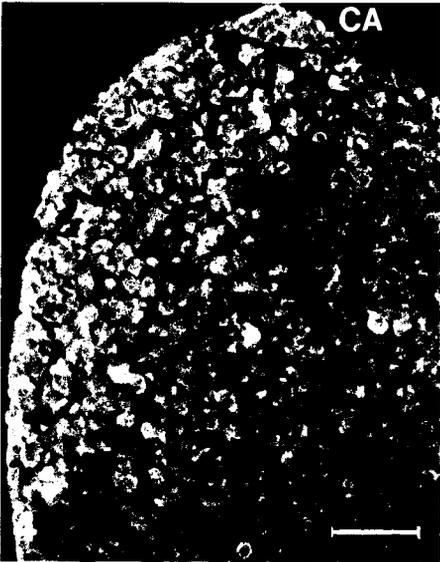
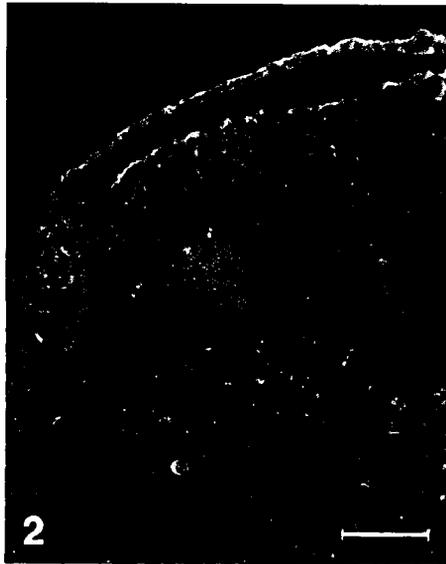
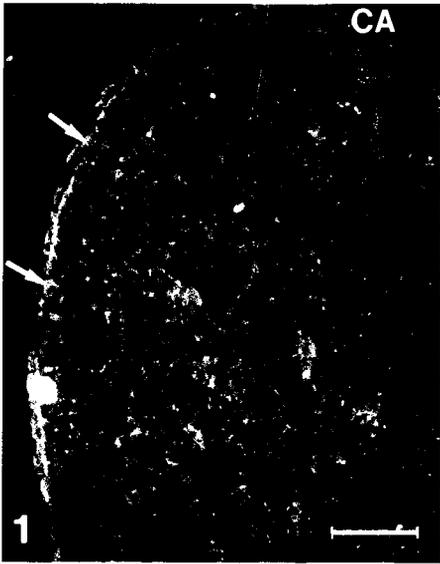
### b) Mise en évidence du collagène de type I.

Chez les témoins, le marquage obtenu avec l'anticorps dirigé contre le collagène de type I se répartit de façon homogène et diffuse dans le mésoderme et l'ectoderme. La lame basale ne fixe pas l'anticorps (Pl. XIII, Fig.4).

Les apex traités à la trypsine montrent une fixation atténuée dans les 2 feuillets (Pl. XIII, Fig.5) tandis que la forme arrondie des cellules mésodermiques ayant séjourné dans l'EDTA est particulièrement rehaussée par la fixation de l'anticorps. Aucune fluorescence n'apparaît en bordure du mésoderme (Pl. XIII, Fig.6).

### c) Mise en évidence du collagène de type IV

Chez les témoins, la fluorescence est importante au niveau de la lame basale mais apparaît



FAU  
LIBRARY

	Témoins "Ecto +"			"Ecto -" TR			"Ecto -" EDTA		
	Ectoderme	Lame basale	Mésoderme	Ectoderme	Lame basale	Mésoderme	Ectoderme	Lame basale	Mésoderme
ConA	+++	+++	+++	+++	-	++++	?	-	+++
PHA	++	+	+	+	-	++	?	-	+
WGA	++++	++++	++++	+++	+	++	?	-	+++
UeA	-	-	-	-	-	-	?	-	++
SBA	-	-	-	-	-	-	?	-	-
PNA	-	-	-	-	-	-	?	-	-
Fibronectine	-	+++	++	-	-	++	?	-	++
Collagène I	++	-	++	-	-	-	?	-	+++
Collagène IV	-	+++	+	-	++	++	?	-	-

TABLEAU 10  
Fixation des lectines et anticorps fluorescents sur les apex de bourgeons de membres témoins ("Ecto +"), traités à la trypsine ("Ecto -" TR) et traités à l'EDTA ("Ecto -" EDTA).

aussi ponctuellement dans la matrice intercellulaire mésodermique. L'ectoderme, pour sa part, ne semble pas receler de sites antigéniques (Pl. XIII, Fig. 7).

La digestion trypsique accentue très légèrement le marquage dans le mésoderme, l'ectoderme reste négatif, la lame basale semble s'être scindée en 2 sous-unités, l'une encore fixée au mésoderme, l'autre intimement accolée à l'ectoderme en cours d'élimination (Pl. XIII, Fig. 8).

Le passage des explants dans l'EDTA semble supprimer l'accès aux sites antigéniques car seule une fluorescence tout à fait résiduelle est observée dans le mésoderme. Aucune réaction n'a pu être mise en évidence à la surface du coeur mésodermique. (Pl. XIII, Fig. 9).

Dans toutes les séries décrites, les contrôles effectués en substituant aux anticorps le tampon phosphate ou un sérum de lapin non immunisé se sont révélés négatifs.

En conclusion, des modifications de l'environnement cellulaire mésodermique sont attribuables aux traitements à la trypsine ou à l'EDTA. Nous avons observé de nouveau des restructurations spécifiques à chaque traitement et il semble bien qu'au moment de la mise en culture, les matrices caractérisant le mésoderme dénudé par la trypsine ou le mésoderme dénudé par l'EDTA soient qualitativement aussi différentes l'une de l'autre qu'elles le sont de la matrice présente dans les apex témoins.

### 3) Fixation des lectines (Tableau 10)

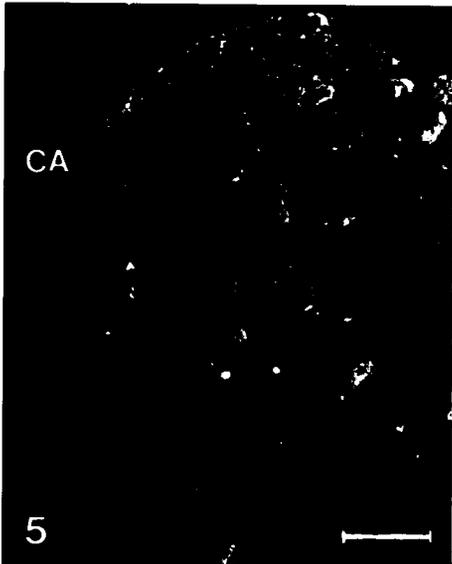
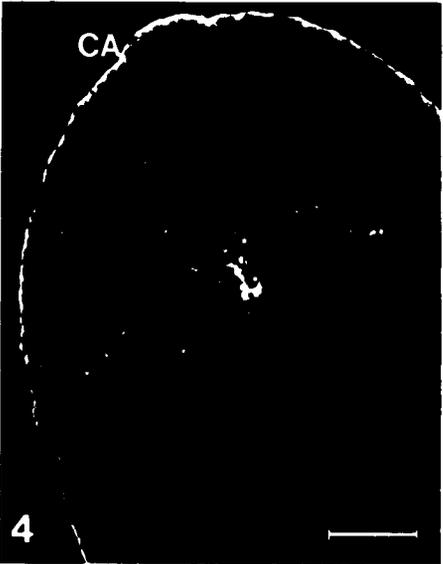
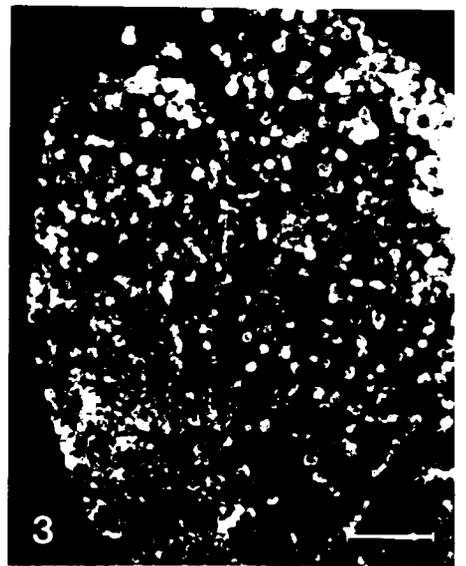
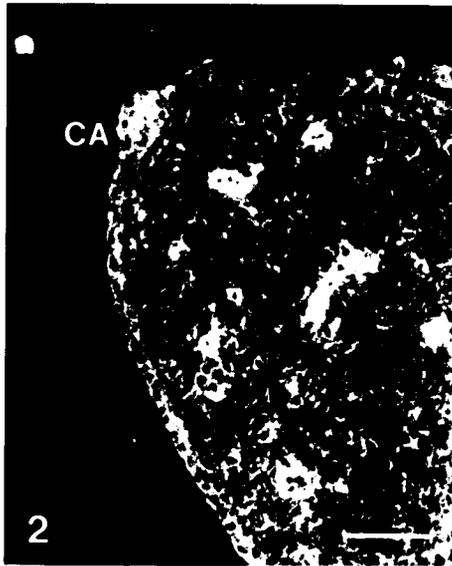
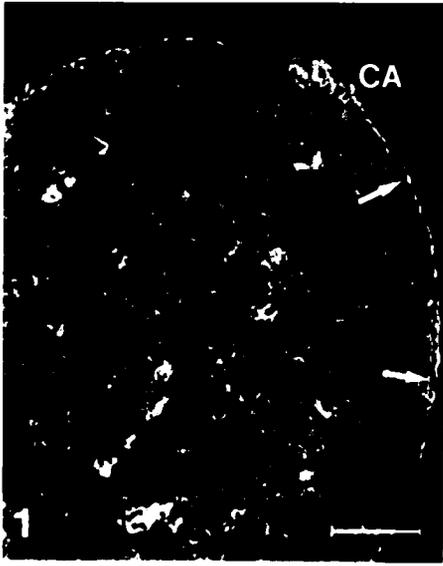
a) Chez les témoins non traités, la ConA se fixe de façon uniforme entre les cellules mésodermiques, à l'interface ecto-mésodermique, entre les cellules ectodermiques de la crête apicale et au niveau du bord externe des cellules ectodermiques (Pl. XIV, Fig. 1). On n'observe pas de zones préférentiellement marquées à l'intérieur du massif mésodermique.

Les apex ayant subi le traitement à la trypsine présentent une réceptivité plus marquée. La fluorescence est beaucoup moins forte au niveau de l'interface ecto-mésodermique lorsque les 2 feuillettes sont encore en contact et disparaît lorsqu'ils sont séparés (Pl. XIV, Fig. 2).

Les explants traités à l'EDTA sont caractérisés par des cellules mésodermiques arrondies qui fixent uniformément la Con A. Aucune trace de fluorescence ne subsiste en périphérie du massif mésodermique, l'ectoderme a disparu lors du traitement (Pl. XIV, Fig. 3).

b) Les apex témoins ne fixent que modérément la PHA. Seule la limite externe du feuillet ectodermique montre une fluorescence nette (Pl. XIV, Fig. 4).

Le liseré externe disparaît presque complètement après action de la trypsine qui, par ailleurs, semble faciliter l'accès et la fixation de la lectine autour des cellules mésodermiques et entre les



PTU  
LITE

cellules ectodermiques (Pl. XIV, Fig. 5).

Par rapport aux témoins, l'EDTA ne semble pas déterminer de modifications dans la fixation de la PHA sur le mésoderme (Pl. XIV, Fig. 6). Aucune fluorescence n'a jamais été observée à la périphérie du mésoderme.

c) Une très forte fixation de la WGA a été obtenue chez les apex témoins tant au niveau du mésoderme que de l'ectoderme. Les contours polygonaux des cellules mésodermiques sont parfaitement soulignés, la lame basale et la surface externe de l'ectoderme montrent une fluorescence forte. Un marquage net est également visible entre les cellules de la crête apicale (Pl. XIV, Fig. 7).

Après traitement à la trypsine, on observe une redistribution très nette de sites récepteurs à la surface des cellules mésodermiques : ces derniers sont regroupés sur des zones réduites de la surface cellulaire. La fluorescence liée à la lame basale disparaît presque complètement tandis que celle liée aux cellules ectodermiques reste inchangée. (Pl. XIV, Fig. 8).

Le mésoderme des apex soumis à l'action de l'EDTA ne présente pas de remaniements aussi importants : les cellules arrondies fixent uniformément la WGA. Comme précédemment, aucune fluorescence n'est détectée autour du massif mésodermique (Pl. XIV, Fig. 9).

d) Seuls, les apex traités par l'EDTA ont montré une fixation discrète de l'UeA à la surface des cellules mésodermiques.

e) Aucune fixation n'a été observée ni avec la SBA, ni avec la PNA quel que soit le type d'explant.

Dans tous les cas décrits, la préincubation de la lectine avec son sucre inhibiteur a entraîné au moins une forte diminution de la fluorescence observée.

En résumé, les traitements infligés aux bourgeons dans le but d'éliminer l'ectoderme ont une influence sur la fixation de certaines lectines à la périphérie cellulaire et par conséquent, doivent avoir une action sur la nature des surfaces réceptrices. Nous retiendrons que de nouveau les réactions obtenues diffèrent en fonction de l'agent dissociant utilisé.

#### 4) Cultures d'apex dénudés par l'EDTA.

##### a) Evolution des bourgeons de stade 17

###### - Etude morphologique

Rappelons que les explants antérieurs témoins observés *in toto*, mettent en place un squelette proximal organisé mais que leur palette autopodiale ne contient aucun élément cartilagineux (Pl. XV, Fig. 1). Les bourgeons postérieurs témoins, quant à eux, différencient des nodules proximaux non identifiables (Pl. XV, Fig. 3). Si l'ectoderme est éliminé après passage dans l'EDTA, la chondrogenèse affecte l'ensemble des explants antérieurs, aucun élément squelettique n'est identifiable (Pl. XV, Fig. 2). La coloration des explants postérieurs "Ecto -" est moins forte mais généralisée (Pl. XV, Fig. 4).

###### - Etude histologique

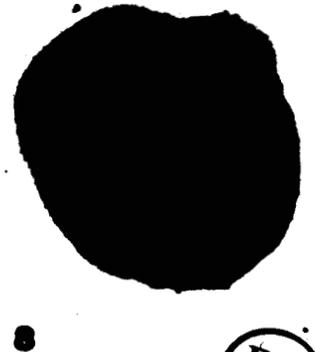
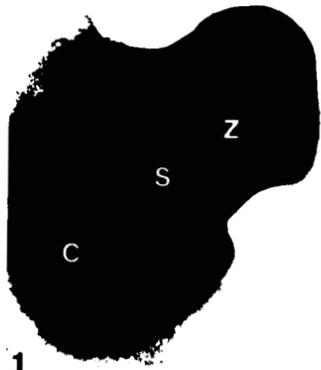
Les bourgeons antérieurs (9 cas) présentent des chondrocytes à matrice épaisse. Leur répartition à l'intérieur des explants semble aléatoire : nodules à contours précis ou plages différenciées étendues aux limites incertaines coexistent. Des cellules mésenchymateuses abondent dans les zones où des lambeaux ectodermiques contaminent les cultures. Le plus souvent, ces fragments d'ectoderme se présentent sous la forme de petites vésicules entourées d'une lame basale et intégrées à l'intérieur du massif mésodermique (Pl. XVI, Fig. 9). Des figures de mitose sont fréquemment observées dans le mésenchyme mais des foyers de dégénérescence affectent aussi certaines cultures.

Les cellules des bourgeons postérieurs dénudés (8 cas) accumulent une matrice moins épaisse que celle de leurs homologues antérieurs. De plus, des zones de dégénérescence importantes ont été observées. La présence de petits contaminants ectodermiques entourés de cellules mésodermiques saines a été détectée dans tous les cas.

##### b) Evolution des apex de stade 19

###### - Etude morphologique

Après 3 jours de culture, les apex antérieurs témoins "Ecto +" comportent un autopode rayonné formé de métacarpiens ainsi que des nodules plus proximaux représentant l'extrémité du zeugopode et les carpiens (Pl. XV, Fig. 5). L'autopode n'est pas différencié dans les apex



BU  
LILLE

50µm

postérieurs qui ne contiennent en général que des éléments squelettiques proximaux (Pl. XV, Fig. 7). En absence d'ectoderme, les apex antérieurs présentent quelques nodules bien délimités mais surtout des zones étendues aux contours imprécis dont le centre est fortement coloré par le bleu Alcian (Pl. XV, Fig. 6). Les nodules sont plus rares dans les explants postérieurs où la coloration s'étend de façon plus uniforme (Pl. XV, Fig. 9).

- Etude histologique

A l'échelle microscopique, les apex antérieurs dénudés (10 cas) paraissent constitués essentiellement de nappes cartilagineuses à la périphérie desquelles la matrice s'estompe progressivement, quelques travées indifférenciées ont persisté souvent en relation avec de petits contaminants ectodermiques. On note aussi la présence de cellules en dégénérescence à la surface des explants. Les apex postérieurs "Ecto -" (9 cas) présentent des caractéristiques identiques bien que les zones de dégénérescence soient plus importantes.

c) Evolution des apex de stade 20

- Etude morphologique

Les apex antérieurs témoins de stade 20, après 3 jours de culture, ont mis en place un autopode formé des métacarpiens et d'une première rangée de phalanges (Pl. XV, Fig. 9). Les apex postérieurs sont dépourvus de phalanges mais la disposition rayonnée des métatarsiens est très nette (Pl. XV, Fig. 11). Privés de leur ectoderme par l'EDTA, les explants antérieurs élaborent les mêmes structures autopodiales que les témoins. On note cependant une altération de la forme des éléments squelettiques qui paraissent raccourcis et élargis (Pl. XV, Fig. 10). Dans les apex postérieurs "Ecto -", une disposition rayonnée des nodules différenciés est perceptible, mais de nombreuses fusions surviennent entre ces éléments cartilagineux et des nodules surnuméraires apparaissent (Pl. XV, Fig. 12).

- Etude histologique

Les rayons digitaux observés dans les préparations *in toto* d'apex "Ecto -" antérieurs (8 cas) sont constitués de cartilage hypertrophique dans la moitié proximale des explants et sont séparés les uns des autres par un abondant mésenchyme (Pl. XV, Fig. 15). Très peu de contaminants ectodermiques ont été mis en évidence, de même la fréquence et l'étendue des zones de dégénérescence ont fortement diminué dans ce type d'explant. Les explants postérieurs dénudés (8

cas) apparaissent le plus souvent constitués de nodules à cartilage hypertrophique pouvant représenter les rayons digitaux, mais qui sont affectés de déformations importantes. Des fusions sont parfois observées qui conduisent à la constitution de nappes étendues de cartilage. Des travées de cellules indifférenciées séparent les nodules. De rares contaminants ectodermiques ont été observés.

En résumé, l'évolution des cultures de bourgeons et apex dénudés par l'EDTA est très comparable à l'évolution de cultures d'explants dont l'ectoderme a été éliminé par la trypsine : dans les 2 cas, les coeurs mésodermiques de stades 17 et 19 s'engagent dans une chondrogenèse anarchique, les massifs mésodermiques de stade 20 mettent en place un autopode rayonné parfaitement organisé au moins dans les apex antérieurs.

#### **D - Discussion**

Les techniques que nous avons utilisées pour éliminer l'ectoderme des bourgeons ont une incidence sur la forme des cellules mésodermiques et leur environnement immédiat.

Nos contrôles ultrastructuraux sont en parfait accord avec le travail de KOHNERT-STAVENHAGEN et ZIMMERMANN (1980). Ces auteurs ont observé un détachement complet du cell-coat des cellules après un traitement à la trypsine beaucoup moins drastique que le nôtre (0,2%, 37°C, 20 min) et un maintien de ce même cell-coat après un traitement à l'EGTA (2mM). Le contraste renforcé que l'acide tannique permet d'obtenir semble dû aux abondants protéoglycannes et glycosaminoglycannes liés aux glycoprotéines du cell-coat, les agents chélateurs sont sans effet sur les liaisons qui unissent ces molécules entre elles et aux surfaces membranaires (VOGEL et DOLDE, 1979). De même, KELLEY (1975) a signalé une grande sensibilité du cell-coat à la hyaluronidase testiculaire, à la pronase et à la trypsine tandis que la neuraminidase et l'EDTA sont sans effets. De plus, cet auteur a décrit la lame basale et la matrice qui lui est spécifiquement associée en précisant la richesse de ces structures en acide hyaluronique, chondroïtine, sulfate de chondroïtine et collagène. SINGLEY et SOLURSH (1981) ont confirmé l'abondance de l'acide hyaluronique à la périphérie du bourgeon. Nos apex témoins présentent l'ensemble des caractéristiques structurales décrites par ces auteurs. Le résultat de nos traitements met en évidence la complexité de l'organisation moléculaire de l'interface ecto-mésodermique (voir la revue de SANDERS, 1983). La lame basale et plus encore la matrice qui lui est associée sont très sensibles aux 2 protocoles utilisés pour dénuder les bourgeons mais les techniques ultrastructurales que nous avons employées ne permettent pas l'identification des constituants qui résistent ou inversement qui sont dégradés par la trypsine ou l'EDTA.

Les marquages avec des anticorps dirigés contre la fibronectine ou les collagènes de type I et IV apportent un peu plus de précisions. Ces marquages semblent montrer une bonne résistance du collagène de type IV à la trypsine. A l'opposé, la fibronectine de la lame basale paraît très sensible à l'enzyme. Le collagène de type I qui, chez la souris, se localise comme la fibronectine dans le mésoderme et la lame basale (SILVER et al 1981), et qui est aussi présent à l'interface ecto-mésodermique chez le poulet (VON DER MARK et al, 1976 ; DESSAU et al, 1980) n'est pas détecté de façon satisfaisante dans notre système même chez les témoins sans que nous ayons d'explication valable à avancer. Il est possible qu'un manque de spécificité de l'anticorps utilisé soit à l'origine de ce résultat peu conforme. La structure résiduelle qui se substitue à la lame basale lorsqu'on observe des apex traités à l'EDTA en microscopie électronique ne semble contenir ni collagène, ni fibronectine à moins que, trop fragilisée, elle ne résiste pas aux techniques de fixation et inclusion que nous avons employées. En effet, dans un système expérimental différent (le germe dentaire), LESOT et al (1981) ont montré que le collagène de type I abondant dans le mésoderme et à la jonction épithélio-mésenchymateuse disparaît totalement après un traitement tryptique mais persiste à la surface du mésoderme après action de l'EDTA. La fibronectine paraît éliminée complètement des germes tryptinés mais reste abondante à la périphérie du mésoderme de papille dentaire isolé par l'EDTA. Le collagène de type IV est détecté sur les faces ectodermiques et mésodermiques des germes tryptinés ainsi qu'à la surface du mésoderme des germes soumis à l'EDTA. Il y a donc une discordance nette entre les marquages obtenus après action de l'EDTA dans ce modèle expérimental et les marquages que nous avons obtenus. Peut-être faut-il chercher une explication dans le protocole expérimental utilisé : LESOT et al ont pu obtenir les séparations souhaitées en utilisant une incubation de 5 min dans l'EDTA 10 mM. Les germes dentaires sont prélevés chez des embryons de 18 jours, des travaux en cours au laboratoire semblent montrer que des feuillets plus âgés se séparent plus facilement. Les marquages obtenus au niveau de l'interface ecto-mésodermique après tryptinisation sont en accord avec les travaux réalisés par LESOT et al (1981) et par BARD et SENDEL (1984) sur d'autres modèles expérimentaux.

De nombreux travaux soulignent l'importance de la lame basale dans les interactions ecto-mésodermiques des systèmes embryonnaires (MILAIRE et MULNARD, 1968 ; THESLEFF et al, 1978 ; GUMPEL-PINOT, 1981 ; TOOLE, 1981). En général, les auteurs s'accordent pour attribuer sa fabrication à l'ectoderme (HAY et DODSON, 1973 ; BANERJEE et al, 1977 ; OSMAN et RUCH, 1980 ; GUMPEL-PINOT, 1981 ; BARD et SENDEL, 1984), tandis que le matériel extracellulaire fibrillaire et granulaire serait en grande partie d'origine mésodermique (GUMPEL-PINOT, 1981). Nos explants mésodermiques dénudés sont donc incapables d'assurer la synthèse et l'association des constituants principaux de la lame basale. De plus, dans le cas où des fragments de lame basale subsistent sous l'épiderme après dissociation tryptique, on assiste à une élimination des résidus dans les 4 h qui suivent le traitement (BARD et SENDEL 1984). Cette

observation donne une idée de la capacité de "survie" de la lame basale *in vitro* : nos explants dénudés par l'EDTA ne doivent pas être emballés bien longtemps par la structure observée en microscopie électronique et doivent rapidement présenter un aspect comparable à celui des explants trypsinisés, ce qui pourrait expliquer leur devenir commun. Il serait intéressant d'analyser le comportement de ces massifs mésodermiques sur des substrats artificiels contenant tout ou partie des composants de la lame basale.

Le maintien d'une matrice riche en fibronectine au niveau du mésoderme trypsinisé ou soumis à l'EDTA et la disparition, dans ces deux types d'explants, des trames réticulées pouvant représenter l'acide hyaluronique (SINGLEY et SOLURSH, 1980) sont des événements compatibles avec la chondrogenèse importante qui survient dans les apex dénudés. En absence d'acide hyaluronique, la fibronectine pourrait faciliter la condensation cellulaire qui précède la différenciation cartilagineuse (NEWMAN et FRISCH, 1979 ; DESSAU et al, 1980 ; MELNICK et al, 1981 ; SILVER et al, 1981 ; TOMASEK et al, 1982). En culture cellulaire, le mésoderme de bourgeon de membre de poulet (st. 23-24) réagit différemment à l'addition de fibronectine exogène dans le milieu (SWALLA et SOLURSH, 1984). Les cellules les plus distales, physiologiquement plus jeunes, présentent une chondrogenèse importante en présence de fibronectine. Inversement, les cellules proximales plus avancées dans leur évolution s'engagent d'autant moins dans la différenciation cartilagineuse que l'apport de fibronectine exogène est important. Nos apex jeunes constitués par des cellules immatures ont donc un comportement conforme à cette observation.

Les marquages des apex témoins par lectines fluorescentes sont en accord avec les observations de ZIMMERMANN et THIES (1984) et de ZIMMERMANN (1986). Les modifications déterminées par les traitements traduisent des restructurations de surface mais ces dernières ne paraissent pas liées directement à l'induction de la différenciation ; en effet, ZIMMERMANN et THIES ont suivi l'évolution des marquages au cours de la morphogenèse de bourgeons de souris et ont pu comparer la fixation des lectines au niveau du mésoderme puis au niveau des blastèmes préchondrogènes. Si la fixation de la PHA et de la WGA augmente légèrement à la surface des cellules en phase de condensation, la PNA et la RCA (que nous n'avons pas testée) se présentent comme des marqueurs spécifiques de l'agrégation cellulaire : se fixant très mal sur les cellules indifférenciées, la PNA et la RCA trouvent des récepteurs (galactose et dérivés) en abondance dans les blastèmes préchondrogènes. En aucun cas, nos traitements n'ont révélé ces récepteurs caractéristiques annonçant l'engagement dans la voie de la différenciation. Néanmoins, rien ne prouve qu'ils ne se révèlent rapidement après la mise en culture, mais dans ce cas, leur apparition ne peut être attribuée spécifiquement aux traitements que nous avons employés. Rappelons que SHUR et al (1982) ont montré une intense activité galactosyltransférase au niveau des surfaces cellulaires de mésoderme de poulet dénudé dès les premières heures de culture. Ces

enzymes pourraient assurer la glycosylation d'oligosaccharides accepteurs sur les surfaces cellulaires adjacentes, renforçant ainsi le phénomène d'agrégation. Chez le poulet, MATSUTANI et YAMAGATA (1982) ont isolé une lectine endogène spécifique du galactose, capable de stimuler la chondrogenèse. L'ensemble de ces travaux met donc en évidence l'importance de certains sucres à la surface des cellules en voie de différenciation.

Quoi qu'il en soit, les perturbations propres à chaque traitement ne semblent pas avoir de conséquences sur le devenir des cultures : un bourgeon jeune qu'il soit dénudé par la trypsine ou l'EDTA est incapable d'élaborer un squelette cartilagineux organisé, mais produit des nappes étendues de cartilage ; un bourgeon âgé peut exprimer une certaine capacité morphogénétique en l'absence d'ectoderme. En dépit des altérations spécifiques observées après chaque type de traitement, les prestations fournies par les bourgeons dénudés se ressemblent beaucoup, il est donc probable que les cellules mésodermiques réparent les surfaces cellulaires altérées et compensent les détériorations de la matrice. Mais les "facteurs" ectodermiques (qui restent à définir) sont absents et on assiste à l'expression généralisée d'un phénotype neutre, en l'occurrence le phénotype cartilagineux pour le bourgeon du membre.

#### IV. - SPECIFICITE DE L'EFFET DE L'ECTODERME DE MEMBRE

##### A - Introduction

Les chapitres précédents mettent en évidence le rôle indispensable que joue l'ectoderme du jeune bourgeon pour inhiber la chondrogenèse anarchique du mésoderme et planifier l'organogenèse squelettique dans le membre. Il a été suggéré que la couverture ectodermique, en glissant vers l'apex du bourgeon, facilitait de façon purement mécanique la croissance de l'ébauche (AMPRINO et CAMOSSO, 1958 ; AMPRINO et AMBROSI, 1973 ; KIENY et PAUTOU, 1976). Dans ces conditions, certaines enveloppes épithéliales pourvu qu'elles protègent le mésoderme devraient permettre, sinon une croissance nette, du moins le maintien de l'état indifférencié dans des massifs mésodermiques. Nous avons voulu vérifier cette hypothèse en emballant des explants dénudés dans des feuilletts épithéliaux embryonnaires. Des surfaces importantes étant nécessaires, nous avons eu recours à des fragments de la paroi amniotique résultant de l'association intime entre mésoderme somatopleural et ectoderme extraembryonnaires ainsi qu'à des fragments de la paroi du lécithocoele, très développé chez les rongeurs, formés pour leur part d'endoderme viscéral et de mésoderme extraembryonnaire.

Dans un second temps, à la suite de la découverte de lambeaux ectodermiques au coeur des explants soumis à l'EDTA mais incomplètement dénudés, et au vu des relations particulières qui s'instaurent dans ces cas entre "contaminants" et "contaminés", il nous a paru intéressant d'introduire des fragments d'ectoderme de membre ou des fragments d'ectoderme dorsal à l'intérieur de massifs mésodermiques isolés.

##### B - Protocole expérimental.

Les explants mésodermiques (apex antérieurs ou postérieurs de stade 19) sont obtenus par l'élimination de l'ectoderme après digestion enzymatique (Trypsine 2%, 10 mn, 37°C). Les fragments épithéliaux sont prélevés sur les annexes embryonnaires pendant la phase préliminaire de dissection des embryons, les lambeaux d'ectoderme de membre comportant la crête apicale et les lambeaux d'ectoderme dorsal que nous avons greffés proviennent d'embryons d'âge équivalent et sont obtenus par séparation mécanique après action de la trypsine.

L'emballage des coeurs mésodermiques est réalisé dans du milieu de culture (MEM + 10% de sérum de veau foetal) où on laisse cicatriser les explants pendant au moins 30 mn à température ambiante. De même, l'insertion des fragments ectodermiques au coeur du mésoderme est réalisé avec un microscalpel et des pinces fines dans le milieu de culture. Après cicatrisation, les apex sont

transférés avec précaution sur les filtres support. La culture est arrêtée après 3 jours, les explants sont fixés et traités pour des études morphologique et histologique.

## **C - Résultats**

### **1) Protection épithéliale**

9 apex antérieurs et 5 postérieurs enveloppés dans le feuillet amniotique ont pu être exploités. Le mésoderme intégré plus ou moins intimement à la paroi mésenchymateuse des enveloppes forme des nodules cartilagineux, de taille très variable, entourés d'une couche étroite de cellules non différenciées. En aucun cas cependant, on n'a pu reconnaître des rayons autopodiaux typiques (Pl. XVI, Fig. 1).

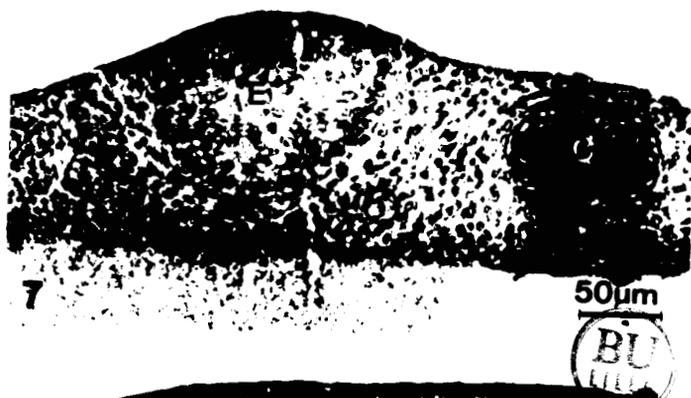
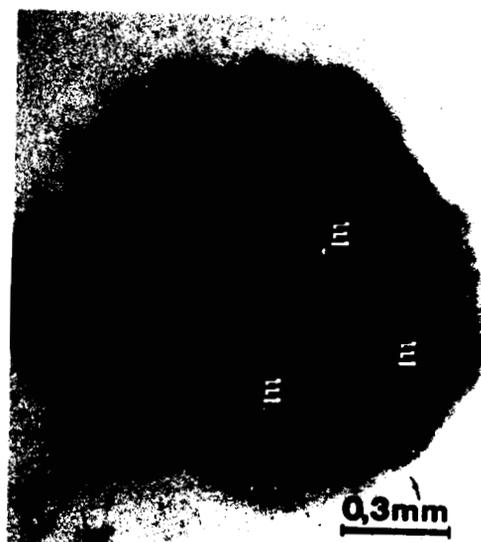
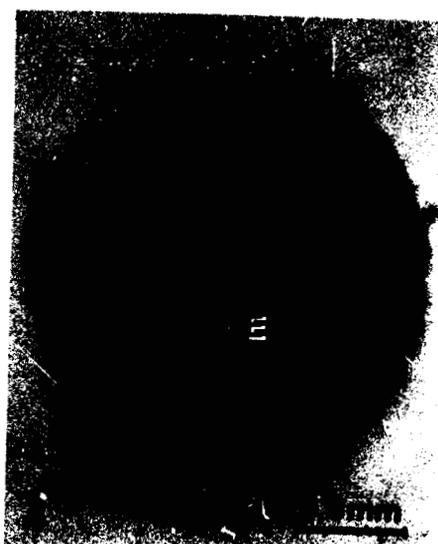
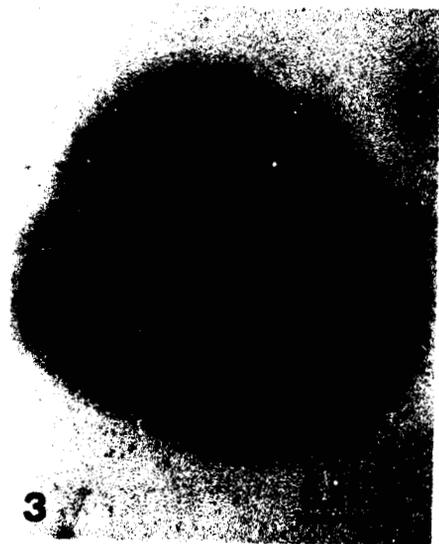
Dans le cas des emballages dans la paroi du lécithocoele (10 antérieurs et 11 postérieurs), l'enveloppe est beaucoup plus épaisse et comprend une couche externe endodermique formée de grosses cellules cuboïdales tapissées d'un tissu lâche assurant le contact avec le mésoderme de bourgeon. Cette association ne modifie en rien le devenir du massif mésodermique : on y observe une chondrogenèse très importante sans qu'il soit possible de reconnaître un quelconque élément squelettique (Pl. XVI, Fig. 2). Une mince couche de cellules indifférenciées persiste à la périphérie des nodules cartilagineux. Sur les 21 associations étudiées, une seule met en contact total le mésoderme du membre et le revêtement endodermique de l'emballage, cet explant se compose d'un petit nodule cartilagineux situé à l'extrémité d'un énorme massif de cellules en dégénérescence.

Quel que soit le type d'emballage, des contacts ponctuels existent entre le massif mésodermique et les cellules des feuillets protecteurs ; ces contacts ne semblent pas avoir d'effet sur la différenciation.

### **2) Implantation de lambeaux d'ectoderme de membre ou d'ectoderme dorsal**

#### **a) étude morphologique**

L'étude de quelques montages *in toto* montre que les greffons ont formé de petites vésicules apparemment sphériques autour desquelles aucune différenciation chondrogène ne survient (Pl. XVI, Figs. 3,4,5). Une zone qui ne fixe pas le bleu Alcian s'établit régulièrement à la périphérie des greffons et aucun nodule cartilagineux n'a jamais été vu à l'intérieur de cette surface.



## b) étude histologique

L'étude histologique a été menée sur 2 séries distinctes : la première où l'on a pratiqué les greffes évoquées antérieurement sur des apex postérieurs dénudés de stade 19, la seconde résultant de contaminations ectodermiques après traitement à l'EDTA d'apex antérieurs de stade 17.

## - greffes d'ectoderme dorsal

Les nodules cartilagineux à contours nets contenant des chondrocytes hypertrophiés sont observés dans le voisinage de vésicules ectodermiques bien délimitées par une lame basale mais un abondant mésenchyme isole toujours les greffons des nodules (Pl. XVI, Figs. 6,7). Les mesures effectuées situent le cartilage en moyenne à 90  $\mu\text{m}$  de la lame basale (Tableau 11), la taille du greffon ne semblant pas influencer sur cette distance.

## - greffes d'ectoderme de membre

L'aspect des coupes histologiques réalisées à partir de ce type d'association est différent dans la mesure où les nodules cartilagineux franchement délimités sont absents des préparations. D'autre part, le cartilage n'atteint pas l'état de maturation décrit précédemment (Pl. XVI, Fig. 8). L'ectoderme est retrouvé sous forme de vésicules, en général de petite taille, intégrées aux massifs mésodermiques. Dans d'autres cas, le greffon reste superficiel et s'étale sur le mésenchyme. Une lame basale bien définie sépare toujours les 2 constituants de l'association. Des mitoses sont régulièrement observées dans le mésenchyme situé à proximité des greffons. Les mesures de la distance qui sépare la lame basale ectodermique des zones où la matrice cartilagineuse commence à s'accumuler entre les cellules mésodermiques sont assez homogènes : on ne trouve pas de cartilage à moins de 70  $\mu\text{m}$  des greffons (Tableau 11).

TABLEAU 11 : Limites de l'effet ectodermique inhibiteur de la chondrogenèse

	Distance lame basale -cartilage en $\mu\text{m}$	Nombre de mesures
Implants d'ectoderme dorsal	90 $\pm$ 37	5
Implants d'ectoderme de membre	71 $\pm$ 10	8
Contamination d'explants "Ecto-" EDTA par des lambeaux d'ectoderme de membre	120 $\pm$ 74	7

- contaminations ectodermiques

L'aspect offert par ce type de culture est comparable à celui décrit dans le cas des greffes expérimentales. Chaque inclusion ectodermique limitée par une lame basale est entourée de mésenchyme lâche (Pl. XVI, Fig. 9). A mesure que l'on s'éloigne du contaminant ectodermique, la densité du mésoderme augmente tandis que la matrice se dépose de plus en plus abondamment. Il existe cependant une très grande hétérogénéité dans les mesures effectuées sur cette série : le cartilage le plus proche se différencie dans certains explants à moins de 40  $\mu\text{m}$  du contaminant tandis que dans d'autres cultures, il se différencie à plus de 200  $\mu\text{m}$  (Tableau 11).

## **D - Discussion**

Les résultats qui viennent d'être exposés montrent clairement:

- qu'une protection mécanique du mésoderme de membre ne suffit pas à assurer la morphogenèse de l'ébauche,
- que seuls certains épithélia sont capables d'exercer un effet inhibiteur sur la chondrogenèse,
- que cet effet inhibiteur ne se manifeste qu'à proximité immédiate du feuillet lorsqu'il est actif.

Dans les 35 associations de mésoderme de membre avec l'amnios ou la paroi du lécithocoele, aucun signe de morphogenèse n'a pu être mis en évidence : la chondrogenèse anarchique reste le phénomène prépondérant dans les associations analysées. Le mésoderme n'a pas la propriété intrinsèque de se développer de façon autonome et l'ectoderme de membre ne joue donc pas un simple rôle mécanique protecteur. FISCHER et SOLURSH (1979) ont montré par des transplantations orthotopiques ou hétérotopiques que le devenir du mésoderme de membre ou de somite est très fortement conditionné par des influences locales : des cellules somitiques implantées au coeur de bourgeons s'arrondissent et s'intègrent aux blastèmes préchondrogènes, alors qu'implantées sous l'ectoderme en périphérie du bourgeon, elles donnent un mésenchyme lâche. De même, des implantations de mésoderme de membre dans la région somitique (sous l'ectoderme dorsal) conduisent à la conversion du greffon en populations cellulaires dispersées. L'ectoderme de membre et l'ectoderme dorsal ont donc en commun la propriété d'empêcher la condensation du mésoderme et par conséquent sa chondrogenèse. D'autres épithélia partagent cette propriété : SOLURSH et al (1981) ont signalé que l'ectoderme de bourgeon de membre âgé (stade 26 chez le poulet), l'ectoderme de flanc, l'épithélium pigmentaire de rétine et l'ectoderme de processus maxillaire exercent le même effet. L'étude de nos propres implantations dans un mésoderme potentiellement chondrogène conduit à des conclusions équivalentes : l'ectoderme de membre et

l'ectoderme dorsal inhibent la chondrogenèse.

Toutefois, cette similitude évidente masque un autre phénomène plus subtil : de nombreuses mitoses sont régulièrement observées dans le voisinage des implants d'ectoderme de membre, mais pas à côté des implants d'ectoderme dorsal. SOLURSH et al (1981), GLOBUS et VETHAMANY-GLOBUS (1976) ont décrit une intense prolifération si l'ectoderme associé à des cultures cellulaires provient d'une ébauche de membre et surtout s'il comporte une partie de la crête apicale. Des travaux de KOSHER et al (1979a) et de REITER et SOLURSH (1982) démontrent le rôle de la crête apicale sur la prolifération du mésoderme de bourgeon. C'est pourquoi, les résultats de l'étude des contaminations d'explants par des fragments ectodermiques après traitement à l'EDTA sont très contestables en raison même de l'incertitude concernant l'origine exacte du contaminant. Leur seul intérêt est de montrer que l'ectoderme profondément remanié par le traitement à l'EDTA garde la possibilité de se réorganiser, de reconstituer une lame basale, et de moduler le devenir du mésoderme voisin.

Notre étude ne permet pas de proposer un mécanisme d'action. On sait, grâce aux travaux de SOLURSH et al (1981) que l'effet inhibiteur ectodermique s'exerce à travers des filtres dont la porosité ne permet pas les contacts cellulaires, qu'il est réversible, qu'il se traduit par l'accumulation d'une grande quantité de fibres de collagène sous la lame basale à l'interface ecto-mésodermique. De plus, ces auteurs estiment que le signal peut être transmis sur des distances allant de 25  $\mu\text{m}$  à 150  $\mu\text{m}$ . Les mesures que nous avons effectuées s'inscrivent parfaitement dans cette fourchette.

En conclusion, les expériences que nous avons rapportées dans ce dernier chapitre, bien que préliminaires, tendent à conforter l'idée du rôle morphogénétique très puissant que joue l'ectoderme du membre. Il reste maintenant à préciser les limites temporelles exactes de ce rôle en pratiquant des associations hétérochrones entre massifs mésodermiques d'âges variés, éventuellement même déjà en voie de différenciation, et des fragments d'ectoderme prélevés eux aussi à différents stades du développement embryonnaire.

## CHAPITRE II

### LA CHONDROGENESE DANS LES CULTURES CELLULAIRES DE MESODERME DE BOURGEONS DE MEMBRES DE SOURIS

## I. - ETUDE DE LA CAPACITE CHONDROGENE DES CULTURES EN MICROMASSES

### A - Introduction

De l'ensemble des résultats que nous venons d'exposer et des travaux complémentaires que nous avons publiés par ailleurs (REVILLION-CARETTE et al, 1986), il ressort un point très important : dans les cultures organotypiques, on assiste, selon les conditions expérimentales, soit à une différenciation cellulaire autonome mais anarchique (en l'occurrence, la différenciation cartilagineuse), soit à une morphogénèse squelettique, processus dans lequel la chondrogenèse est impliquée mais n'est que la manifestation finale d'un programme de développement résultant de plusieurs mécanismes préliminaires complexes. Il est, dans certains cas, très difficile d'attribuer les prestations obtenues à l'un ou l'autre de ces deux processus, notamment lorsque des agents exogènes sont employés pour infléchir *in vitro* le devenir des cellules encore indifférenciées présentes dans les apex de jeunes bourgeons (REVILLION-CARETTE, 1986). En d'autres termes, le bourgeon de membre est un système trop complexe pour permettre certaines études. C'est pourquoi, nous avons développé une technique de culture cellulaire permettant aux cellules mésodermiques de bourgeons de se différencier en cartilage tout en s'affranchissant de certaines des influences qu'elles subissent normalement au sein du bourgeon *in vivo* comme *in vitro* en culture organotypique.

Les premières cultures cellulaires, permettant la différenciation cartilagineuse du mésoderme de membre embryonnaire, ont mis en évidence la nécessité de disposer de cultures en monocouches confluentes (UMANSKY, 1966 ; CAPLAN, 1970). On imagine aisément le nombre de cellules et par conséquent la quantité de matériel indispensable à la mise en oeuvre et à la poursuite d'expérimentations visant l'étude de la chondrogenèse à partir de très jeunes stades embryonnaires. AHRENS et al (1977) ont décrit une méthode qui permet de résoudre ce problème : cette technique consiste à déposer des microquantités d'une suspension cellulaire fortement concentrée sur le fond de boîtes de culture. Ainsi, les cellules doivent sédimenter et se fixer sur une surface très faible et leur densité est, dès le début du séjour *in vitro*, suffisante pour obtenir la chondrogenèse. Dans ces conditions, s'instaure *in vitro* une cascade d'évènements en tous points comparable aux étapes de la différenciation *in vivo* : les cellules s'accumulent, s'arrondissent et se mettent à sécréter les composants de la matrice cartilagineuse. Ce système a été utilisé à de nombreuses reprises pour étudier les mécanismes de la chondrogenèse normale (AHRENS et al, 1979 ; SOLURSH et REITER, 1980 ; OWENS et SOLURSH, 1981 ; SOLURSH et al, 1981 ; HADHAZY et al, 1982 ; SOLURSH et al, 1982 ; HADHAZY et al, 1983 ; SWALLA et al, 1983 ; ZANETTI et SOLURSH, 1984 ; THAL et al, 1986 ; SOLURSH et al, 1986) ou anormale chez des embryons mutants

(OWENS et SOLURSH, 1982, 1983) pour étudier l'action de certaines molécules (tératogènes ou non) sur la différenciation cartilagineuse (HASSELL et al, 1978 ; LEWIS et al, 1978 ; MATSUTANI et KURODA, 1982 ; MATSUTANI et YAMAGATA, 1982 ; GAY et KOSHER, 1984 ; GUNTAKATTA et al, 1984 ; SWALLA et SOLURSH, 1984 ; CAMPBELL et al, 1985 ; KISTLER et al, 1985 ; SAN ANTONIO et TUAN, 1986) et même pour étudier l'effet de l'ectoderme (SOLURSH et al, 1981 ; REITER et SOLURSH, 1982).

Nous avons cherché, en utilisant ces cultures en micromasses, à estimer la capacité chondrogène du mésoderme distal de bourgeons de membres de souris en fonction du stade de prélèvement et en fonction de la densité cellulaire initiale. Nos résultats semblent indiquer que la chondrogenèse autonome des cellules provenant des bourgeons les plus jeunes (bourgeons postérieurs de stade 17) est, dans ces conditions précises, exceptionnelle, que les cellules apicales d'âge intermédiaire (bourgeons antérieurs de stade 17, bourgeons postérieurs de stade 19, bourgeons antérieurs de stade 19) peuvent fournir un abondant cartilage mais que le vieillissement des cellules (bourgeons postérieurs de stade 20, bourgeons antérieurs de stade 20) altère leur capacité de se convertir en chondrocytes. La densité cellulaire dans l'inoculum joue un rôle primordial mais les durées de culture que nous avons utilisées jouent un rôle accessoire.

## **B - Protocole expérimental**

Les bourgeons ou apex antérieurs et postérieurs des stades 17, 19, 20 sont débarrassés de leurs couvertures ectodermiques par un traitement à la trypsine. Les coeurs mésodermiques sont rassemblés, lavés et immergés dans une solution de trypsine-collagénase (0,05%-0,05%) dans laquelle les cellules sont dissociées par pipetages répétés. L'action enzymatique est stoppée et les cellules sont transférées dans le milieu de culture. On ajuste la concentration cellulaire de manière à disposer d'une suspension contenant  $2 \times 10^7$  cellules/ml. Une fraction aliquote de cette suspension est diluée par 2, 5 ou 6 dépôts de 10  $\mu$ l contenant  $2 \times 10^5$  ou  $10^5$  cellules sont répartis dans des boîtes de culture; on laisse sédimenter les cellules pendant 75 mn environ avant de fournir du milieu frais aux cultures. Après 3 ou 4 jours *in vitro*, les cultures sont fixées, colorées au bleu Alcian et à l'hématoxyline de Groat. Les nodules cartilagineux colorés en bleu sont comptés afin d'estimer la capacité chondrogène de chaque suspension cellulaire.

## **C - Résultats**

### **1) Evolution générale des cultures**

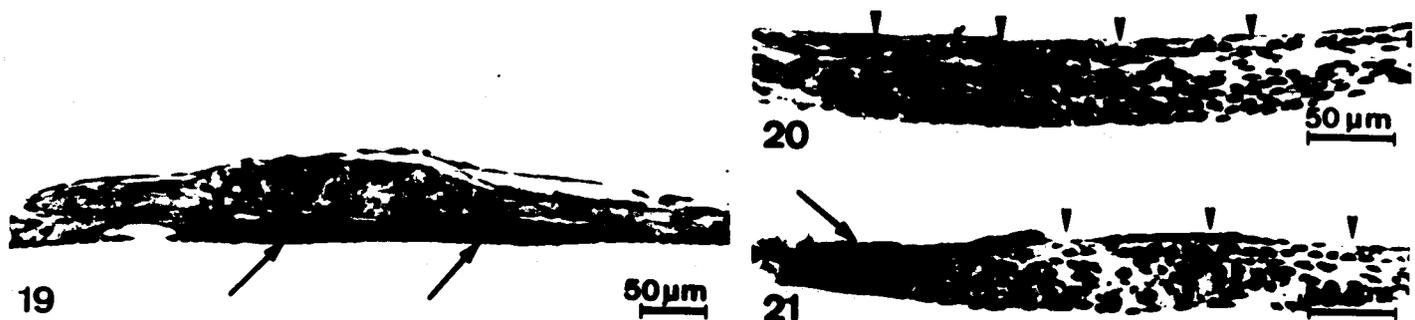
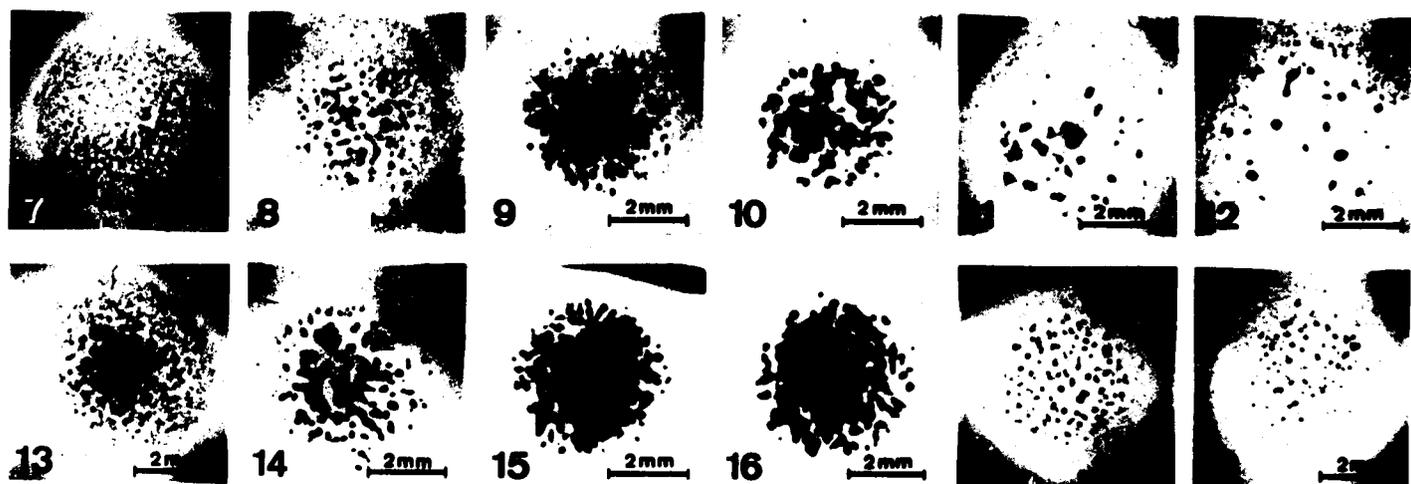
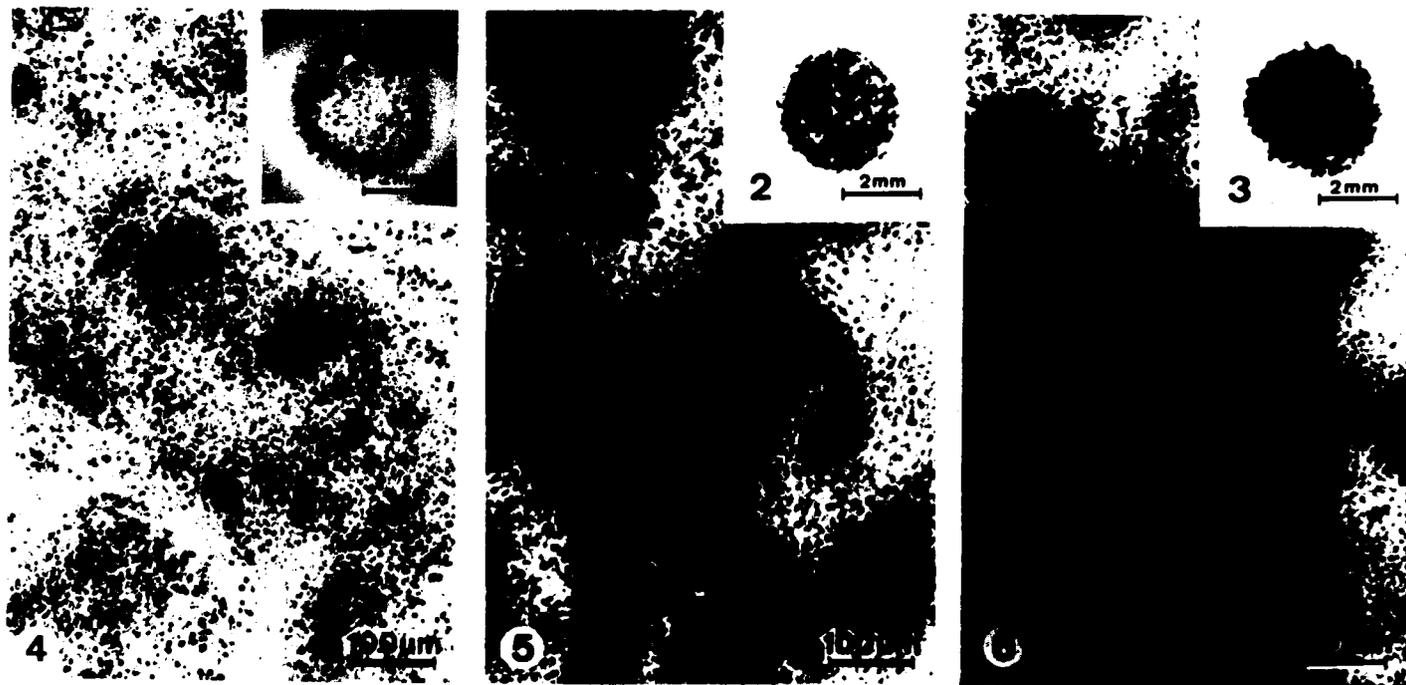
A l'exception du cas très particulier des bourgeons postérieurs de stade 17, on peut décrire

l'évolution des cultures en micromasses dans les termes suivants : après 24 heures *in vitro*, des agrégats de cellules indifférenciées ponctuent une monocouche de cellules étalées sur le support (Pl. XVII, Fig. 1). Chaque échantillon occupe encore, à ce moment, la surface initiale du dépôt soit environ 12 mm<sup>2</sup>. Aucune colonisation périphérique n'est observable mais un nombre important de cellules en dégénérescence apparaît à la surface du "massif" cellulaire (Pl. XVII, Fig. 4). Au cours des 24 h suivantes, une matrice cartilagineuse colorable au bleu Alcian apparaît au coeur des agrégats produits par toutes les cultures (Pl. XVII, Fig. 2) excepté celles issues des plus jeunes bourgeons (postérieurs de stade 17). Le nombre et la taille des nodules ainsi formés dépendent du stade et de la densité cellulaire de l'inoculum. Les nodules sont entourés de cellules agrégées qui n'ont pas encore commencé le dépôt des constituants de la matrice (Pl. XVII, Fig. 5), quelques agrégats ne contiennent pas encore de matrice détectable par la technique utilisée (Pl. XVII, Fig. 2). Un anneau d'essaimage s'établit à la périphérie de chaque culture : on n'y observe ni condensation cellulaire, ni chondrogenèse. Au cours du 3<sup>e</sup> jour de culture, la matrice apparaît dans les agrégats jusqu'alors indifférenciés, tandis que le diamètre des autres nodules augmente (Pl. XVII, Figs. 3 et 6). Ceci conduit à des fusions dans les cultures les plus évoluées mais des travées de cellules indifférenciées, en monocouches, persistent néanmoins entre les nodules. Le nombre de foyers chondrogènes ne varie plus sensiblement par la suite, on assiste à de nombreuses fusions d'autant plus fréquentes que la densité cellulaire initiale était grande.

## 2) Estimation de la capacité chondrogène des suspensions cellulaires

### a) Influence du stade de prélèvement.

Si l'on admet que, dans les conditions expérimentales utilisées, le mésoderme de bourgeon postérieur est qualitativement équivalent au mésoderme de bourgeon antérieur, il est possible de classer les échantillons analysés en fonction d'un âge théorique correspondant à l'aspect morphologique des bourgeons (Tableau 12); ainsi, un bourgeon postérieur de stade 19 contient un mésoderme plus âgé que celui d'un bourgeon antérieur de stade 17 mais plus jeune que celui d'un bourgeon antérieur de stade 19. Dans ces conditions, la capacité chondrogène des cultures est étroitement liée à l'âge du mésoderme mis en culture (Fig.4) : le plus jeune mésoderme (provenant de bourgeons postérieurs de stade 17) ne peut différencier *in vitro* qu'un nombre restreint de nodules (Pl. XVII, Figs. 7 et 13). Dans la plupart des cas, les agrégats cellulaires ne secrètent aucune matrice colorable par le bleu Alcian. L'aptitude à exprimer le phénotype cartilagineux augmente ensuite nettement (Pl. XVII, Figs. 8 et 14) avec un maximum pour un âge intermédiaire représenté par des bourgeons postérieurs de stade 19 (Pl. XVII, Figs. 9 et 15). Dans ce cas, si l'inoculum contient  $2 \times 10^5$  cellules, la chondrogenèse est telle que les nodules fusionnent, ce qui



BU  
LILLE

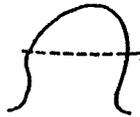
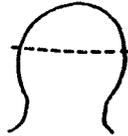
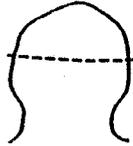
Densité cellulaire	Durée de la culture	Bourgeons Postérieurs	Bourgeons Antérieurs	Bourgeons Postérieurs	Bourgeons Antérieurs	Bourgeons Postérieurs	Bourgeons Antérieurs
		 St. 17	 St. 17	 St. 19	 St. 19	 St. 20	 St. 20
100 000 cellules / 10 µl	3 jours	* n = 38 0	n = 12 74 ± 19	n = 28 113 ± 15	n = 17 85 ± 12	n = 6 ** 35 ± 7	n = 9 ** 21 ± 3
	4 jours	* n = 13 0	n = 10 68 ± 10	n = 16 109 ± 11	n = 14 81 ± 8	-	-
200 000 cellules / 10 µl	3 jours	* n = 14 4 cultures d'une série avec 30 ± 4	n = 4 137 ± 6	n = 14 167 ± 24 (nombreuses fusions)	n = 20 168 ± 19	n = 9 ** 132 ± 12	n = 9 ** 71 ± 15
	4 jours	* n = 2 0	n = 4 125 ± 23	n = 8 167 ± 22 (nombreuses fusions)	n = 13 169 ± 20	-	-

TABLEAU 12 : Nombre moyen de nodules cartilagineux différenciés par les cultures en micromasses.

Pour chaque stade et type de bourgeons, à l'exception des explants postérieurs de stade 17 (\*) et des explants de stade 20, les résultats (représentatifs de plusieurs séries expérimentales) ont été obtenus à partir d'une seule suspension cellulaire "mère" ( $2 \times 10^7$  cellules/ml). Une partie de la suspension déposée par spots de 10 µl a été maintenue 3 ou 4 jours *in vitro* tandis que l'autre partie a été diluée de moitié avant d'être, elle aussi, déposée ( $10^5$  cellules/10 µl) et cultivée 3 ou 4 jours.

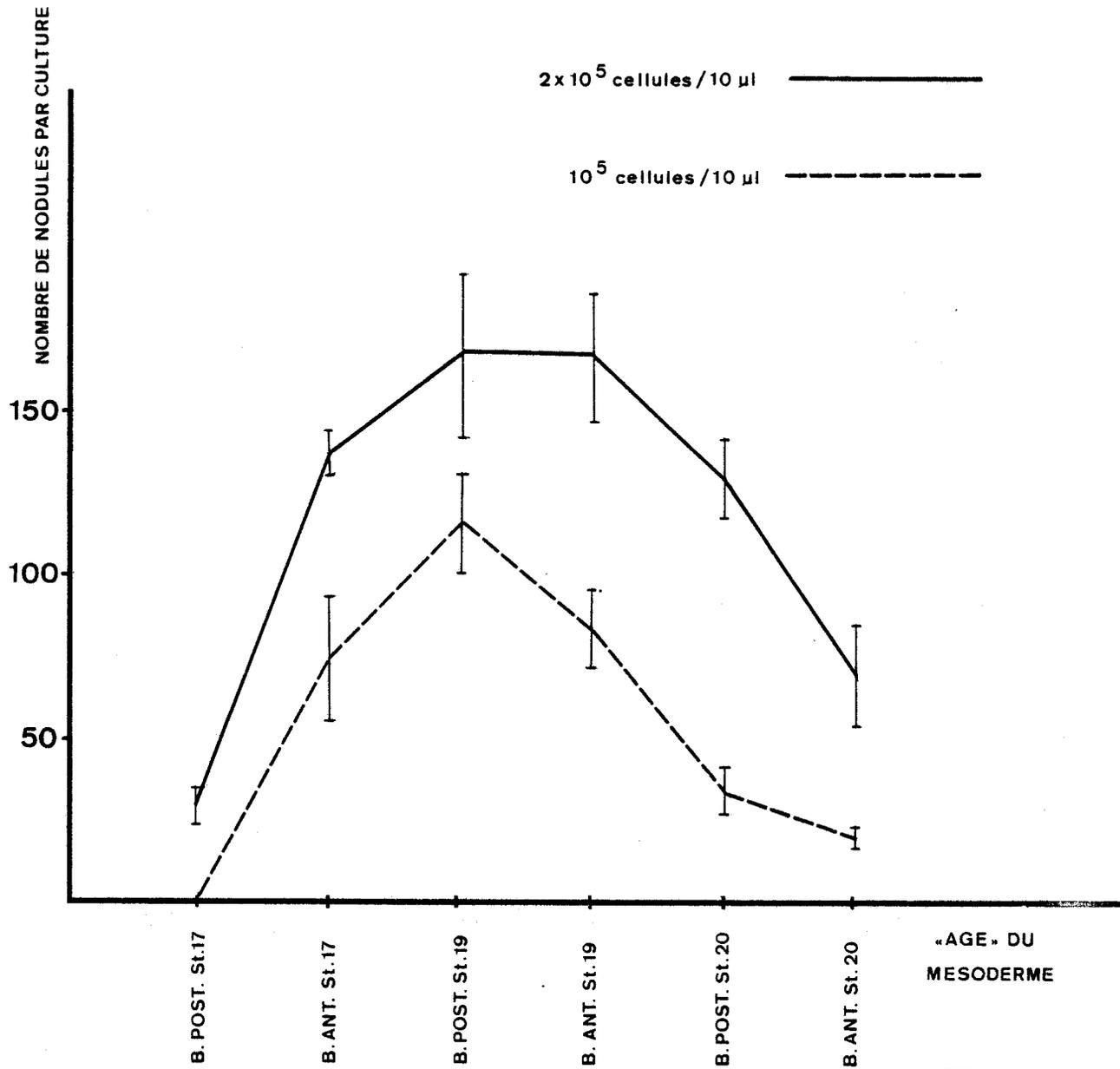
n : nombre de dépôts de 10 µl analysés

\* : ce nombre de cultures a été obtenu en rassemblant 5 séries expérimentales.

\*\* : les résultats obtenus pour les stades 20 antérieurs et postérieurs proviennent de mises en cultures différentes.



Fig.4 : Capacité chondrogène des cultures en micromasses en fonction de l'âge du mésoderme utilisé



occasionne une sous-estimation du nombre réel de foyers chondrogènes : les chiffres que nous avons retenus ne peuvent qu'être inférieurs au nombre de foyers chondrogènes existant en réalité. La capacité du mésoderme plus âgé à se différencier diminue ensuite progressivement (Pl. XVII, Figs. 10,11,12 et 16,17,18).

#### b) Influence de la densité cellulaire de l'inoculum.

Le nombre de nodules différenciés est fonction de la densité cellulaire initiale (Tableau 12). Les séries expérimentales où une suspension "mère" a été diluée de moitié permettent de quantifier cette observation : les nodules qui se forment dans chaque inoculum dilué sont deux fois moins nombreux que ceux formés dans chaque inoculum issu de la suspension cellulaire "mère". Pour les stades les plus jeunes étudiés, une concentration cellulaire élevée est indispensable à l'obtention de quelques nodules dans l'une des 5 séries expérimentales exploitées. Dans cette même série, les cultures instaurées à la concentration de  $10^5$  cellules/10  $\mu$ l n'ont donné aucune différenciation cartilagineuse. Il faut néanmoins constater que la survie des cellules de ce stade est difficile *in vitro*, ce qui réduit sans doute la densité initiale et perturbe l'évolution des micromasses.

#### c) Influence de la durée de culture.

Nous n'avons pas observé de différences significatives dans le nombre total des nodules formés par chaque type de culture après 3 ou 4 jours *in vitro*. Seule la taille des nodules augmente, ce qui entraîne leur coalescence. Il faut sans doute trouver dans ce phénomène l'origine des légères différences observées, les cultures de 4 jours totalisant un nombre global de nodules inférieur (Tableau 12).

### D - Discussion

L'ensemble des résultats que nous venons d'exposer s'intègre assez bien dans les données publiées par ailleurs et met en évidence l'importance de deux facteurs principaux dans la chondrogenèse des cultures en micromasses : l'âge du mésoderme mis en culture et la densité cellulaire à laquelle il est utilisé. Nous discuterons successivement ces deux points avant de comparer les apports respectifs des cultures organotypiques et cellulaires.

#### 1) Relations stade de prélèvement-capacité chondrogène

Les stades embryonnaires les plus jeunes (bourgeons postérieurs de stade 17) ont

manifestement une capacité chondrogène très réduite : dans l'ensemble des cultures que nous avons pu exploiter, seuls 4 spots ont différencié quelques nodules. Sous réserve que les conditions de cultures aient été optimales dans toutes les séries, on peut affirmer que les cellules mésodermiques de bourgeons de membres de souris acquièrent leur capacité d'autodifférenciation à cette époque. Avant cette phase, les cellules même agrégées sont incapables de déposer les composants de la matrice que nous colorons par le bleu Alcian. AHRENS et al (1977) ont détecté une phase charnière équivalente dans des cultures en micromasses établies à partir de bourgeons alaires de poulet au stade 20 (Pl. IV). OWENS et SOLURSH (1981) chez la souris et pour le bourgeon antérieur situent cette étape-clé entre le stade 15 et les stades 16-17. Les stades suivants semblent être hautement chondrogènes et AHRENS et al (1977) ne signalent pas de diminution de l'aptitude à se différencier au moins jusqu'au stade 24 chez le poulet. Le travail récent de COTTRILL et al (1987) met en évidence une capacité chondrogène plus faible des apex de bourgeons alaires de stades 25 à 27.

Chez la souris, OWENS et SOLURSH (1981) ont étudié l'évolution de cultures lancées à partir de bourgeons complets de plus en plus âgés (jusqu'au stade 21). Ces auteurs ont observé une chute brutale et importante du nombre des nodules élaborés par les bourgeons atteignant le stade 21 et leur disparition dans les cultures de mésoderme provenant de bourgeons parvenant au milieu de ce même stade. D'autre part, plus le mésoderme prélevé est âgé, plus le diamètre des nodules diminue. Toutefois, il convient de nuancer ces résultats : chez le poulet, à partir du stade 24, on note un comportement très différent des cellules selon qu'elles proviennent de l'apex du bourgeon ou de sa base : le mésoderme apical se différencie abondamment et spontanément (GAY et KOSHER, 1984) alors que le mésoderme proximal prélevé au coeur ou à la périphérie du bourgeon montre une aptitude à se chondrifier de plus en plus réduite (AHRENS et al, 1979 ; SOLURSH et al, 1981-1982 ; SWALLA et al, 1983 ; GAY et KOSHER, 1984). Des agrégats se forment, les cellules y fabriquent du collagène de type II spécifique du cartilage mais pas les protéoglycannes contenant les glycosaminoglycannes sulfatés colorés par le bleu Alcian (SOLURSH et al, 1982 ; SWALLA et al, 1983). Pour l'école de SOLURSH, c'est l'hétérogénéité tissulaire caractéristique de la partie proximale des bourgeons qui est responsable du comportement des cultures issues de cette région des ébauches. Nos propres observations ont confirmé que l'apex des bourgeons de stade 20 est constitué de rayons digitaux préchondrogènes emballés dans un abondant mésenchyme. Ceci expliquerait les prestations assez médiocres de ces apex dans ce type de culture. Nous retiendrons en outre que les bourgeons et apex spontanément chondrogènes contiennent des populations cellulaires dont le devenir est fortement conditionné par des facteurs externes et qui montrent une grande malléabilité : comme l'ont montré HADHAZY et al (1982), les nodules s'accroissent progressivement jusqu'à fusionner par recrutement des cellules périphériques internodulaires.

Certains traitements que nous avons étudiés par ailleurs (REVILLION-CARETTE et al, 1986) accélèrent et accentuent cette conversion : l'AMPC permet d'obtenir un dépôt de matrice même

dans les zones internodulaires de micromasses établies à partir de bourgeons antérieurs de stades 16-17 (OWENS et SOLURSH, 1981). Mais cette population hautement chondrogène diminue progressivement lorsque des cellules issues de bourgeons de stades plus avancés sont étudiées. La lignée conjonctive semble s'installer beaucoup plus rapidement chez la souris que chez le poulet (OWENS et SOLURSH, 1981). Il est même possible que cette lignée oriente le devenir des cellules chondrogènes : il est en effet surprenant que les cellules prélevées dans des apex sur le point de mettre en place le squelette autopodial (bourgeons de stade 20) ne donnent pas plus de cartilage lorsqu'elles sont mises en culture. OWENS et SOLURSH (1981) supposent que les cellules des condensations, diluées au sein d'une population non chondrogène importante, ne peuvent exprimer leur phénotype soit parce qu'elles sont isolées les unes des autres et ne peuvent interagir, soit parce que des changements internes surviennent en relation avec leur nouvel environnement et les empêchent de le faire. SASSE et al (1984) et COTTRILL et al (1987) ont montré que l'élimination de la lignée myogène de l'ensemble de la population cellulaire du bourgeon de membre détermine une augmentation substantielle de la chondrogenèse à partir des cellules restantes. D'autre part, il a été montré que des chondrocytes se dédifférencient s'ils sont placés à proximité immédiate de cellules non chondrogènes (HOLTZER et ABBOTT, 1968). Néanmoins, les cocultures étudiées plus récemment par HATTORI et IDE (1984) semblent exclure la possibilité que des cellules fibroblastiques inhibent la différenciation de cellules chondrogènes de membre.

En conclusion, le système des cultures en micromasses permet de suivre la chondrogenèse des cellules encore jeunes que les remaniements subis ne semblent pas perturber. En revanche, il ne paraît pas souhaitable de rompre la chaîne des mécanismes qui surviennent pendant la phase finale de la différenciation des cellules plus âgées.

## 2) Densité cellulaire et chondrogenèse

Bien que nous n'ayons employé que 2 densités cellulaires différentes, nos résultats montrent que le nombre de nodules différenciés dans chaque culture dépend de la densité cellulaire dans l'inoculum. AHRENS et al (1977) ont constaté que plus le nombre de cellules contenu dans chaque inoculum est grand, plus la surface occupée par la culture est importante et plus le nombre de nodules augmente. Il est tentant de penser qu'une forte densité détermine la formation d'agrégats nombreux et d'établir un parallèle entre les événements qui surviennent *in vivo* et *in vitro*. On peut en effet observer des zones de forte densité cellulaire au coeur des bourgeons là où se formeront un

peu plus tard les ébauches squelettiques (THOROGOOD et HINCHLIFFE, 1975). Les agrégats mis en place après 24 heures *in vitro* sont tout à fait assimilables à ces blastèmes préchondrogènes. Cependant, les agrégats de cellules très jeunes sont incapables de mener à terme une différenciation cartilagineuse, ce qui prouve qu'une densité cellulaire importante ne suffit pas toujours pour déclencher la chondrogenèse. D'autre part, HATTORI et IDE (1984) ont montré que des cellules de membre embryonnaire de poulet (stades 23-24), cultivées à faible densité ( $2 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) dans des milieux appauvris en sérum (0,1% à 5%) peuvent former des agrégats puis des nodules cartilagineux. Dans ces mêmes conditions, l'adjonction d'AMPc au milieu permet d'éviter la phase d'agrégation : HATTORI et IDE (1985) obtiennent des monocouches de chondrocytes. La confluence des cellules dans les agrégats, la diminution des facteurs de croissance sériques et le traitement à l'AMPc sont des conditions pouvant entraver la prolifération des cellules et favoriser leur différenciation (HERKEN, 1975 ; SOLURSH et REITER, 1975 ; MILLER et al, 1979 ; REVILLION-CARETTE, 1986).

Par ailleurs, SOLURSH et al (1982) ont décrit la chondrogenèse de cellules mésodermiques isolées, prélevées sur des bourgeons alaires de stades 22-23 et cultivées sur ou dans des gels de collagène de type I. Pour ces auteurs, les substrats qui permettent l'aplatissement des cellules s'opposent à l'expression du phénotype cartilagineux. En traitant des cultures subconfluentes de cellules de même origine (mésoderme de bourgeons alaires de stades 22-24 mis en suspension et déposé à la concentration de  $5 \times 10^4$  cellules dans 10 µl) par la cytochalasine D, ZANETTI et SOLURSH (1984) ont pu détruire le cytosquelette des cellules et les ont ainsi forcées à devenir sphériques. Dans ces conditions, les cellules s'engagent dans la voie de la chondrogenèse. Il faut toutefois noter que la cytochalasine B, utilisée aux mêmes concentrations, inhibe la différenciation cartilagineuse (PARKER et al, 1978). D'autre part, le maintien du phénotype cartilagineux est possible lorsque les cultures de chondrocytes sont établies sur substrat recouvert de poly (2-hydroxyethyl methacrylate); or, les chondrocytes déposés sur ce substrat restent sphériques (GLOWACKI et al, 1983).

De l'ensemble de ces travaux, il ressort que le phénomène d'agrégation n'est pas forcément lié à une densité cellulaire élevée, que l'agrégation n'est pas une étape indispensable dans le processus de chondrogenèse mais que la phase de condensation pourrait permettre un changement de forme des cellules propice à leur différenciation si certaines autres conditions sont réunies.

### 3) La chondrogenèse en culture cellulaire et en culture organotypique

Deux systèmes de culture ont permis d'obtenir la chondrogenèse du mésoderme dans notre travail : la culture en interface d'explants mésodermiques dénudés et la culture de cellules mésodermiques préalablement dissociées. L'utilisation de ces deux techniques ne conduit pas à des

résultats rigoureusement superposables. En effet, si les explants les plus jeunes (bourgeons postérieurs de stade 17), se différencient en culture organotypique (à la condition d'avoir survécu à la mise en culture), il n'en va pas de même avec les cultures en micromasses où de nombreux échantillons sont formés de cellules agrégées mais non différenciées. Un tel phénomène a déjà été observé par SOLURSH et REITER (1980) : des cultures cellulaires à haute densité dérivées de mésoderme alaire de poulet de stade 19 ne donnent pas de cartilage après dissociation trypsique ou mécanique alors que ce même mésoderme peut se différencier *in vitro* s'il est mis en culture sous forme de fragments tissulaires. Mais, même dans le cas des cultures organotypiques, les résultats semblent tributaires de conditions techniques particulières : chez le poulet, GUMPEL-PINOT (1972-1973) a obtenu une chondrogenèse dans 13,3% des explants mésodermiques de stade 17 mis en culture selon la méthode de WOLFF et HAFFEN (1952). Un changement de technique (GUMPEL-PINOT, 1980) porte ce résultat, pour le même stade, à 57% d'explants différenciés. La comparaison de ces données nous permet donc une certaine tolérance dans l'interprétation de nos résultats : en dépit d'un comportement très inféodé aux conditions expérimentales, le mésoderme de bourgeons postérieurs de souris de stade 17 traverse une phase critique qui lui confèrera la capacité de s'autodifférencier. Toutes corrections faites, MILAIRE et MULNARD (1968) en utilisant des cultures d'explants, ont situé cette phase au cours du jour 10 pour le bourgeon postérieur et au cours du jour 9 pour le bourgeon antérieur, OWENS et SOLURSH (1981), par la technique des micromasses, ont montré que les bourgeons antérieurs de stade 15 ne se différencient pas mais que ces mêmes bourgeons antérieurs prélevés aux stades 16-17 donnent un nombre important de nodules. L'ensemble de ces résultats paraît donc assez cohérent.

Si les bourgeons de stades intermédiaires traités selon les 2 méthodes donnent une chondrogenèse très étendue et comparable, les bourgeons de stade 20 manifestent, pour leur part, des comportements différents qui paraissent liés aux protocoles expérimentaux. Les apex dénudés sont le siège d'une différenciation cartilagineuse importante mais localisée aux rayons digitaux. Les populations périphériques sont dans ce cas réduites. En culture cellulaire, après dissociation totale des apex, le nombre des foyers chondrogènes diminue alors que les populations non chondrogènes restent abondantes. Nous ne reviendrons pas sur les causes possibles de cette évolution paradoxale (cf paragraphe 1 de cette discussion) mais force est de constater de nouveau l'importance de l'environnement cellulaire sur l'expression du phénotype cartilagineux même dans la phase terminale de ce processus.

En conclusion, la technique de culture en micromasses nous a permis de confirmer que le mésoderme de bourgeon de membre est capable de se différencier de façon autonome en cartilage. Cette différenciation qui survient dans des conditions précises, dépend du stade de prélèvement et de la densité cellulaire utilisée. La méthode mise en oeuvre devrait permettre d'exploiter

ultérieurement ce modèle de différenciation dans des situations expérimentales susceptibles d'aider à mieux comprendre les mécanismes qui le contrôlent.

## II. - EFFETS DES FEUILLETS EPITHELIAUX SUR LA DIFFERENCIATION DES CULTURES CELLULAIRES

### A - Introduction

L'ensemble des résultats que nous avons rapporté dans le premier chapitre, confronté aux travaux publiés par d'autres auteurs, met particulièrement en relief la dualité de l'effet de l'ectoderme du bourgeon sur le coeur mésodermique. Au cours des stades précoces du développement, l'ectoderme paraît indispensable pour obtenir une différenciation cartilagineuse au sein du mésoderme (MILAIRE et MULNARD, 1968 ; GUMPEL-PINOT, 1972-1973). Plus tard, l'ectoderme et sa crête apicale semblent freiner la chondrogenèse (KOSHER et al, 1979a ; DESBIENS et al, 1985). Il nous a donc paru intéressant de savoir si l'évolution des cultures en micromasses, considérées en temps que modèle simplifié de différenciation, pouvait être influencée par des feuillets épithéliaux embryonnaires rapportés sur les cellules mésodermiques. Dans cette partie de notre travail, nous avons cherché à répondre plus particulièrement à deux questions :

a) certains feuillets épithéliaux, dont l'ectoderme de membre, peuvent-ils inhiber la chondrogenèse du mésoderme issu de stades hautement chondrogènes ?

b) ces mêmes feuillets peuvent-ils promouvoir la différenciation dans les cultures qui se sont révélées incapables d'élaborer des nodules ?

Si les résultats que nous avons obtenus permettent de répondre parfaitement à la première des 2 questions, le nombre peu élevé d'associations réussies entre feuillets épithéliaux et cultures non chondrogènes ne suffit pas à apporter une réponse satisfaisante à la seconde interrogation. Les associations d'amnios avec des cultures chondrogènes ne détournent pas le mésoderme de sa différenciation. L'ectoderme dorsal semble doté d'un certain pouvoir inhibiteur tandis que l'ectoderme de membre non seulement inhibe la chondrogenèse mais encore provoque autour de lui l'accumulation de nombreuses cellules indifférenciées au sein desquelles les figures de mitose sont abondantes. Aucune des associations précitées n'a déterminé la différenciation du mésoderme issu de bourgeons postérieurs de stade 17.

### B - Protocole expérimental

Les feuillets épithéliaux (amnios - ectoderme dorsal - ectoderme de bourgeon avec sa crête apicale) sont déposés sur des cellules mésodermiques mises en culture le jour précédent. Il est donc important de rappeler que ces associations sont réalisées alors que les cellules mésodermiques ont commencé le processus d'agrégation caractéristique des 24 premières heures *in vitro*. Les cultures

en micromasses établies à partir de suspensions contenant  $10^5$  cellules/10 $\mu$ l ou  $2 \times 10^5$  cellules/10 $\mu$ l ont fourni (suivant le stade et la densité) entre 6 et 14 nodules par mm<sup>2</sup>. Les capes apicales de bourgeons telles que nous les avons prélevées ont une surface de 0,35 mm<sup>2</sup> environ et sont les feuillettes les plus petits que nous ayons utilisés. Dans ces conditions, nos "greffons" ont toutes les chances de recouvrir au moins un futur nodule. Les cultures sont fixées 2 ou 3 jours après le dépôt des fragments épithéliaux et traitées selon des techniques histologiques classiques. Les coupes sont colorées au bleu Alcian à pH1, puis à l'hématoxyline de Groat.

### **C - Résultats**

#### **1) Association de feuillettes épithéliales avec des cultures hautement chondrogènes.**

Nous regrouperons ici les résultats très comparables obtenus avec le mésoderme provenant de bourgeons antérieurs de stade 17, de bourgeons postérieurs et antérieurs de stade 19. De même, nous ne distinguerons pas les cultures établies à partir d'une suspension contenant  $10^5$  cellules/10  $\mu$ l de celles établies à partir d'une suspension contenant  $2 \times 10^5$  cellules/10  $\mu$ l.

##### a) association avec de l'amnios.

Sous le lambeau d'amnios, dans 7 cas sur 9, on trouve des nodules situés dans une monocouche de cellules mésodermiques où on n'observe pas de figures de mitose (Pl. XVII, Fig. 19). Ces nodules sont aplatis et comportent tout au plus 3 ou 4 assises cellulaires. Néanmoins, la matrice cartilagineuse est abondante.

##### b) association avec de l'ectoderme dorsal.

Les préparations les plus caractéristiques montrent le greffon posé sur quelques assises de cellules mésodermiques indifférenciées où des mitoses sont visibles mais en nombre limité. Dans ce cas, l'épithélium est séparé du mésoderme par une lame basale bien nette (Pl. XVII, Fig. 20). Dans 2 cas sur 8, un contact existe avec un nodule cartilagineux (Pl. XVII, Fig. 21). Dans d'autres cas, le greffon a été retrouvé associé à plusieurs assises de cellules dont les noyaux s'allongent parallèlement au support. Nous ignorons si ces cellules sont des contaminants apportés avec le greffon ou si elles dérivent du mésoderme récepteur.

c) association avec de l'ectoderme apical de bourgeons de membre (38 cas)

La cape apicale, lorsqu'elle s'est étalée à la surface de la culture se trouve soulevée par plusieurs couches de cellules indifférenciées (Pl. XVII, Fig. 23), mais il arrive aussi fréquemment qu'elle forme une vésicule complètement entourée par de nombreuses cellules mésodermiques (Pl. XVII, Fig. 22). Quoi qu'il en soit, le mésoderme qui s'accumule sous ou autour de l'ectoderme ne forme pas de nodules et on observe, en général, de nombreuses mitoses à proximité des greffons .

**2) Association de feuillets épithéliaux avec des cultures non chondrogènes.**

a) association avec de l'amnios.

1 seul greffon a pu être examiné : l'amnios repose sur une monocouche cellulaire indifférenciée. Aucun nodule cartilagineux n'est observable ni à proximité immédiate du greffon, ni en périphérie de la culture.

b) association avec de l'ectoderme dorsal.

Comme précédemment, 1 seule association a pu être exploitée : elle montre une vésicule ectodermique sur le bord d'un amas mésodermique indifférencié, mais pas de cartilage.

c) association avec de l'ectoderme de membre.

5 associations ont pu être analysées : les greffons déterminent la formation d'amas cellulaires mésodermiques où les mitoses sont nombreuses. Mais nous n'avons observé de cartilage dans aucune de ces cultures.

**D - Discussion**

Dans les cultures en micromasses issues d'un mésoderme apte à se chondrifier de façon autonome, les cellules préalablement dissociées forment des agrégats au sein desquels apparaît une matrice cartilagineuse. Le dépôt d'un lambeau d'amnios sur un support où se sont déjà formés des agrégats ne perturbe pas la chondrification ultérieure, ce qui confirme les observations faites sur des apex emballés. Ce feuillet épithélial ne semble doté d'aucun pouvoir morphogénétique et le mésoderme protégé de l'environnement ne modifie pas son comportement. L'ectoderme dorsal ne peut, quant à lui, produire l'accumulation des cellules mésodermiques dans son voisinage mais

paraît capable d'inhiber la chondrogenèse : ce résultat est en accord avec les observations réalisées sur des explants dénudés dans lesquels des fragments d'ectoderme ont été insérés et confirme les conclusions de SOLURSH et al (1981). Mais GLOBUS et VETHAMANY-GLOBUS (1976) n'ont pas observé l'effet inhibiteur de ce type d'ectoderme sur la chondrogenèse dans un système de culture assez comparable au nôtre. Le dépôt d'une cape ectodermique sur les agrégats cellulaires mésodermiques exclut la différenciation cartilagineuse : il faut admettre que dans ce cas, l'ectoderme est capable d'inverser le processus de différenciation pendant la phase préliminaire de condensation. SOLURSH et al (1981) ont déposé de l'ectoderme de membre (sans la crête apicale) sur des cultures en micromasses de 4 jours contenant des nodules différenciés et ont constaté que les chondrocytes des nodules situés sous le greffon accumulaient des quantités réduites d'une matrice anormalement riche en fibres de collagène. L'ectoderme semble donc capable d'infléchir aussi les phases tardives de la chondrogenèse. D'autre part, la prolifération des cellules mésodermiques est favorisée aux abords du greffon où on note une accumulation nette de mésenchyme. REITER et SOLURSH (1982) ont démontré le pouvoir mitogène de la crête apicale et GLOBUS et VETHAMANY-GLOBUS (1976), SOLURSH et al (1981) ont observé des dômes de mésoderme coiffés par une calotte ectodermique dont le sommet semble organisé comme une crête apicale. Nous n'avons pas observé de telles formations sans doute pour des raisons purement techniques, notre greffon étant constitué d'une calotte ectodermique retournée en doigt de gant. Les dômes observés par certains auteurs et le fait que des vésicules ectodermiques soient complètement englobées dans le mésoderme de quelques unes de nos cultures impliquent un apport de cellules important et on peut se demander si la prolifération dans les agrégats ne s'accompagne pas du rassemblement de certaines cellules situées dans le voisinage immédiat du greffon.

Des résultats assez comparables ont été obtenus avec le mésoderme qui ne se chondrifie pas de façon autonome dans les conditions expérimentales imposées par la technique des micromasses. Ceci sous-entend que l'effet inducteur précoce du feuillet ectodermique de membre ou du feuillet ectodermique dorsal mis en évidence par MILAIRE et MULNARD (1968) et GUMPEL-PINOT (1972-1973) ne s'est pas manifesté dans ce type de culture ou tout au moins ne s'est pas exprimé. Il est possible que la quantité de mésoderme présente à côté du greffon ne soit pas suffisante pour que l'effet de l'ectoderme soit perceptible. En effet, toutes les cellules qui ont pu recevoir le signal sont restées dans l'environnement immédiat de la calotte ectodermique. Or, MILAIRE et MULNARD (1968) ont constaté que le cartilage différencié sous l'effet de l'ectoderme est toujours séparé du tissu inducteur par une couche de mésenchyme non chondrifié. GUMPEL-PINOT (1980) a signalé que les nodules chondrogènes se différencient fréquemment au centre des explants et a admis le principe d'une migration des cellules induites puisqu'un contact étroit avec l'ectoderme est nécessaire pour obtenir l'effet inducteur. D'autre part, cet auteur augmente le volume des tissus récepteurs par association de plusieurs coeurs mésodermiques : il est donc possible que la

configuration très étalée de nos cultures ne convienne pas à l'expression de l'effet inducteur ectodermique.

### **CHAPITRE III**

## **LA MORPHOGENESE SQUELETTIQUE DANS LES CULTURES DE BOURGEONS DE MEMBRES ENTIERS**

## I. - TECHNIQUES DE CULTURE ET MORPHOGENESE SQUELETTIQUE

### A - Introduction

Chez les Mammifères, le développement *in utero* a toujours été un obstacle à l'expérimentation microchirurgicale indispensable pour étudier toute morphogénèse. C'est pourquoi, de nombreux auteurs ont tenté de reproduire *in vitro* le développement normal en essayant de cerner le plus précisément possible les besoins des bourgeons pendant leurs phases de croissance et de différenciation. Souvent ces expériences ont été menées dans le but de comprendre comment agissent certaines drogues tératogènes (YAMAMURA et al, 1966 ; SHEPARD et BASS, 1970 ; AYDELOTTE et KOCHHAR, 1972 ; YASUDA, 1973 ; NEUBERT et al, 1974 a-b ; KOCHHAR et AYDELOTTE, 1974 ; NAKAMURA, 1975 ; AGNISH et KOCHHAR, 1976 a-b ; LESSMÖLLMANN et al, 1976 ; NEUBERT et RAUTENBERG, 1976 ; MANSON et al, 1977 ; MANSON et SMITH, 1977 ; NAKAMURA, 1977 ; MERKER et al, 1978 ; KOCHHAR et al, 1978 ; MANSON et SIMONS, 1979 ; GULAMHUSEIN et al, 1980 ; KNUDSEN et KOCHHAR, 1981b ; KWASIGROCH et al, 1981 ; KWASIGROCH et SKALKO, 1982 ; BLANKENBURG et al, 1983 ; KWASIGROCH et SKALKO, 1983 ; NEUBERT et KROWKE, 1983 ; STEELE et al, 1983 ; KWASIGROCH et al, 1984 ; KWASIGROCH et al, 1986). Dans tous les cas et quelle que soit la technique employée, les bourgeons mettent en place des pièces squelettiques qui apparaissent fréquemment déformées et de taille réduite. De plus, les résultats sont rigoureusement liés au stade de prélèvement : les segments squelettiques distaux ne se développent pas dans les bourgeons provenant des jeunes embryons (cf chapitre 1).

Dans un travail préliminaire (DESBIENS, 1979), nous avons utilisé un protocole décrit par NEW et al (1976) pour savoir si les squelettes élaborés *in vitro* étaient conformes aux programmes de développement établis et exécutés *in utero* : le développement *in vitro* d'ébauches de membres d'embryons provenant d'une corne utérine de femelles gestantes préalablement traitées avec un agent tératogène ("chirurgie chimique" de KOCHHAR et AGNICH, 1977) a été comparé à celui des membres appartenant aux embryons de la même portée situés dans l'autre corne utérine ayant donc évolué *in situ*. Les prestations fournies *in vitro* sans traitement par des bourgeons d'âge équivalent ont servi de références. La cytosine arabinoside que nous avons employée permet d'obtenir des malformations squelettiques ponctuelles d'autant plus distales que l'injection est tardive : administrée avant la phase de croissance du bourgeon, la cytosine arabinoside provoque une très forte mortalité embryonnaire mais a des effets bénins sur les membres des embryons survivants. Injecté plus tard, le taux de mortalité chute brusquement, mais le produit devient hautement tératogène. Si le bourgeon est encore jeune quand il subit le traitement, tous les éléments du squelette élaborés *in utero* seront réduits et déformés. Avec le vieillissement du bourgeon, on

observe le déplacement en direction distale des anomalies, le stylo-pode d'abord et le zeugopode ensuite seront préservés, l'autopode est le dernier à être atteint. Les membres touchés dans leurs segments intermédiaires peuvent néanmoins élaborer *in utero* des autopodes sensiblement normaux. Tout laisse à penser que la cytosine arabinoside agit plus particulièrement sur les cellules avant leur différenciation pendant leur phase de multiplication. Les cellules non déterminées restées saines compenseraient les effets de l'agent tératogène et pourraient mettre en place des structures distales.

Selon cette hypothèse, des bourgeons traités au milieu de la phase de sensibilité du bourgeon auraient pu théoriquement élaborer *in vitro* un autopode rudimentaire à l'extrémité de segments intermédiaires atrophiés. Ces explants ne l'ont pas fait, et de façon générale, les prestations réalisées *in vitro* par les jeunes bourgeons traités sont nettement inférieures à ce que l'on pouvait attendre, or les contrôles histologiques ont montré que le matériel prélevé pour la mise en culture (20 heures après le traitement) n'avait pas encore récupéré : les noyaux des cellules mésodermiques distales sont pycnotiques, la crête apicale a une configuration normale. Il est donc possible qu'une récupération insuffisante associée au choc de la mise en culture mettent un terme à la prolifération des cellules encore viables. L'ensemble des résultats tant morphologiques qu'histologiques nous a donc conduit à admettre que la technique employée (culture organotypique en milieu chimiquement défini de LESSMÖLLMANN et al, 1976) n'assurait pas la survie du complexe ecto-mésodermique apical et que seules les cellules proximales déjà en voie de différenciation dans le bourgeon explanté continuaient leur évolution *in vitro*. Aucune pièce squelettique ne se met en place si elle n'est pas déjà "programmée" au moment du prélèvement.

L'étude très détaillée de MILAIRE et MULNARD (1984) a confirmé nos résultats : la chondrogenèse survient dans les blastèmes préchondrogènes présents au moment de l'explantation. Ainsi, un autopode normal se forme régulièrement dans des bourgeons antérieurs prélevés sur des embryons de 50 à 52 paires de somites (la base du bourgeon étant adjacente aux somites 7 à 12). Les rayons digitaux manquent lorsque des embryons ayant moins de 45 somites servent à ce type d'expérimentation. L'étude histologique rapportée par ces auteurs montre une dégénérescence cellulaire importante dans la crête apicale et le mésoderme sous-jacent dès le premier jour *in vitro*. Dès lors, il paraît évident que toute morphogenèse à partir de ces constituants essentiels devient illusoire, le mésoderme apical ne prolifère plus sous l'influence d'une crête ectodermique moribonde et les étapes ultérieures conduisant à l'élaboration d'un squelette harmonieux ne surviennent pas.

La démarche dictée par ces observations consistait donc à obtenir *in vitro* plus que la survie du complexe ecto-mésodermique apical : il nous fallait, à partir de stades à palette autopodiale encore indifférenciée, favoriser la croissance et le développement de cette partie du bourgeon pour espérer y obtenir une morphogenèse squelettique. En incorporant aux milieux de culture du sérum

de veau foetal, des facteurs de croissance et en facilitant la pénétration du milieu nutritif au niveau de l'apex du bourgeon par l'insertion d'implants de catgut, des bourgeons antérieurs prélevés sur des embryons de stade 18 (40 à 44 paires de somites) ont mis en place au moins 4 rayons digitaux tandis que leur teneur en DNA après 6 jours de culture s'est avérée être 2 fois plus importante que celle de bourgeons d'âge équivalent cultivés dans le milieu chimiquement défini utilisé initialement.

## **B - Protocole expérimental**

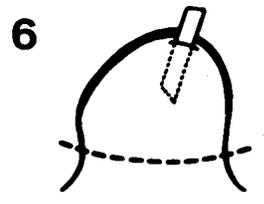
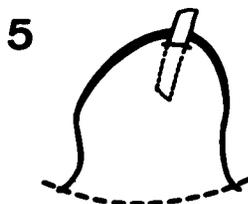
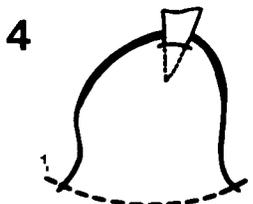
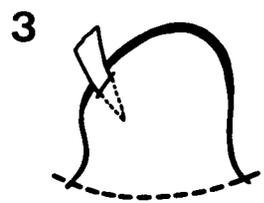
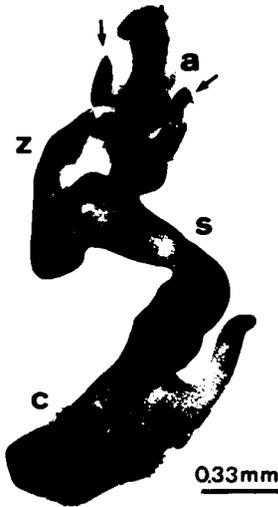
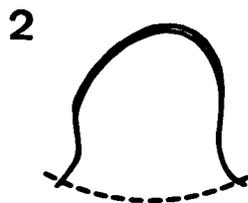
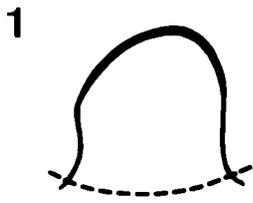
Des bourgeons de membres antérieurs provenant d'embryons comptant 40 à 44 paires de somites ont été disséqués au niveau de leur insertion sur le flanc de l'embryon ou au milieu de leur pédoncule proximal. Dans certaines séries expérimentales, juste avant le prélèvement, des implants de membrane de filtration, de papier lentille ou de catgut ont été introduits à l'apex du bourgeon de manière à assurer une relation entre le milieu externe et le milieu interne à travers la couverture épithéliale. Les bourgeons ont été mis en culture selon le procédé de TROWELL (1954). Plusieurs milieux ont été utilisés isolément ou successivement (voir Matériel et Méthodes). Après 6 jours de culture, les échantillons ont été fixés au Bouin, lavés et colorés au bleu Alcian (pH1). Les squelettes cartilagineux ont été mis en évidence par éclaircissement dans un mélange de benzoate de benzyle et de salicylate de méthyle. Pour les dosages de DNA, des bourgeons antérieurs ont été disséqués au niveau de leur pédoncule proximal et mis en culture selon 4 protocoles correspondant aux principales étapes de notre démarche. A l'issue de la culture ( 6 jours ), leur teneur en DNA a été estimée par la technique de BRUNK et al (1979).

## **C - Résultats**

### **1) Analyse morphologique**

#### **a) Cultures de bourgeons entiers dans le milieu chimiquement défini "BGJ de base".**

Ce milieu a été utilisé pendant toute la durée de la culture. Les bourgeons disséqués au niveau du flanc de chaque embryon présentent une bonne morphogenèse proximale dans tous les cas exploités dans cette partie de notre travail (23 bourgeons) : la ceinture, le stylopode et le zeugopode sont parfaitement reconnaissables bien que le radius soit souvent court. Le squelette autopodial fait défaut : il est remplacé par plusieurs nodules cartilagineux qui ne peuvent être, en aucun cas, assimilés à des métacarpiens (Pl. XVIII, Fig. 1).



b) Cultures de bourgeons entiers dans les milieux enrichis par du sérum de veau foetal.

Afin de favoriser la croissance distale des bourgeons, du sérum de veau foetal, connu pour faciliter la prolifération cellulaire, a été introduit dans 2 milieux utilisés successivement : le "MEM de base" pendant les 3 premiers jours et le "BGJ modifié" pendant les 3 derniers jours. Dans ces conditions, les prestations fournies du côté proximal sont équivalentes à celles décrites précédemment mais des métacarpiens fusionnés se forment dans plus de 60% des 19 explants étudiés (Pl. XVIII, Fig. 2).

c) Cultures de bourgeons entiers avec implantation apicale dans les milieux enrichis par du sérum de veau foetal.

Pour faciliter l'accès du milieu au coeur de la palette autopodiale, de petites pièces de membrane Millipore, de papier lentille ou de catgut ont été introduites dans l'apex des bourgeons. Des pièces triangulaires de filtre Millipore implantées transversalement sur le bord préaxial de 16 palettes juste sous l'extrémité antérieure de la crête apicale, loin d'améliorer les prestations, ont déterminé la désorganisation totale du squelette cartilagineux dans 75 % des cas. Dans les autres cas, les pièces proximales sont présentes mais l'autopode est très réduit (Pl. XVIII, Fig. 3). Des morceaux de papier lentille ont aussi été implantés dans la même région ou distalement (16 échantillons). 19% des bourgeons ainsi obtenus ont fourni des prestations médiocres constituées de nodules non identifiables, 81% ont mis en place un squelette proximal organisé avec dans quelques cas des pièces squelettiques hypertrophiées en regard du greffon de papier. Parmi ces bourgeons, 23% ont développé un seul métacarpien axial. Dans de très rares cas (12%), ces implantations de papier lentille ont conduit à l'élaboration de rayons digitaux mais des fusions entre les métacarpiens altèrent la qualité des prestations (Pl. XVIII, Fig. 4). L'implantation de morceaux de catgut à l'apex du bourgeon juste sous la crête apicale et dans l'axe proximo-distal des bourgeons (Pl. XVIII, Fig. 5) nous a permis d'obtenir les meilleurs résultats : des autopodes rayonnés apparaissent dans 82% des 17 échantillons étudiés. Des phalanges sont même observées dans quelques cas. Lorsque le morceau de catgut est implanté distalement dans l'axe dorso-ventral (7 bourgeons), des rayons digitaux apparaissent dans 70% des cas, mais les éléments du zeugopode sont absents ou très déformés.

d) Cultures de bourgeons avec implants de catgut dans des milieux enrichis en sérum de veau foetal et en facteurs de croissance.

En utilisant les derniers artifices expérimentaux décrits ci-dessus, les bourgeons présentent

une morphogenèse autopodiale intéressante mais le développement des segments intermédiaires et notamment celui du zeugopode reste limité. Des facteurs de croissance ont donc été ajoutés au milieu MEM qui sert à la mise en culture et dans lequel séjournent les explants pendant les 3 premiers jours. Après avoir reçu un implant de catgut introduit dans l'axe proximo-distal, les bourgeons ont été disséqués à un niveau un peu plus distal de manière à éliminer au moins le territoire présomptif de la ceinture. Dans ces conditions, l'omoplate n'apparaît dans aucun des explants et 90% des bourgeons (20 cas) mettent en place au moins 4 rayons digitaux individualisés. Des phalanges apparaissent fusionnées à l'extrémité distale des métacarpiens III et IV situés de chaque côté de l'implant (60% des cas). La taille des éléments squelettiques autopodiaux est considérablement augmentée, le radius, le cubitus et la partie distale de l'humérus se déploient et s'allongent (Pl. XVIII, Fig. 6). Si les bourgeons sont mis en culture dans les mêmes milieux mais sans implants de catgut, les métacarpiens formés sont petits et surtout sont fusionnés.

En conclusion, les meilleurs résultats morphologiques ont été obtenus en employant des milieux enrichis en sérum de veau foetal et en facteurs de croissance, en facilitant les apports nutritifs dans l'apex des bourgeons par des implants de catgut. Une dissection au niveau du pédoncule du bourgeon améliore l'allongement des segments proximaux et intermédiaires.

## 2) Analyse de la teneur en DNA

Pour cette étude, les bourgeons ont tous été disséqués au niveau de leur pédoncule, mais ils ont été soumis à 4 conditions de culture différentes :

- a) culture pendant 6 jours en milieu chimiquement défini : "BGJ de base"
- b) culture pendant 3 jours dans le "MEM de base" puis pendant 3 jours dans le "BGJ modifié", c'est-à-dire 2 milieux enrichis en sérum de veau foetal.
- c) culture pendant 3 jours dans le "MEM modifié" puis pendant 3 jours dans le "BGJ modifié", c'est-à-dire le MEM enrichi en sérum de veau foetal et en facteurs de croissance et le BGJ enrichi en sérum de veau foetal.
- d) culture dans les mêmes conditions que c) mais après implantation d'un morceau de catgut.

Les résultats illustrés dans le Tableau 13 montrent la croissance réduite des bourgeons dans le "BGJ de base" (a) si on compare les valeurs obtenues à celles des cultures en milieux enrichis en sérum (b, c, d). L'adjonction de facteurs de croissance dans le MEM stimule fortement cette croissance (c, d). L'implantation de morceaux de catgut donne la meilleure valeur moyenne de contenu en DNA bien que la différence entre bourgeons implantés et non implantés ne soit pas statistiquement significative.

TABLEAU 13 : Comparaison des teneurs en DNA des bourgeons de membres cultivés selon 4 protocoles expérimentaux différents.

	a	b	c	d
Teneur en DNA par bourgeon de membre (en $\mu\text{g}$ )	$1,98 \pm 0,27$	$2,97 \pm 0,63$	$3,85 \pm 0,58$	$4,38 \pm 0,94$
n	16	10	12	10
Analyse Statistique	b, c, d comparées avec a	$P < 0,01$	$P < 0,01$	$P < 0,01$
Analyse Statistique		c, d comparées avec b	$P < 0,01$	$P < 0,01$
Analyse Statistique			d comparée avec c	$0,1 < P < 0,2$ NS

a) culture pendant 6 jours dans le "BGJ de base"

b) culture pendant 3 jours dans le "MEM de base" puis pendant 3 jours dans le "BGJ modifié"

c) culture pendant 3 jours dans le "MEM modifié" puis pendant 3 jours dans le "BGJ modifié"

d) culture après implantation de catgut pendant 3 jours dans le "MEM modifié" puis pendant 3 jours dans le "BGJ modifié"

n : nombre d'explants dans chaque série

Analyse statistique : le test de Student a été utilisé pour comparer les valeurs moyennes de DNA. N.S. : non significatif.



La confrontation de ces résultats avec les données fournies par l'étude morphologique confirme que la prolifération des cellules semble être une étape préliminaire indispensable pour obtenir une bonne morphogenèse squelettique dans les bourgeons entiers.

## D - Discussion

Les étapes successives que nous venons de décrire mettent particulièrement en relief les effets des conditions de culture sur la prolifération des cellules mésodermiques et leur différenciation ultérieure. Nos résultats montrent que l'emploi des milieux enrichis en sérum de veau foetal et en facteurs de croissance ainsi que l'implantation d'un morceau de catgut à l'apex de chaque bourgeon sont des conditions qui permettent d'améliorer considérablement la qualité des prestations fournies par les ébauches de membres antérieurs de stade 18 : des autopodes rayonnés comportant des métacarpiens et parfois des phalanges sont mis en place, les fusions et la syndactylie communément décrites avant l'utilisation de ces modifications deviennent rares. Corrélativement, la teneur en DNA des explants obtenus par cette nouvelle méthode est deux fois plus élevée que celle des explants obtenus par le protocole original. Croissance apicale et morphogenèse distale paraissent donc être deux phénomènes indissociables.

Quand le BGJ est utilisé seul, des prestations comportant l'autopode rayonné ne sont obtenues qu'avec des bourgeons plus âgés dont la palette présente des zones de condensation cellulaire (blastèmes préchondrogènes) au moment du prélèvement (MILAIRE et MULNARD, 1984). Ce résultat est en accord avec une étude menée sur des cultures cellulaires dérivées de mésoderme de bourgeons de membres de poulet dans ce milieu chimiquement défini (KARASAWA et al, 1979). Les auteurs ont montré que l'agrégation des cellules est un facteur essentiel pour obtenir la chondrogenèse et que les cellules ne survivent pas si elles sont cultivées à faible densité dans le milieu BGJ. Or, un tissu mésodermique lâche occupe l'apex des bourgeons de membres de souris que nous avons utilisés (stade 18). Ce mésoderme ainsi que la crête apicale sont préférentiellement touchés par une vague de dégénérescence dans les cultures de bourgeons entiers dans le BGJ (MILAIRE et MULNARD, 1984).

Il est maintenant bien établi que la crête apicale ectodermique favorise la prolifération du mésoderme sous-jacent (voir la revue de SOLURSH, 1984). En plus de son action stimulatrice sur les cellules mésodermiques (voir la revue de KAPLOWITZ et al, 1982), le facteur de croissance épidermique, qui induit la synthèse de DNA dans les cellules basales d'épiderme de souris (KATOH et al, 1985), pourrait très bien entretenir la survie de l'enveloppe ectodermique et plus spécialement de la crête apicale. En retour, une crête apicale saine permet une meilleure croissance dans le mésoderme apical. *In vitro*, l'insuline est un facteur essentiel pour la prolifération des cellules de blastèmes de régénération chez les Amphibiens (VETHAMANY-GLOBUS et al, 1978 ; LASSALLE et ROUSSEAU, 1983 ; VETHAMANY-GLOBUS et al, 1984) et stimule la multiplication des cellules mésodermiques de bourgeons de membres de souris (KAPLOWITZ et al, 1982). Quant au BGJ conditionné, selon KAPLOWITZ et al (1982), il n'est pas actif en lui-même mais potentialise l'effet de l'EGF et de l'insuline. Son principe actif ne semble pas être de la famille

des somatomédines, il pourrait s'agir d'un nouveau facteur de croissance peptidique que ces auteurs essaient de caractériser actuellement.

Quoi qu'il en soit, quand l'EGF est employé en combinaison avec l'insuline et le BGF conditionné, la croissance volumétrique de la palette autopodiale est considérablement stimulée ; dans ces conditions, les condensations cellulaires artéfactuelles dans des palettes trop exigües qui, selon MILAIRE et MULNARD (1984), pourraient expliquer le phénomène de syndactylie, n'apparaissent plus. Si les fusions des rayons digitaux dans l'axe antéro-postérieur disparaissent après insertion d'un implant de catgut, il faut déplorer toutefois la coalescence fréquente entre les métacarpiens et la première rangée de phalange. Il est possible que l'implant agisse de façon mécanique pour empêcher les fusions transversales mais qu'une croissance distale encore insuffisante soit à l'origine des fusions proximo-distales observées. L'association de facteurs de croissance et de milieu conditionné stimule la croissance des cultures en micromasses établies à partir de cellules indifférenciées prélevées sur des bourgeons de membres embryonnaires de souris : dans les meilleurs cas, avec en supplément du facteur de croissance fibroblastique (FGF) et après 3 jours *in vitro* le nombre des cellules est deux fois plus élevé que dans les cultures témoins obtenues sans additifs dans le milieu (KAPLOWITZ et al, 1982). Nos mesures de la teneur en DNA sont en accord avec ces données mais, *in vivo* et selon ces mêmes auteurs, le nombre des cellules du bourgeon de membre augmente 5 fois entre le jour 11 et le jour 13. Les améliorations apportées au système de culture ne suffisent donc pas à reproduire entièrement la croissance intra-utérine. BELL et Mc LACHLAN (1985) et BELL (1986) ont montré que les cellules de régions spécifiques du bourgeon de membre embryonnaire de poulet synthétisent et secrètent des agents mitogènes qui ressemblent et fonctionnent comme d'autres facteurs de croissance déjà caractérisés. Dans nos conditions de cultures, nous ignorons si de tels agents sont produits et, si c'est le cas, si ces agents peuvent fonctionner en synergie avec ceux que nous introduisons dans le milieu de culture.

D'autre part, il est possible que les besoins en gaz ne soient pas complètement satisfaits. MILAIRE et MULNARD (1984) ont préconisé une augmentation de la concentration en oxygène. Pour ces auteurs, les prestations fournies par les bourgeons sont améliorées si l'incubateur contient 50% d'oxygène. PRATT et al (1984) et NAKASHIMA et FUJIKI (1987) ont utilisé des mélanges gazeux contenant jusqu'à 95% d'oxygène pour des cultures d'embryons entiers de 10 et 11 jours. Le développement global des embryons est alors comparable au développement *in utero*, de plus, les embryons obtenus *in vitro* après 24 ou 48 heures de culture présentent une organogenèse des membres excellente comme en témoignent les illustrations publiées.

Nos estimations de la teneur en DNA montrent qu'une bonne prolifération suit l'administration des facteurs de croissance. Mais les prestations morphogénétiques les plus complètes sont observées dans les bourgeons qui ont reçu un implant de catgut. Les membranes de filtration ou le papier lentille sont rapidement envahis par des prolongements cellulaires et en

conséquence deviennent rapidement inefficaces dans leur rôle de transporteurs d'éléments nutritifs. Le diamètre réduit du catgut et sa rigidité en font un matériel facile à introduire dans l'apex des bourgeons. Le catgut semble neutre vis-à-vis de la chondrogenèse : des implants de ce matériel réalisés dans des apex de bourgeons postérieurs de stade 18 préalablement dénudés et donc hautement chondrogènes n'ont ni altéré, ni retardé la différenciation cartilagineuse. Ce catgut peut transporter le milieu à l'intérieur de la palette autopodiale où des dégénérescences cellulaires ont été observées (MILAIRE et MULNARD, 1984) et, de ce fait, favoriser la prolifération des cellules distales. La largeur de la palette s'en trouve augmentée et par la suite, des métacarpiens de grande taille et, dans certains cas, des phalanges se forment.

En conclusion, si le BGJ employé seul en tant que milieu chimiquement défini permet d'éviter les métabolismes cellulaires inévitables consécutifs à l'apport d'enzymes, d'hormones, de diverses substances actives de nature peptidique ou protéique... dans un milieu conditionné ou enrichi en sérum, il ne peut que promouvoir la différenciation de cellules déjà engagées dans la voie de la chondrogenèse. A ce titre, il constitue un choix intéressant dans l'étude de certains mécanismes de la différenciation cartilagineuse mais, *in vitro*, l'établissement d'un patron de morphogenèse squelettique à partir de cellules encore indifférenciées requiert d'autres conditions. Nos résultats semblent démontrer que certains facteurs peuvent être efficaces pour parfaire la morphogenèse du bourgeon de membre de souris *in vitro* qui devient ainsi un modèle plus favorable à la mise en oeuvre de nouvelles études expérimentales.

## II. - ACIDE RETINOIQUE ET MORPHOGENESE SQUELETTIQUE

### A - Introduction

La technique que nous venons de décrire permet d'aborder l'étude de l'action de certaines substances administrées aux bourgeons de membres *in vitro*. Nous avons choisi d'étudier les effets de la vitamine A, molécule appartenant à la famille des rétinoïdes. Chez les Mammifères, cette molécule est surtout connue pour ses effets tératogènes : tout comme la cytosine arabinoside, elle produit des malformations au niveau des membres embryonnaires et des corrélations étroites entre le moment du traitement et les segments atteints ont pu être mises en évidence tant au niveau du membre antérieur qu'au niveau du membre postérieur, que la drogue soit administrée *in vivo* ou *in vitro* (KOCHHAR, 1967 - 1973 ; KOCHHAR et AYDELOTTE, 1974 ; NAKAMURA, 1977 ; KWASIGROCH et KOCHHAR, 1980 ; KISTLER, 1981 ; KWASIGROCH et SKALKO, 1983 ; KWASIGROCH et al, 1984).

Parallèlement aux recherches sur les Mammifères, des travaux concernant les Amphibiens et les Oiseaux ont été entrepris. Alors que, pour les Mammifères, l'effet de la vitamine A sur la morphogenèse du membre aboutit à une inhibition de la différenciation cartilagineuse entraînant des malformations réductrices (phocomélie et micromélie), des duplications proximo-distales et transversales ont pu être mises en évidence dans certaines conditions au cours de la régénération du membre d'Amphibiens anoures et urodèles. Le membre postérieur de têtard d'anoure, amputé au niveau de la partie distale du zeugopode, puis traité par les rétinoïdes pendant les phases de dédifférenciation ou de formation du blastème régénère en donnant un membre anormalement allongé dont les segments proximaux sont dupliqués (NIAZI et SAXENA, 1978 ; JANGIR et NIAZI, 1978 ; MADEN, 1989a ; NIAZI et ALAM, 1984 ; NIAZI et RATNASAMY, 1984). Mais, comme chez la souris, un traitement plus tardif effectué au début de la phase de chondrogenèse inhibe la morphogenèse. Les membres antérieurs ou postérieurs d'urodèles amputés au niveau du zeugopode et traités de façon équivalente pendant les mêmes phases de dédifférenciation ou de constitution du blastème régénèrent eux aussi sous la forme de membres dupliqués dans l'axe proximo-distal (MADEN, 1982 ; 1983b ; THOMS et STOCUM, 1984 ; NIAZI et al, 1985 ; KIM et STOCUM, 1986 ; LHEUREUX et al, 1986). Il faut signaler que des duplications transversales (dans l'axe antéro-postérieur ou dorso-ventral) ont été décrites chez toutes les espèces d'Amphibiens étudiées. La régénération des membres de jeunes larves se traduit par la genèse de membres dupliqués transversalement tandis que la régénération de membres de larves plus âgées conduit à des membres simples à duplication proximo-distale (LHEUREUX et al, 1986).

Toutefois, une série de travaux réalisés par SCADDING et MADEN (1986 a-b) montre que les effets de la vitamine A sont très différents d'une part, sur le membre au cours de sa

morphogenèse embryonnaire et d'autre part, sur le membre au cours d'une morphogenèse régénératrice : les duplications décrites précédemment ne surviennent pas si le jeune bourgeon n'est pas amputé. Les bourgeons traités se développent mal et leurs squelettes sont affectés d'importantes délétions. Des applications locales d'acide rétinoïque ne déterminent pas de duplications proximo-distales mais des réductions squelettiques et éventuellement des duplications antéro-postérieures (MADEN et al, 1985 ; SCADDING et MADEN, 1986c). De même, des applications locales d'acide rétinoïque effectuées sur le bord préaxial de bourgeons alaires d'Oiseau (TICKLE et al, 1982 ; SUMMERBELL, 1983 ; SUMMERBELL et HARVEY, 1983 ; EICHELE et al, 1984 ; 1985 ; LEE et TICKLE, 1985 ; TICKLE et al, 1985) favorisent l'apparition de duplications dans l'axe antéro-postérieur. La réponse du bourgeon au traitement dépend de la dose appliquée et du stade de développement (SUMMERBELL, 1983 ; TICKLE et al, 1985).

Outre leurs effets térogènes, les rétinoïdes semblent donc capables de provoquer des changements de valeur de position qui déterminent des duplications dans l'axe proximo-distal associées ou non à des duplications dans les axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Plusieurs paramètres semblent moduler cette action :

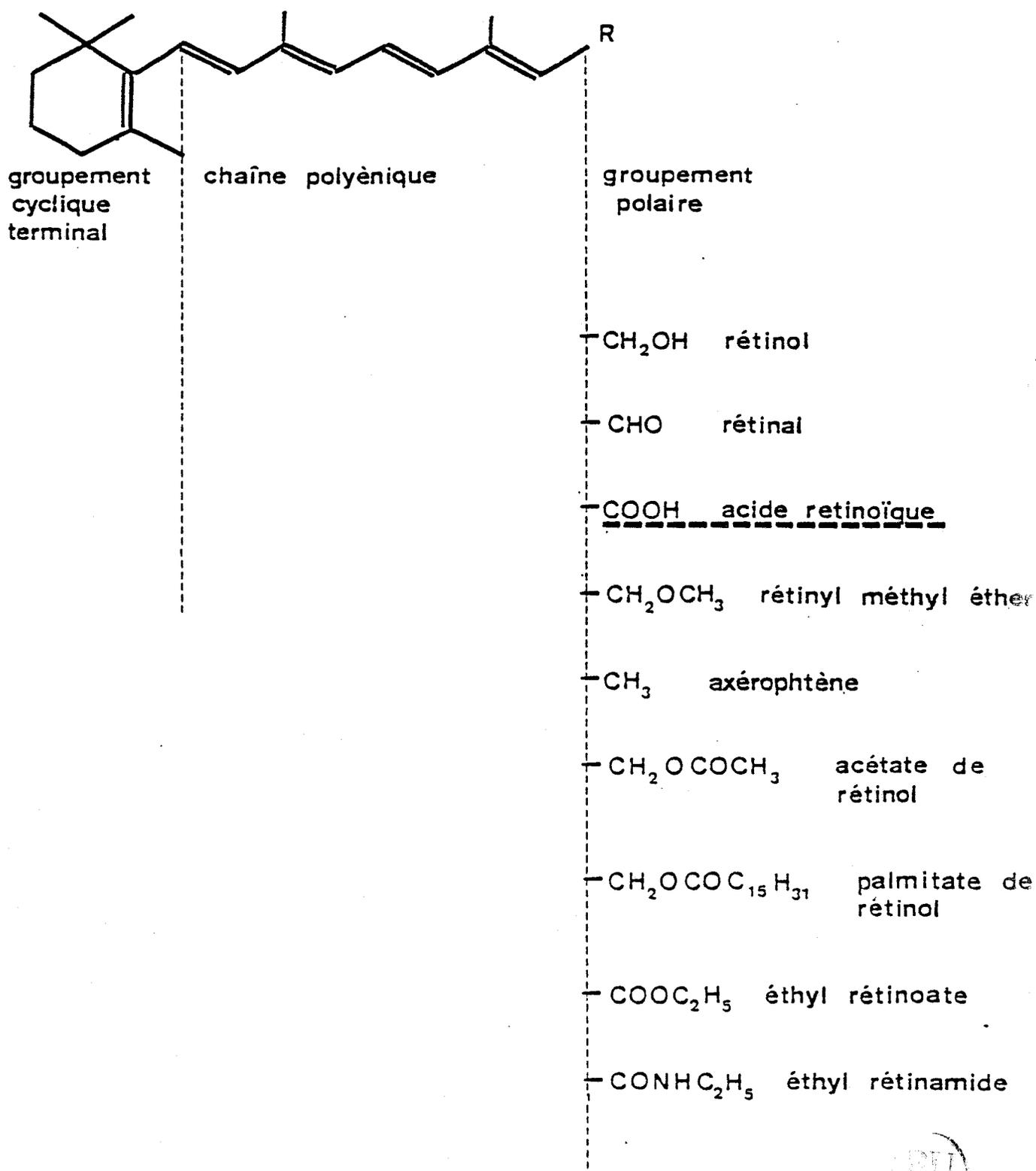
- la réceptivité variable des espèces animales soumises à l'expérimentation,
- le type de molécule utilisé (il existe de nombreux dérivés dans la famille des rétinoïdes), et sa concentration,
- le mode d'administration de cette molécule,
- la durée d'administration et le moment où elle est pratiquée.

Dans cette partie de notre travail, nous avons essayé de cerner les conséquences de l'administration d'un des dérivés de la vitamine A à des bourgeons de membres de souris en limitant toutefois le champs des investigations :

- les bourgeons ont été prélevés aux stades 17 et 18 et ont donc une morphologie assez comparable à celle de bourgeons alaires d'Oiseau de stades 21 à 23 (Pl. IV) qui réagissent aux rétinoïdes,
- seul l'acide rétinoïque (all-trans retinoic acid, Sigma) a été utilisé (Pl. XIX),
- cette molécule a été administrée localement par insertion apicale de pièces de catgut imprégnées du produit solubilisé dans le DMSO,
- l'implant de catgut a été introduit dès le prélèvement des bourgeons et a été laissé en place jusqu'à la fin de la culture.

Dans ces conditions, nous avons étudié, dans un premier temps, l'influence de plusieurs doses d'acide rétinoïque sur la morphogenèse squelettique de bourgeons de membres antérieurs

PLANCHE XIX : Structure de divers rétinoïdes



parvenus au stade 18, puis cette même influence sur des bourgeons antérieurs plus jeunes, beaucoup plus fragiles *in vitro* prélevés au stade 17. Les résultats de notre étude morphologique semblent indiquer que l'acide rétinoïque, à faible concentration, augmente la quantité de cartilage formée dans les bourgeons prélevés et traités dès le stade 18 tandis que des doses fortes sont hautement tératogènes. En aucun cas, nous n'avons observé la formation d'éléments squelettiques surnuméraires. Le traitement des bourgeons de stade 17 confirme l'effet tératogène de l'acide rétinoïque à forte concentration, mais l'effet stimulateur de la chondrogenèse n'est pas perceptible par ce type d'analyse. Aucune formation surnuméraire n'a été détectée. L'étude quantitative réalisée sur les mêmes explants par analyse d'images permet de mettre en évidence l'effet stimulateur et l'effet tératogène aux 2 stades étudiés. La confrontation des données fournies par l'étude morphologique et l'étude quantitative suggère l'existence d'une phase charnière où l'acide rétinoïque, tout en stimulant la différenciation des chondrocytes, est capable de désorganiser complètement le patron squelettique.

## **B - Protocole expérimental**



### **1) Bourgeons antérieurs de stade 18**

Ces bourgeons sont disséqués selon une ligne passant par le milieu de leur pédoncule. Les fragments de catgut calibrés sont implantés à l'apex du bourgeon dans l'axe proximo-distal après avoir été imprégnés pendant 1 nuit dans du DMSO ou dans des solutions d'acide rétinoïque (dans le DMSO) aux concentrations suivantes : 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 500 µg/ml, et 5 mg/ml. Les bourgeons témoins et traités sont ensuite mis en culture selon la technique décrite précédemment dans du milieu "MEM modifié" pendant 3 jours puis dans du "BGJ modifié" pendant 3 jours. A l'issue de la culture, ils sont fixés, lavés, colorés au bleu Alcian et traités pour une étude morphologique.

### **2) Bourgeons antérieurs de stade 17**

Nous avons explanté des bourgeons entiers. Compte tenu de la taille réduite de ces explants et afin de préserver au maximum les chances de développement *in vitro*, le catgut implanté à l'apex des bourgeons a vu son diamètre réduit de moitié par une incision longitudinale. Cette opération diminue le risque d'éclatement du bourgeon au moment de l'implantation mais aussi réduit la charge en DMSO ou en acide rétinoïque. Par ailleurs, les fragments de catgut n'ont été imprégnés que pendant 6 heures dans des solutions "vieilles" d'acide rétinoïque (4 mois) dont l'efficacité est nettement atténuée (THOMS, communication personnelle). Les doses de 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200

$\mu\text{g/ml}$ ,  $500 \mu\text{g/ml}$ ,  $1 \text{ mg/ml}$  et  $5 \text{ mg/ml}$  ont été utilisées. La technique de culture et le traitement des résultats sont en tous points comparables à ce qui a été décrit précédemment.

### 3) Analyse d'images

La surface des explants ainsi que la surface occupée par les éléments cartilagineux ont été estimées par l'analyseur d'images SAMBA 200 (THOMSON-TITN), dans des bourgeons témoins ayant reçu un implant de catgut, dans des bourgeons ayant reçu un implant de catgut imprégné de DMSO ou d'acide rétinoïque en solution dans le DMSO. Ces mesures qui ne rendent pas compte du développement volumétrique réel des éléments squelettiques constituent néanmoins une source d'information très intéressante.

## C - Résultats

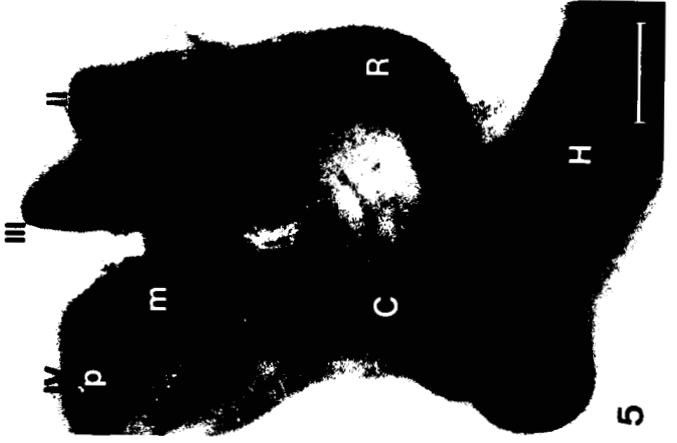
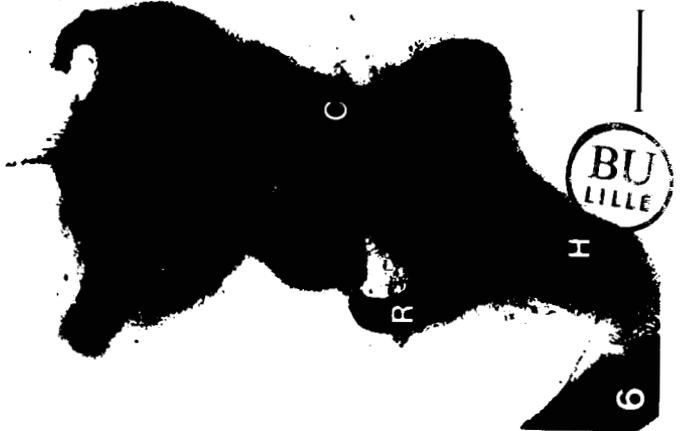
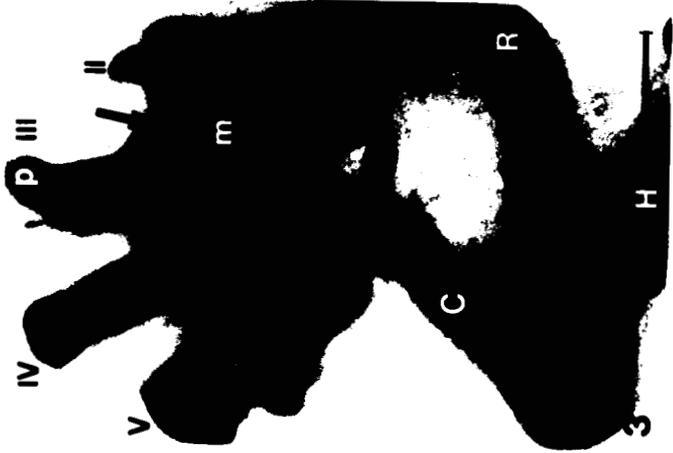
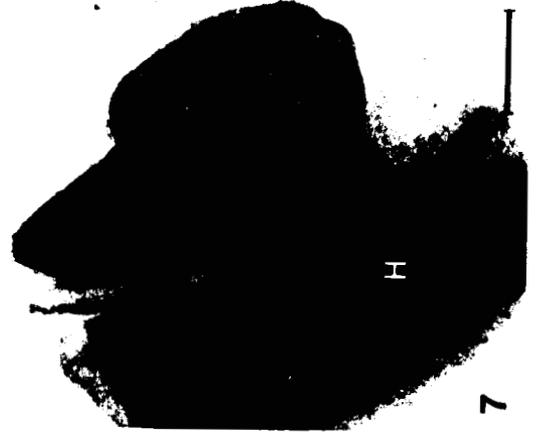
### 1) Bourgeons antérieurs de stade 18

#### a) Etude morphologique

20 bourgeons traités par le DMSO ont été analysés. La plupart paraissent plus petits que les témoins mais tous ont mis en place un stylo-pode et un zeugopode bien individualisés. 14 bourgeons (70%) présentent un autopode rayonné (Pl. XX, Fig. 2) comparable à celui de bourgeons ayant reçu un implant de catgut non imprégné (Pl. XX, Fig. 1), 2 ne présentent qu'un rayon unique flanqué de plusieurs nodules non identifiables, tandis que les 4 derniers sont démunis d'autopode.

L'administration d'acide rétinoïque à la dose de  $50 \mu\text{g/ml}$  (16 cas) ne semble pas avoir d'effet sur la mise en place du squelette proximal qui apparaît comparable à celui des 2 types de témoins. De plus, tous les bourgeons présentent un autopode comportant au moins 4 rayons digitaux. Dans 11 cas (70%), la partie proximale des métacarpiens est hypertrophiée et on assiste, de part et d'autre de l'implant, à des fusions à la base des rayons digitaux (Pl. XX, Fig. 3). Lorsque le rayon I est formé, il apparaît nettement individualisé et très développé (Pl. XX, Fig. 4).

Lorsque les implants de catgut ont été imprégnés d'une solution d'acide rétinoïque à  $100 \mu\text{g/ml}$  de DMSO (20 bourgeons), les autopodes obtenus présentent des rayons digitaux individualisés comparables à ceux des témoins dans 75% des cas (Pl. XX, Fig. 5). Dans les autres cas, l'autopode est formé de nodules non identifiables. Le zeugopode et le stylo-pode paraissent normaux.



Une dose deux fois plus forte (200  $\mu\text{g/ml}$ ) ne semble pas modifier le devenir des 14 bourgeons analysés qui mettent en place des squelettes comparables à ceux des bourgeons traités avec 100  $\mu\text{g/ml}$ .

12 bourgeons ont subi l'implantation d'un fragment de catgut imprégné d'une solution d'acide rétinoïque à 300  $\mu\text{g/ml}$ . Dans ces conditions, la disposition rayonnée des autopodes ne subsiste que dans 50% des cas. Les autres explants présentent plusieurs nodules distaux dont certains ont fusionné (Pl. XX, Fig. 6). Que l'autopode soit rayonné ou non, on note une altération sensible de la qualité de la prestation fournie au niveau du zeugopode souvent très déformé et même absent dans 3 cas.

L'effet tératogène de l'acide rétinoïque se manifeste nettement lorsque cet agent est administré à la dose de 500  $\mu\text{g/ml}$ . Seuls 2 explants sur 14 ont mis en place des pièces squelettiques rappelant les segments proximaux du membre (Pl. XX, Fig. 7). Les autres bourgeons traités contiennent des nodules généralement allongés mais ne pouvant en aucun cas être assimilés à des éléments squelettiques.

Les explants ayant reçu un fragment de catgut imprégné d'une solution d'acide rétinoïque à 5 mg/ml (11 échantillons) ne se sont pas développés *in vitro* et aucune trace de chondrogenèse n'a pu y être mise en évidence (Pl. XX, Fig. 8).

Ces résultats montrent donc que, selon la dose employée, l'acide rétinoïque peut favoriser ou inhiber la chondrogenèse dans le bourgeon de membre de mammifère. Mais le protocole expérimental employé ne permet pas de mettre en évidence le rôle morphogénétique particulier décrit chez les Amphibiens et les Oiseaux.

#### b) Etude quantitative.

Les résultats rassemblés dans le tableau 14 mettent en évidence un effet néfaste du DMSO sur la croissance générale des explants et la chondrogenèse qui s'y déroule. Les doses faibles d'acide rétinoïque utilisées (50  $\mu\text{g}$ , 200  $\mu\text{g}$ , 300  $\mu\text{g/ml}$  de DMSO) permettent de compenser cet effet toxique : les bourgeons traités ont une croissance qui dépasse même en moyenne celle des explants témoins non traités. On notera toutefois 2 points particuliers : les fusions qui surviennent au niveau des autopodes de bourgeons traités avec 50  $\mu\text{g}$  d'acide rétinoïque/ml de DMSO ne sont pas détectées de façon significative par nos mesures. D'autre part, les anomalies squelettiques observées après administration d'acide rétinoïque à la dose de 300  $\mu\text{g/ml}$  ne sont pas liées à une altération de la quantité globale de cartilage formée dans ces explants. Les doses plus fortes analysées (500  $\mu\text{g}$  et 5 mg/ml de DMSO) ont un effet défavorable très net sur la croissance générale des explants ainsi que sur la mise en place des éléments squelettiques cartilagineux.

Les données fournies par l'analyse d'image corroborent donc en grande partie les observations macroscopiques décrites précédemment : effet stimulateur sur la croissance et la chondrogenèse des faibles doses d'acide rétinolique en dépit d'un effet néfaste du solvant utilisé, effet inhibiteur des doses les plus fortes.

TABLEAU 14 : Analyse des prestations fournies par les bourgeons de stade 18 témoins et traités par le DMSO ou différentes doses d'acide rétinolique.

	Témoins n = 11	Traités DMSO n = 10	A.R. 50 µg/ml DMSO n = 10	A.R. 200 µg/ml DMSO n = 10	A.R. 300 µg/ml DMSO n = 10	A.R. 500 µg/ml DMSO n = 10	A.R. 5 mg/ml DMSO n = 10
Surface totale des explants (en mm <sup>2</sup> )	2,04 ± 0,26	• 1,65 ± 0,37	•• 2,48 ± 0,24 **	NS 2,08 ± 0,29 *	NS 2,23 ± 0,19 **	•• 1,37 ± 0,31 NS	•• 0,44 ± 0,28 **
Surface occupée par le cartilage (en mm <sup>2</sup> )	1,19 ± 0,11	•• 0,86 ± 0,26	NS 1,24 ± 0,19 **	NS 1,02 ± 0,24 NS	• 1,32 ± 0,13 **	•• 0,48 ± 0,13 **	•• 0 **

TABLEAU 15 : Analyse des prestations fournies par les bourgeons de stade 17 témoins et traités par le DMSO ou différentes doses d'acide rétinolique

	Témoins n = 10	Traités DMSO n = 10	A.R. 50 µg/ml DMSO n = 10	A.R. 200 µg/ml DMSO n = 10	A.R. 1 mg/ml DMSO n = 10
Surface totale des explants (en mm <sup>2</sup> )	2,24 ± 0,39	NS 2,09 ± 0,39	NS 2,48 ± 0,45 NS	NS 2,63 ± 0,43 *	NS 2,14 ± 0,44 NS
Surface occupée par le cartilage (en mm <sup>2</sup> )	1,17 ± 0,2	NS 1,01 ± 0,23	NS 1,29 ± 0,23 *	•• 1,45 ± 0,21 **	NS 1,03 ± 0,22 NS



A.R. : acide rétinolique

n : nombre d'explants de chaque série soumis à l'analyse d'image.

Le test t de Student est calculé pour comparer les valeurs obtenues à la suite de chaque traitement avec celles des témoins non traités (• = P<0,05 ; •• = P<0,01) ou les valeurs obtenues après traitement à l'acide rétinolique avec celles des bourgeons traités au DMSO (\* = P<0,05 ; \*\* = P<0,01)

NS : différence non significative

## 2) Bourgeons antérieurs de stade 17

### a) Etude morphologique

La technique que nous avons préconisée pour le développement *in vitro* de bourgeons de stade 18 a été utilisée pour des bourgeons plus jeunes prélevés complets au stade 17. Dans ces conditions, 87% des 30 échantillons analysés ont mis en place une ceinture, un stylopede et un zeugopode bien reconnaissables. Dans 13 cas, on a observé plusieurs nodules au niveau de la palette autopodiale, parmi ces bourgeons, 6 échantillons présentent une disposition rayonnée des nodules de part et d'autre de l'implant de catgut (Pl. XXI, Fig. 1). Il faut signaler que ces palettes sont larges et légèrement échancrées au niveau de l'insertion de l'implant de catgut comme si l'apex du bourgeon avait été ouvert par l'opération.

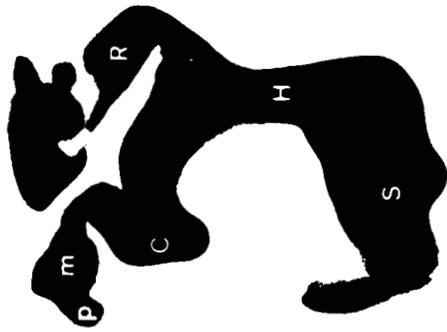
Les bourgeons ayant reçu un implant de catgut imprégné de DMSO (20 cas) ont fourni des prestations très variables : 3 seulement présentent un autopode rayonné rudimentaire à l'extrémité de segments proximaux et intermédiaires conformes à ceux des témoins (Pl. XXI, Fig. 2), 5 ont un squelette dépourvu d'autopode organisé, 7 subissent d'importantes altérations au niveau du zeugopode. Quant aux 5 derniers, ils ne présentent que de petits nodules non identifiables.

L'acide rétinoïque administré à la dose de 50  $\mu\text{g/ml}$  ne semble pas avoir d'action sensible sur le devenir des bourgeons de stade 17. 9 bourgeons sur 14 ont formé un squelette comportant les différents segments y compris l'autopode représenté, le plus souvent, par plusieurs nodules difficilement identifiables (Pl. XXI, Fig. 3). La chondrogenèse ne semble pas inhibée dans les autres bourgeons mais les pièces cartilagineuses mises en place ne sont pas reconnaissables.

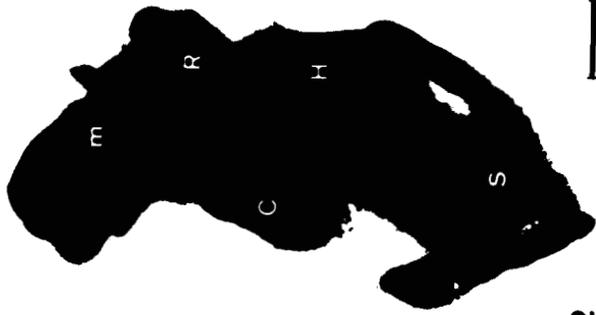
Après administration d'acide rétinoïque aux doses de 100 et 200  $\mu\text{g/ml}$  (11 et 13 bourgeons respectivement), la plupart des squelettes sont déformés : seuls la ceinture et le stylopede sont encore identifiables. Exceptionnellement, des éléments autopodiaux reconnaissables sont formés (2 cas) (Pl. XXI, Figs. 4-5) mais le plus souvent des pièces cartilagineuses de taille importante et aux formes tourmentées occupent l'ensemble des explants.

Parmi les 9 bourgeons traités par l'acide rétinoïque à la dose de 500  $\mu\text{g/ml}$ , on observe 3 explants n'ayant formé que de gros nodules cartilagineux arrondis. Les autres ressemblent beaucoup aux bourgeons traités par des doses de 100 et 200  $\mu\text{g/ml}$  (Pl. XXI, Fig. 6).

Les bourgeons ayant reçu un implant de catgut imprégné d'acide rétinoïque dilué dans le DMSO à raison de 1  $\text{mg/ml}$  (11 bourgeons) réalisent des prestations squelettiques médiocres tant sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif (Pl. XXI, Fig. 7). Dans 50% des explants, il ne subsiste qu'un ou deux nodules arrondis dans lesquels se fichent les implants de catgut. Dans les autres cas, une ceinture rudimentaire apparaît fusionnée à des nodules cartilagineux de forme très irrégulière.



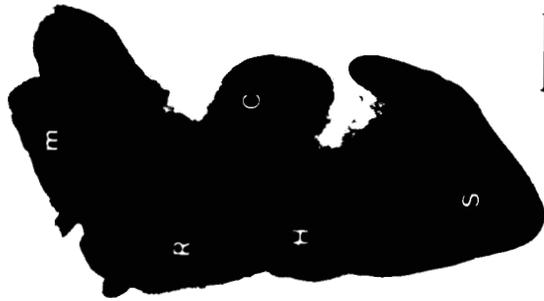
1



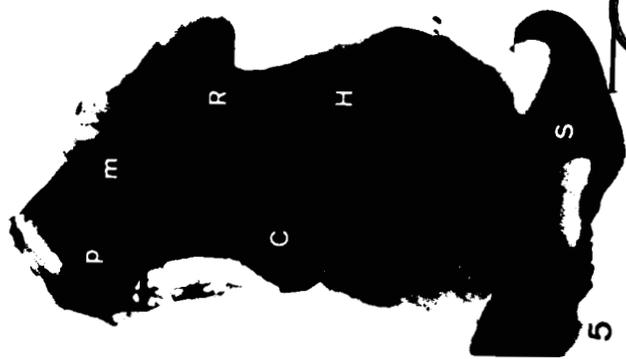
2



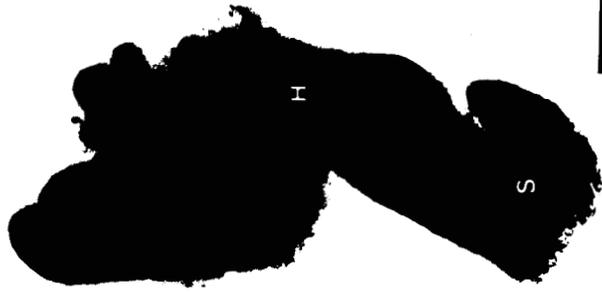
3



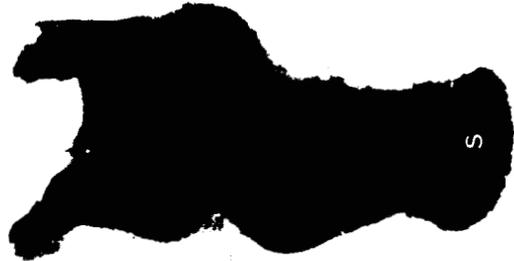
4



5



6



7



8

0.3mm



L'acide rétinoïque administré à la dose de 5 mg/ml (12 bourgeons) détermine les mêmes anomalies : la partie proximale de certains explants présente une pièce squelettique triangulaire rappelant la scapula (Pl. XXI, Fig. 8) associée ou non à de petits nodules distaux mais dans 50% des cas, il ne se forme que des nodules non identifiables de taille réduite.

En conclusion, les artifices expérimentaux utilisés pour atténuer les effets de l'acide rétinoïque sur les jeunes bourgeons se sont soldés par des comportements moins caractéristiques des explants en culture. La phase stimulatrice perceptible au niveau des autopodes de bourgeons plus âgés passe ici, si elle existe, totalement inaperçue. L'observation macroscopique ne permet pas, au stade 17, de décrire d'autres effets que l'effet tératogène, aucune formation squelettique surnuméraire n'a pu être mise en évidence.

#### b) Etude quantitative.

Les données rassemblées dans le tableau 15 soulignent le caractère plus aléatoire des expériences menées sur les jeunes bourgeons de stade 17 : si les moyennes mathématiques montrent de nouveau l'effet toxique du solvant, l'effet "compensateur" et stimulateur de la chondrogenèse des doses faibles d'acide rétinoïque et l'amorce de l'effet tératogène des doses plus fortes, la grande variabilité des résultats ne permet pas une approche très rigoureuse des effets produits. Néanmoins, on pourra retenir que l'acide rétinoïque administré à la dose de 200 µg/ml de DMSO détermine une chondrogenèse accrue dans les explants mais on se souviendra que les pièces cartilagineuses élaborées dans ces conditions sont déformées et ne ressemblent pas à des éléments squelettiques.

## D - DISCUSSION

L'étude que nous avons menée chez l'embryon de souris souligne l'importance des doses de rétinoïdes administrées sur la morphogenèse du bourgeon de membre *in vitro* et complète, tout en les confirmant, les résultats publiés récemment par KWASIGROCH et al (1986). Ces auteurs qui ont travaillé sur des bourgeons prélevés plus tardivement aux jours 11 et 12 de la gestation ont, eux aussi, obtenu une stimulation de la chondrogenèse avec des doses faibles d'acide rétinoïque dissoutes dans le milieu de culture (0,25 µg/ml). A ces stades, la drogue semble surtout déterminer l'allongement des ébauches squelettiques et, en aucun cas, ne détermine le développement d'éléments surnuméraires. La surface occupée par les éléments squelettiques s'accroît d'environ 10% au détriment des tissus environnants. Cette croissance est plus sensible dans la partie proximale des bourgeons de 11 jours et dans la partie distale des bourgeons de 12 jours. Cependant, ces auteurs ne décrivent pas les fusions que nous avons pu observer dans nos propres

cultures de bourgeons de stade 18, ni l'altération sensible du patron squelettique sans inhibition de la différenciation cartilagineuse dans nos cultures de bourgeons de stades 17 et 18. Nous ignorons si les 3 doses étudiées dans ce travail sont compatibles avec les comportements que nous avons obtenus, ou si l'âge des bourgeons traités ne se prête pas à l'expression de ces prestations. Nos bourgeons de stade 17 et nos apex de stade 18 sont en effet constitués d'un mésoderme encore indifférencié alors que des bourgeons prélevés plus tard (à la fin du jour 11 et au jour 12) sont pourvus de blastèmes préchondrogènes dans leur partie distale et d'ébauches cartilagineuses dans leur partie proximale.

Il est certain que la constitution de nos bourgeons se rapproche de celle des bourgeons d'Oiseau où a pu être déclenchée la formation d'éléments squelettiques additionnels (TICKLE et al, 1982 ; SUMMERBELL, 1983 ; TICKLE et al, 1985). Il est donc possible que l'acide rétinoïque ne se soit pas seulement comporté comme un banal facteur de croissance mais aussi comme un agent susceptible de perturber le patron de morphogenèse squelettique. Dans le bourgeon de membre embryonnaire de souris *in vitro*, ce rôle pourrait se traduire par un recrutement plus ou moins important, voire anarchique, de cellules initialement non chondrogènes (dans la mesure où l'on admet que les fusions de métacarpiens et la refonte totale du patron squelettique reposent sur un mécanisme commun). A cet égard, il serait intéressant de savoir quelle est effectivement la dose qui est administrée au moyen du catgut imprégné mais surtout pendant combien de temps s'effectue le relargage de la drogue. L'étude menée par TICKLE et al (1985) indique en effet clairement que les billes AG<sub>1</sub>-X<sub>2</sub> utilisées comme agent vecteur de vitamine A sont capables de relarguer l'acide rétinoïque pendant environ 24 heures mais aussi que la vitesse à laquelle est dégradé ce produit est très grande (il reste 9% de la dose administrée après 14 heures). Dans ces conditions, le temps requis pour induire un nouveau patron squelettique est très court (EICHELE et al, 1985) et seules les cellules encore indifférenciées présentes au début du traitement perçoivent le message. KWASIGROCH et al (1986) pensent que la stimulation produite dans leurs cultures par les faibles concentrations d'acide rétinoïque est due à l'intégration de cellules mésodermiques encore indifférenciées à la périphérie des ébauches squelettiques.

D'autres mécanismes sont toutefois possibles : à notre connaissance, aucune étude n'a jusqu'à présent signalé une éventuelle stimulation du dépôt de matrice cartilagineuse par des chondrocytes soumis à l'action de l'acide rétinoïque à faible concentration. Ce point, ainsi que l'estimation d'effets possibles sur la prolifération cellulaire dans nos ébauches traitées, devra faire l'objet d'investigations complémentaires. Un rôle régulateur sur l'étendue des zones de dégénérescence cellulaire (observées au cours du développement normal) et sur l'intensité de cette dégénérescence n'est pas à exclure : comme l'ont suggéré MILAIRE et MULNARD (1984), l'hypertrophie du rayon digital n° I que nous avons décrite peut résulter de l'absence du foyer de dégénérescence préaxial primaire (Pl. I). Enfin, il nous faudra étudier le relargage d'acide rétinoïque

en des points précis du bourgeon, l'implant de catgut constituant une source trop volumineuse.

L'effet inhibiteur de chondrogenèse des fortes doses d'acide rétinoïque a été mis en évidence dans différentes conditions expérimentales et peut affecter de jeunes cellules dans les phases initiales de leur différenciation comme des chondrocytes matures (GALLANDRE et KISTLER, 1980). Plusieurs mécanismes ont été invoqués : des cellules mésodermiques prélevées sur des bourgeons de membres de souris de 10 jours, traitées par l'acide rétinoïque pendant le premier jour de culture (culture en micromasses) s'accrochent intimement et développent des surfaces de contact anormalement étendues. Des jonctions spécialisées apparaissent également en grand nombre tandis que le métabolisme des protéines de surface est altéré (LEWIS et al, 1978). La persistance de ces relations privilégiées pourrait expliquer l'arrêt de la différenciation de ces cellules préchondrogènes. Prélevées au stade 18 (chez la souris) ces mêmes cellules cultivées dans des conditions similaires et traitées au début de la phase de dépôt de la matrice voient leurs synthèses de glycosaminoglycannes diminuer de 87% après 4 jours. Une analyse plus fine met en évidence une importante fuite d'acide hyaluronique vers le milieu de culture dès les premières heures de traitement (KOCHHAR et al, 1984). Pour ces auteurs, cette perte précoce d'acide hyaluronique expliquerait l'absence de différenciation ultérieure. Si des cultures cellulaires établies à partir de chondrocytes de sternum de poulet sont traitées par l'acide rétinoïque, les chondrocytes s'étalent rapidement sur le substrat et n'accumulent pas les composants de la matrice : les protéoglycannes sont expulsés vers le milieu, ils sont en partie dégradés et surtout, ils sont incapables de se lier à l'acide hyaluronique pour former les agrégats caractéristiques du cartilage (VASAN, 1981). Même si l'on parvient à maintenir la forme arrondie des chondrocytes, le traitement par la vitamine A entraîne une altération sensible de leur métabolisme qui est en tous points comparable à celui de chondrocytes dédifférenciés (HORTON et HASSEL, 1986).

L'effet inhibiteur de l'acide rétinoïque s'explique donc en grande partie par une altération du métabolisme des cellules qu'elles soient jeunes ou déjà différenciées. On pense actuellement que les rétinoïdes pourraient agir comme des hormones. Des récepteurs protéiques spécifiques ont en effet été découverts (ONG et CHYTIL, 1975 ; KWARTA et al, 1984 ; MADEN et SUMMERBELL, 1986), le complexe récepteur-rétinoïde pourrait être transporté jusqu'au noyau où il interviendrait pour modifier l'expression génique. L'actinomycine D ou la cycloheximide qui sont des inhibiteurs de synthèse de RNA et de protéines suppriment les effets de l'acide rétinoïque sur les chondrocytes (GALLANDRE et KISTLER, 1980). Quoiqu'il en soit, il est évident qu'en absence de synthèse des composants de la matrice cartilagineuse, les éléments squelettiques ne peuvent se mettre en place. Nos résultats montrent de plus que l'effet toxique de l'hypervitaminose A ne se manifeste pas seulement sur la lignée chondrogène et que la croissance des autres tissus est fortement perturbée.

En conclusion, le système expérimental que nous avons mis en oeuvre nous a permis d'aborder le problème des effets de l'acide rétinoïque sur la morphogenèse squelettique dans l'ébauche de membre embryonnaire de souris. Les résultats que nous avons obtenus, s'ils sont en accord avec les données publiées par ailleurs, soulèvent néanmoins de très nombreuses questions auxquelles nous nous efforcerons de répondre ultérieurement.

**CONCLUSION GENERALE**

De l'ensemble de notre travail ressort une idée fondamentale : l'ectoderme de membre pourvu de sa crête apicale est un élément essentiel dans la morphogenèse du membre embryonnaire de souris *in vitro*. Les protocoles expérimentaux que nous avons mis en oeuvre (cultures organotypiques et cultures cellulaires) tendent à montrer que la couverture ectodermique du jeune bourgeon exerce un effet stimulateur sur la prolifération du mésoderme sous-jacent indifférencié et retarde sa différenciation en cartilage. L'élimination de l'enveloppe ectodermique du bourgeon met un terme à la croissance du mésoderme qui s'oriente globalement vers la différenciation cartilagineuse : les cellules accumulent de grandes quantités d'une matrice colorable au bleu Alcian et riche en agrégats de protéoglycannes caractéristiques du cartilage. La chondrogenèse, en absence d'ectoderme, est anarchique ce qui laisse supposer que l'ectoderme a aussi un rôle indispensable dans l'acquisition du patron squelettique. Des conditions expérimentales favorables à la survie et au fonctionnement du complexe ecto-mésodermique apical améliorent considérablement les prestations des jeunes bourgeons en culture organotypique : les éléments squelettiques des différents segments du membre sont programmés puis élaborés *in vitro*. Dès que le patron squelettique est mis en place, le bourgeon âgé semble s'affranchir partiellement de l'influence ectodermique : un squelette organisé peut apparaître dans des bourgeons dénudés mais les tissus périphériques ne se développent pas.

Ces résultats acquis sur un modèle biologique que nous avons appris à manier dans différentes conditions expérimentales et à exploiter avec des techniques variées demandent, comme nous l'avons signalé régulièrement dans chacune de nos discussions, des analyses complémentaires ponctuelles mais ouvrent la voie à de nouvelles investigations : si les interactions ecto-mésodermiques sont clairement démontrées, leurs mécanismes intimes restent à explorer. Ces deux feuillets prolifèrent puis se différencient sous contrôle réciproque, nous ignorons encore les relais mis en jeu lors de ces phases successives de la morphogenèse. Notre équipe s'intéresse d'ores et déjà aux conditions requises pour la prolifération de chacun des constituants du bourgeon. Un travail préliminaire en cours au laboratoire tente de caractériser l'activité prolifératrice de l'ectoderme et du mésoderme prélevés à des stades et en des sites différents. Ce travail devrait fournir les bases d'une étude ultérieure où les conditions de survie et de développement *in vitro* de chacun des feuillets impliqués directement dans la morphogenèse du membre seront analysées. Ces investigations pourraient s'orienter plus spécialement vers l'influence des constituants matriciels et l'influence des facteurs de croissance. Ces thèmes déjà à l'étude dans notre laboratoire sur un modèle biologique voisin (le membre d'Amphibien en régénération) devraient susciter des comparaisons intéressantes et assurer l'avenir de notre sujet de recherche.

## BIBLIOGRAPHIE

- AGNISH N.D., KOCHHAR D.M., 1976a. Direct exposure of postimplantation mouse embryos to 5-bromodeoxyuridine *in vitro* and its effect on subsequent chondrogenesis in the limbs. *J. Embryol. exp. Morph.* 36, 623-638.
- AGNISH N.D., KOCHHAR D.M., 1976b. Direct exposure of mouse embryonic limb buds to 5-bromodeoxyuridine *in vitro* and its effect on chondrogenesis : increasing resistance to the analog at successive stages of development. *J. Embryol. exp. Morph.* 36, 639-652.
- AGNISH N.D., KOCHHAR D.M., 1977. The role of somites in the growth and early development of mouse limb buds. *Dev. Biol.* 56, 174-183.
- AHRENS P.B., SOLURSH M., REITER R.S., 1977. Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev. Biol.* 60, 69-82.
- AHRENS P.B., SOLURSH M., REITER R.S., SINGLEY C.T., 1979. Position-related capacity for differentiation of limb mesenchyme in cell culture. *Dev. Biol.* 69, 436-450.
- AMANO H., 1960. Role of the somitic tissue in the limb development of the urodelan *Amphibia*. *Arch. Biol. (Liège)*. 71, 343-346.
- AMPRINO R., AMBROSI G., 1973. Experimental analysis of the chick embryo limb bud growth. *Arch. Biol. (Bruxelles)*. 84, 35-86.
- AMPRINO R., CAMOSSO M., 1958. Analisi sperimentale dello sviluppo dell'ala nell'embrione di pollo. *Roux'Arch. Entw. mech. Org.* 150, 509-541.
- AMPRINO R., CAMOSSO M.E., 1959. Observations sur les duplications expérimentales de la partie distale de l'ébauche de l'aile chez l'embryon de Poulet. *Arch. Anat. Micro. Morph. Exp.* 48, 261-305.
- AMPRINO R., CAMOSSO M.E., 1963. Effects of exchanging the A-P reoriented apex between wing and hind limb bud. *Acta Embryol. Morph. Exp.* 6, 241-259.
- ARCHER C.W., ROONEY P., WOLPERT L., 1982. Cell shape and cartilage differentiation of early chick limb bud cells in culture. *Cell Differ.* 11, 245-251.
- AYDELOTTE M.B., KOCHHAR D.M., 1972. Development of mouse limb buds in organ culture : chondrogenesis in the presence of a proline analog, L-azetidine-2-carboxylic acid. *Dev. Biol.* 28, 191-201.
- BALCUNS A., GASSELING M.T., SAUNDERS J.W., 1970. Spatio-temporal distribution of a zone that controls antero-posterior polarity in the limb bud of the chick and other bird embryos. *Amer. Zool.* 10, 323.
- BARD S., SENDEL P., 1984. Reconstitution of the epidermal basement membrane after enzymatic dermal-epidermal separation of embryonic mouse skin. *Arch. Anat. Micro. Morphol. Exp.* 73, 239-257.
- BANERJEE S.D., COHN R.H., BERNFIELD M.R., 1977. Basal lamina of embryonic salivary epithelia : production by epithelium and role in maintaining lobular morphology. *J. Cell Biol.* 73, 445-463.
- BELL K.M., 1986. The preliminary characterization of mitogens secreted by embryonic chick wing bud tissues *in vitro*. *J. Embryol. exp. Morph.* 93, 257-265.
- BELL K.M., Mc LACHLAN J.C., 1985. Stimulation of division in mouse 3T3 cells by coculture with embryonic chick limb tissue. *J. Embryol. exp. Morph.* 86, 219-226.
- BIDDULPH C.M., SAWYER L.M., SMALES W.P., 1984. Chondrogenesis of chick limb mesenchyme *in vitro*. Effects of prostaglandins on cyclic AMP. *Exp. Cell. Res.* 153, 270-274.
- BLANKENBURG G., BLUTH U., NEUBERT D., 1983. Requirement of ascorbate and cystein in limb bud cultures at different developmental stages. *Teratology.* 26, 13A-14A.
- BOURGEOIS N.M., HOUBEN J.J.G., 1975. Morphogenèse primordiale du membre antérieur et ses aspects histochimiques chez le pleurodèle et l'axolotl. *C.R. Acad. Sc. Paris.* 280, 2037-2040.

- BRAND B., CHRIST B., JACOB H.J., 1985. An experimental analysis of the developmental capacities of distal parts of avian leg buds. *Amer. J. Anat.* 173, 321-340.
- BRUNK F.C., JONES K.A., JAMES T.W., 1979. Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal. Bioch.* 92, 497-500.
- BRYANT S.V., FRENCH V., BRYANT P.J., 1981. Distal regeneration and symmetry. *Science.* 212, 993-1002.
- CAIRNS J.M., 1975. The function of the apical ectodermal ridge and distinctive characteristics of adjacent distal mesoderm in the avian limb bud. *J. Embryol. exp. Morph.* 34, 155-169.
- CAIRNS J.M., 1977. Growth of normal and talpid<sup>2</sup> chick wing buds : an experimental analysis. Dans : D.A. EDE, J.R. HINCHLIFFE et M. BALLS (Eds), *Vertebrate Limb and Somite Morphogenesis.* 123-137. Cambridge University Press, Cambridge.
- CALANDRA A.J., MAC CABE J.A., 1978. The *in vitro* maintenance of the limb bud apical ridge by cell-free preparations. *Dev. Biol.* 62, 258-269.
- CAMPBELL M.A., BROWN K.S., HASSELL J.R., HORIGAN E.A., KEELER R.F., 1985. Inhibition of limb chondrogenesis by a Veratrum alkaloid : temporal specificity *in vivo* and *in vitro*. *Dev. Biol.* 111, 464-470.
- CAPLAN A.I., 1970. Effects of the nicotinamide-sensitive teratogen 3 - acetyl pyridine on chick limb cells in culture. *Exp. Cell. Res.* 62, 341-355.
- CAPLAN A.I., KOUTROUPAS S., 1973. The control of muscle and cartilage development in the chick limb : The role of differential vascularization. *J. Embryol. exp. Morph.* 29, 571-584.
- CARRINO D.A., CAPLAN A.I., 1985. Isolation and characterization of proteoglycans synthesized *in ovo* by embryonic chick cartilage and new bone. *J. Biol. Chem.* 260, 122-127.
- CARRINO D.A., LENNON D.P., CAPLAN A.I., 1983. Extracellular matrix and the maintenance of the differentiated state : Proteoglycans synthesized by replated chondrocytes and nonchondrocytes. *Dev. Biol.* 99, 132-144.
- CHEVALLIER A., KIENY M., MAUGER A., 1977. Limb-somite relationship : origin of the limb musculature. *J. Embryol. exp. Morph.* 41, 245-258.
- CHEVALLIER A., KIENY M., MAUGER A., 1978. Limb-somite relationship : effect of removal of somitic mesoderm on the wing musculature. *J. Embryol. exp. Morph.* 43, 263-278.
- CHRIST B., JACOB H.J., JACOB M., 1977. Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anat. Embryol.* 150, 171-186.
- COTTRILL C.P., ARCHER C.W., HORNBRUCH A., WOLPERT L., 1987. The differentiation of normal and muscle free distal chick limb bud mesenchyme in micromass culture. *Dev. Biol.* 119, 143-151.
- DATU A.R., 1985. Developmental changes of cell process meshwork and extracellular space in subepidermal mesenchyme in mouse forelimb buds. *Develop. Growth and Differ.* 27, 803-813.
- DE LUCA S., HEINEGARD D., HASCALL V.C., KIMURA J.H., CAPLAN A.I., 1977. Chemical and physical changes in proteoglycans during development of chick limb bud chondrocytes grown *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 252, 6600-6608.
- DESBIENS X., 1979. Contribution a l'étude expérimentale de la morphogenèse du membre de souris. Résultats de cultures *in vitro*. Thèse de Doctorat 3ème cycle. Université des Sciences et Techniques de Lille.
- DESBIENS X., 1983. Etude expérimentale de l'effet de l'ectoderme sur la chondrification du mésoderme du membre embryonnaire de souris *in vitro*. Résultats d'une étude histologique. *C.R. Acad. Sc. Paris* 296, 593-596.
- DESBIENS X., CARETTE F., MEUNIER L., BART A., 1985. Chondrogenèse dans le bourgeon de membre de souris *in vitro*. I. Effet de l'ectoderme. *Biol. Cell.* 55, 113-124.

- DESSAU W., VON DER MARK H., VON DER MARK K., FISCHER S., 1980. Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb bud chondrogenesis. *J. Embryol. exp. Morph.* 57, 51-60.
- DEUCHAR E.M., 1976. Regeneration of amputated limb-buds in early rat embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 35, 345-354.
- DORFMAN A., 1981. Proteoglycan biosynthesis. Dans : E.D. HAY (Ed), *Cell biology of extracellular matrix*. 115-138, Plenum Press, New-York.
- DUKE J., ELMER W.A., 1977. Effect of the brachypod mutation on cell adhesion and chondrogenesis in aggregates of mouse limb mesenchyme. *J. Embryol. exp. Morph.* 42, 209-217.
- DUKE J., ELMER W.A., 1978. Cell adhesion and chondrogenesis in brachypod mouse limb mesenchyme : fragment fusion studies. *J. Embryol. exp. Morph.* 48, 161-168.
- DUKE J., ELMER W.A., 1979. Effect of the brachypod mutation on early stages of chondrogenesis in mouse embryonic hind limbs : An ultrastructural analysis. *Teratology* 19, 367-375.
- EDE D.A., BELLAIRS R., BANCROFT M., 1974. A scanning electron microscope study of the early limb-bud in normal and talpid mutant chick embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 31, 761-786.
- EICHELE G., TICKLE C., ALBERTS B.M., 1984. Micro-controlled release of biologically active compounds in chick embryos : beads of 200  $\mu\text{m}$  diameter for the local release of retinoids. *Anal. Biochem.* 142, 542-555.
- EICHELE G., TICKLE C., ALBERTS B.M., 1985. Studies on the mechanism of retinoid-induced pattern duplications in the early chick limb bud : temporal and spatial aspects. *J. Cell. Biol.* 101, 1913-1920.
- ELMER A.W., 1982. Developmental cues in limb bud chondrogenesis. *Collagen Rel. Res.* 2, 257-279.
- ERRICK J.E., SAUNDERS J.W. Jr., 1974. Effects of an "inside-out" limb-bud ectoderm on development of the avian limb. *Dev. Biol.* 41, 338-351.
- ERRICK J.E., SAUNDERS J.W. Jr., 1976. Limb outgrowth in the chick embryo induced by dissociated and reaggregated cells of the apical ectodermal ridge. *Dev. Biol.* 50, 26-34.
- FALLON J.F., CAMERON J.A., 1977. Interdigital cell death during limb development of the turtle and lizard with interpretation of evolutionary significance. *J. Embryol. exp. Morph.* 40, 285-289.
- FALLON J.F., CROSBY G.M., 1975. Normal development of the chick wing following removal of the polarizing zone. *J. Exp. Zool.* 193, 449-455.
- FALLON J.F., CROSBY G.M., 1977. Polarizing zone activity in limb buds of amniotes. Dans : D.A. EDE, J.R. HINCHLIFFE et M. BALLS (Eds), *Vertebrate Limb and Somite Morphogenesis*. 55-69. Cambridge University Press, Cambridge.
- FEINBERG R.N., SAUNDERS J.W. Jr., 1982. Effects of excising the apical ectodermal ridge on the development of the marginal vasculature of the wing bud in the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 219, 345-354.
- FEINBERG R.N., REPO M.A., SAUNDERS J.W. Jr., 1983. Ectodermal control of the avascular zone of the peripheral mesoderm in the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 226, 391-398.
- FINNEGAN C.V., 1963. Observations of dependant histogenesis in Salamander limb development. *J. Embryol. exp. Morph.* 11, 325-328.
- FISCHER M., SOLURSH M., 1979. The influence of local environment on the organization of mesenchyme cells. *J. Embryol. exp. Morph.* 49, 295-306.
- FLEMING M.W., TASSAVA R.A., 1981. Preamputation and postamputation histology of the neonatal opossum hindlimb : Implications for regeneration experiments. *J. Exp. Zool.* 215, 143-149.

- GALLANDRE F., KISTLER A., 1980. Inhibition and reversion of chondrogenesis by retinoic acid in rat limb bud cell cultures. *Wilhelm Roux's Archives*. 189, 25-33.
- GAY S.W., KOSHER R.A., 1984. Uniform cartilage differentiation in micromass cultures prepared from a relatively homogeneous population of chondrogenic progenitor cells of the chick limb bud : effect of prostaglandins. *J. Exp. Zool.* 232, 317-326.
- GLANT T.T., HADHAZY C., MIKECZ K., SIPOS A., 1985. Appearance and persistence of fibronectin in cartilage. Specific interaction of fibronectin with collagen type II. *Histochemistry*. 82, 149-158.
- GLOBUS M., VETHAMANY-GLOBUS S., 1976. *In vitro* analogue of early chick limb bud outgrowth. *Differentiation*. 6, 91-96.
- GLOWACKI J., TREPMAN E., FOLKMAN J., 1983. Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 172, 93-98.
- GULAMHUSEIN A.P., BECK F., ZIMMERMANN B., 1980. Development of ferret limb buds in organ culture. *J. Anat.* 131, 347-354.
- GUMPEL-PINOT M., 1972. Culture *in vitro* de l'ébauche de l'aile de l'embryon de poulet. Rôle de l'ectoderme sur la chondrogenèse. *C.R. Acad. Sc. Paris*. 274, 2786-2789.
- GUMPEL-PINOT M., 1973. Culture *in vitro* du bourgeon d'aile de l'embryon de poulet : différenciation du cartilage. *Ann. Biol.* 12, 417-428.
- GUMPEL-PINOT M., 1980. Ectoderm and mesoderm interactions in the limb bud of the chick embryo studied by transfilter cultures : cartilage differentiation and ultrastructural observations. *J. Embryol. exp. Morph.* 59, 157-173.
- GUMPEL-PINOT M., 1981a. Ectoderm-mesoderm interactions in relation to limb bud chondrogenesis in the chick embryo : transfilter cultures and ultrastructural studies. *J. Embryol. exp. Morph.* 65, 73-87.
- GUMPEL-PINOT M., 1981b. Interactions ectoderme-mésoderme en relation avec la chondrogenèse dans le membre de l'embryon de Poulet : étude ultrastructurale en culture dans la membrane vitelline. *Arch. Anat. Micr. Morphol. Exp.* 70, 1-14.
- GUNTAKATTA M., MATTHEWS E.J., RUNDELL J.O., 1984. Development of a mouse embryo limb bud cell culture system for the estimation of chemical teratogenic potential. *Terat. Carcin. Mutagen.* 4, 349-364.
- HADHAZY C., LASZLO M.B., KOSTENSZKY K.S., 1982. Cartilage differentiation in micro-mass cultures of chicken limb buds. *Acta Morphologica Acad. Sci. Hung.* 30, 65-78.
- HADHAZY C. SZOLLOSI J., LASZLO M.B., 1983. *In vitro* cartilage differentiation : modification of division cycle and effect of some polyanions. *Acta. Histochem.* S27, 285-288.
- HAMBURGER V., HAMILTON H.L., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* 88, 49-92.
- HAMPE A., 1956. Sur la topographie des ébauches présomptives du membre postérieur du poulet. *C.R. Acad. Sci. Paris*. 243, 970-973.
- HAMPE A., 1959. Contribution à l'étude du développement et de la régulation des déficiences et des excédents dans la patte de l'embryon de poulet. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 48, 345-378.
- HANDLEY C.J., LOWTHER D.A., 1976. Inhibition of proteoglycan biosynthesis by hyaluronic acid in chondrocytes in cell culture. *Biochim. Biophys. Acta.* 444, 69-71.
- HANDLEY C.J., LOWTHER D.A., Mc QUILLAN D.J., 1985. The structure and synthesis of proteoglycans of articular cartilage. *Cell Biol. Intern. Reports.* 9, 753-782.
- HASCALL V.C., HASCALL G.K., 1981. Proteoglycans. Dans : E.D. HAY (Ed), *Cell biology of extracellular matrix*, 39-63. Plenum Press, New-York.
- HASCALL V.C., KIMURA J.H., 1982. Proteoglycans : Isolation and characterization. Dans : L.W. CUNNINGHAM, D.W. FREDERIKSEN (Ed), *Methods in Enzymology.* 82, 769-800. Academic Press, Inc. New-york.
- HASCALL V.C., OEGEMA T.R., BROWN M., 1976. Isolation and characterization of proteoglycans from chick limb bud chondrocytes grown *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 251, 3511-3519.

- HASSELL J.R., PENNYPACKER J.P., LEWIS L.A., 1978. Chondrogenesis and cell proliferation in limb bud cell cultures treated with cytosine arabinoside and vitamin A. *Exp. Cell Res.* 112, 409-417.
- HATTORI T., IDE H., 1984. Limb bud chondrogenesis in cell culture, with particular reference to serum concentration in the culture medium. *Exp. Cell Res.* 150, 338-346.
- HATTORI T., IDE H., 1985. Effect of cyclic AMP on limb bud chondrogenesis in low density culture. *Exp. Cell Res.* 157, 371-378.
- HAY E.D., DODSON J.W., 1973. Secretion of collagen by corneal epithelium. I. Morphology of the collagenous products produced by isolated epithelia grown on frozen killed lens. *J. Cell. Biol.* 57, 190-213.
- HERKEN R., 1975. Autoradiographic investigation with  $^3\text{H}$  thymidine in limb bud cultures. Dans : D. NEUBERT, H.J. MERKER (Eds), *New approaches to the evaluation of abnormal embryonic development.* 200-212. Thieme, Stuttgart.
- HINCHLIFFE J.R., GUMPEL-PINOT M., 1981. Control of maintenance and anteroposterior skeletal differentiation of the anterior mesenchyme of the chick wing bud by its posterior margin (The ZPA). *J. Embryol. exp. Morph.* 62, 63-82.
- HINCHLIFFE J.R., THOROGOOD P.V., 1974. Genetic inhibition of mesenchymal cell death and the development of form and skeletal pattern in the limbs of talpid<sup>3</sup> mutant chick embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 31, 747-760.
- HO W.C., GREENE R.M., SHANFELD J., DAVIDOVITCH Z., 1982. Cyclic nucleotides during chondrogenesis. Concentration and distribution *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 224, 321-330.
- HOLTZER H., ABBOTT J., 1968. Oscillations of the chondrogenic phenotype *in vitro*. Dans : H. URSPRUNG (Ed), *The stability of the differentiated state.* 1-16. Springer-Verlag, New-York.
- HORNBRUCH A., 1980. Abnormalities along the proximo-distal axis of the chick wing bud : The effect of surgical intervention. Dans : H.J. MERKER, H. NAU et D. NEUBERT (Eds), *Teratology of the limbs.* 191-197. De Gruyter, Berlin.
- HORTON W., HASSELL J.R., 1986. Independence of cell shape and loss of cartilage matrix production during retinoic acid treatment of cultured chondrocytes. *Dev. Biol.* 115, 392-397.
- HOUBEN J.J.G., 1976. Aspects ultrastructuraux de la migration de cellules somitiques dans les bourgeons de membres postérieurs de souris. *Arch. Biol. (Bruxelles).* 87, 345-365.
- HURLE J.M., GANAN Y., 1986. Interdigital tissue chondrogenesis induced by surgical removal of the ectoderm in the embryonic chick leg bud. *J. Embryol. exp. Morph.* 94, 231-244.
- JANGIR O.P., NIAZI I.A., 1978. Stage dependent effects of vitamin A excess on limbs during ontogenesis and regeneration in tadpoles of the toad *Bufo melanostictus* (Schneider). *Indian J. Exp. Biol.* 16, 438-445.
- JAVOIS L.C., ITEN L.E., 1986. The handedness and origin of supernumerary limb structures following 180° rotation of the chick wing bud on its stump. *J. Embryol. exp. Morph.* 91, 135-152.
- JURAND A., 1965. Ultrastructural aspects of early development of the forelimb buds in the chick and the mouse. *Proc. R. Soc. London, Ser. B,* 162, 387-405.
- KAPLOWITZ P.B., D'ERCOLE A.J., UNDERWOOD L.E., 1982. Stimulation of embryonic mouse limb bud mesenchymal cell growth by peptide growth factors. *J. Cell Physiol.* 112, 353-359.
- KAPRIO E.A., 1977. Ectodermal-mesenchymal interspace during formation of chick leg bud. Scanning and transmission electron microscopic study. *W. Roux's Arch. Dev. Biol.* 182, 213-226.

- KARASAWA K., KIMATA K., ITO K., KATO Y., SUZUKI S., 1979. Morphological and biochemical differentiation of limb bud cells cultured in chemically defined medium. *Dev. Biol.* 70, 287-305.
- KATOH Y., KODAMA K., ISHIKAWA T., 1985. *In vivo* effects of epidermal and fibroblast growth factors on DNA replication in mouse skin. *Exp. Cell Res.* 161, 111-116.
- KELLEY R.O., 1973. Fine structure of the apical rim mesenchyme complex during limb morphogenesis in man. *J. Embryol. exp. Morph.* 29, 117-131.
- KELLEY R.O., 1975. Ultrastructural identification of extracellular matrix and cell surface components during limb morphogenesis in man. *J. Embryol. exp. Morph.* 34, 1-18.
- KELLEY R.O., BLUEMINK J.G., 1974. An ultrastructural analysis of cell and matrix differentiation during early limb development in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 37, 1-17.
- KELLEY R.O., FALLON J.F., 1976. Ultrastructural analysis of the apical ectodermal ridge during Vertebrate limb morphogenesis. I. The human forelimb with special reference to gap junctions. *Dev. Biol.* 51, 241-256.
- KELLEY R.O., FALLON J.F., 1978. Identification and distribution of gap junctions in the mesoderm of the developing chick limb bud. *J. Embryol. exp. Morph.* 46, 99-110.
- KELLEY R.O., FALLON J.F., 1982. A freeze-fracture and morphometric analysis of gap junctions of limb bud cells : Initial studies on a possible mechanism for morphogenetic signalling during development. Dans : R.O. KELLEY, P.F. GOËTINCK, J.A. MAC CABE (Eds), *Limb Development and Regeneration*, Part. A 119-130. Alan R. Liss. Inc., New-York.
- KIENY M., 1964. Régulation des excédents et des déficiences du bourgeon d'aile de l'embryon de poulet. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 53, 29-44.
- KIENY M., 1964. Etude du mécanisme de la régulation dans le développement du bourgeon de membre de l'embryon de poulet. I. Régulation des excédents. *Dev. Biol.* 9, 197-229.
- KIENY M., 1967. Phénomènes de régulation de l'ébauche de membre chez l'embryon de poulet. *Rev. Anat. Morphol. Exp.* 39, 1-37.
- KIENY M., 1969. Sur les relations entre le mésoderme somitique et le mésoderme somatopleural avant et au cours de l'induction primaire des membres de l'embryon de poulet. *C.R. Acad. Sc. Paris.* 268, 3183-3186.
- KIENY M., 1977. Proximo-distal pattern formation in avian limb development. Dans : D.A. EDE, J.R. HINCHLIFFE et M. BALLS (Eds), *Vertebrate Limb and Somite Morphogenesis.* 87-103. Cambridge University Press, Cambridge.
- KIENY M., PAUTOU M.P., 1970. Sur le mécanisme de la nécrose morphogène dans le pied de l'embryon de poulet. *C.R. Acad. Sc. Paris.* 270, 3091-3094.
- KIENY M., PAUTOU M.P., 1976. Régulation des excédents dans le développement du bourgeon de membre de l'embryon d'oiseau. Analyse expérimentale de combinaisons xénoplastiques caille/poulet. *W. Roux's Archiv. Dev. Biol.* 179, 327-338.
- KIENY M., PAUTOU M.P., 1977. Proximo-distal pattern regulation inefficient avian limb buds. *W. Roux's Archiv. Dev. Biol.* 183, 177-192.
- KIENY M., PAUTOU M.P., CHEVALLIER A., 1981. On the stability of the myogenic cell line in avian limb bud development. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 70, 81-90.
- KIM J.J., CONRAD H.E., 1982. Proteochondroitin sulfate synthesis in subcultured chick embryo tibial chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 257, 1670-1675.
- KIM W.S., STOCUM D.L., 1986. Effects of retinoids on regenerating limbs : comparison of retinoic acid and arotinoid at different amputation levels. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 195, 455-463.
- KIMATA K., OIKE Y., TANI K., SHINOMURA T., YAMAGATA M., URITANI M., SUZUKI S., 1986. A large chondroitin sulfate proteoglycan (PG-M) synthesized before chondrogenesis in the limb bud of chick embryo. *J. Biol. Chem.* 261, 13517-13525.

- KISTLER A., 1981. Teratogenesis of retinoic acid in rats : susceptible stages and suppression of retinoic acid-induced limb malformations by cycloheximide. *Teratology*. 23, 25-31.
- KISTLER A. MISLIN M., GEHRIG A., 1985. Chondrogenesis of limb-bud cells : improved culture method and the effect of the potent teratogen retinoic acid. *Xenobiotica*. 15, 673-679.
- KNUDSEN T.B., KOCHHAR D.M., 1981a. The role of morphogenetic cell death during abnormal limb bud outgrowth in mice heterozygous for the dominant mutation *Hemimelia extra toe* ( $Hm^X$ ). *J. Embryol. exp. Morph.* 65, 289-307.
- KNUDSEN T.B., KOCHHAR D.M., 1981b. Limb development in mouse embryos. III. Cellular events underlying the determination of altered skeletal patterns following treatment with 5'Fluoro-2-Deoxyuridine. *Teratology*. 23, 241-251.
- KNUDSON C.B., TOOLE B.P., 1985. Changes in the pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm. *Dev. Biol.* 112, 308-319.
- KOCHHAR D.M., 1967. Teratogenic activity of retinoic acid. *Acta path. Microbiol. Scand.* 70, 398-404.
- KOCHHAR D.M., 1973. Limb development in mouse embryos. Analysis of teratogenic effects of retinoic acid. *Teratology*. 7, 289-298.
- KOCHHAR D.M., AGNISH N.D., 1977. "Chemical surgery" as an approach to study morphogenetic events in embryonic mouse limb. *Dev. Biol.* 61, 388-394.
- KOCHHAR D.M., AYDELOTTE M.B., 1974. Susceptible stages and abnormal morphogenesis in the developing mouse limb, analyzed in organ culture after transplacental exposure to vitamin A (retinoic acid). *J. Embryol. exp. Morph.* 31, 721-734.
- KOCHHAR D.M., PENNER J.D., HICKEY T., 1984. Retinoic acid enhances the displacement of newly synthesized hyaluronate from cell layer to culture medium during early phases of chondrogenesis. *Cell Differ.* 14, 213-221.
- KOCHHAR D.M., PENNER J.D., Mc DAY J.A., 1978. Limb development in mouse embryos. II. Reduction defects, cytotoxicity and inhibition of DNA synthesis produced by cytosine arabinoside. *Teratology*. 18, 71-102.
- KOHNERT-STAVENHAGEN E., ZIMMERMANN B., 1980. Changes in the surface coat of mesenchymal cells of mouse limb buds after enzymatic cell separation. *J. Embryol. exp. Morphol.* 59, 145-155.
- KOSHER R.A., CHURCH R.L., 1975. Stimulation of *in vitro* somite chondrogenesis by procollagen and collagen. *Nature*. 258, 327-330.
- KOSHER R.A., GAY S.W., 1985. The effect of prostaglandins on the cyclic AMP content of limb mesenchymal cells. *Cell Differ.* 17, 159-167.
- KOSHER R.A., SAVAGE M.P., 1980. Studies on the possible role of cyclic AMP in limb morphogenesis and differentiation. *J. Embryol. Exp. Morph.* 56, 91-105.
- KOSHER R.A., SAVAGE M.P., 1981. Glycosaminoglycan synthesis by the apical ectodermal ridge of chick limb bud. *Nature*. 291, 231-232.
- KOSHER R.A., WALKER K.H., 1983. The effect of prostaglandins on *in vitro* limb cartilage differentiation. *Exp. Cell Res.* 145, 145-153.
- KOSHER R.A., LASH J.W., MINOR R.R., 1973. Environmental enhancement of *in vitro* chondrogenesis. IV. Stimulation of somite chondrogenesis by exogenous chondromucoprotein. *Dev. Biol.* 35, 210-220.
- KOSHER R.A., SAVAGE M.P. CHAN S.C., 1979a. *In vitro* studies on the morphogenesis and differentiation of the mesoderm subjacent to the apical ectodermal ridge of the embryonic chick limb bud. *J. Embryol. exp. Morph.* 50, 75-97.
- KOSHER R.A., SAVAGE M.P., CHAN S.C., 1979b. Cyclic AMP derivatives stimulate the chondrogenic differentiation of the mesoderm subjacent to the apical ectodermal ridge of the chick limb bud. *J. Exp. Zool.* 209, 221-228.
- KOSHER R.A., SAVAGE M.P., WALKER K.H., 1981. A gradation of hyaluronate accumulation along the proximodistal axis of the embryonic chick limb bud. *J. Embryol. exp. Morph.* 63, 85-98.

- KOSHER R.A., GAY S.W., KAMANITZ J.R., KULYK W.M., RODGERS B.J., SAI S., TANAKA T., TANZER M.L., 1986. Cartilage proteoglycan core protein gene expression during limb cartilage differentiation. *Dev. Biol.* 118, 112-117.
- KUJAWA M.J., CAPLAN A.I., 1986. Hyaluronic acid bonded to cell-culture surfaces stimulates chondrogenesis in stage 24 limb mesenchymal cell cultures. *Dev. Biol.* 114, 504-518.
- KUJAWA M.J., CARRINO D.A., CAPLAN A.I., 1986. Substrate-bonded hyaluronic acid exhibits a size dependent stimulation of chondrogenic differentiation of stage 24 limb mesenchymal cells in culture. *Dev. Biol.* 114, 519-528.
- KWARTA R.F., KIMMEL C.A., KIMMEL G.L., SLIKKER W., 1985. Identification of the cellular retinoic acid-binding protein (CRABP) within the embryonic mouse (CD-1) limb bud. *Teratology.* 32, 103-111.
- KWASIGROCH T.E., KOCHHAR D.M., 1980. Production of congenital limb defects with retinoic acid : phenomenological evidence of progressive differentiation during limb morphogenesis. *Anat. Embryol.* 161, 105-113.
- KWASIGROCH T.E., SKALKO R.G., 1982. The use of limb culture and image analysis in teratology. *Anat. Rec.* 202, 147A-148A.
- KWASIGROCH T.E., SKALKO R.G., 1983. Development of mouse limbs in organ culture : dose dependent retinoic acid-induced defects evaluated using image analysis. Dans : R.O. KELLEY, P.F. GOETINCK, J.A. MAC CABE (Eds) *Limb development and regeneration. Part A.* 335-344, Alan R. Liss, Inc., New-York.
- KWASIGROCH T.E., SKALKO R.G., CHURCH J.K., 1981. Culture of mammalian limb buds in the absence of serum. *Anat. Rec.* 199, 148A.
- KWASIGROCH T.E., SKALKO R.G., CHURCH J.K., 1984. Mouse limb bud development in submerged culture : quantitative assessment of the effects of *in vivo* exposure to retinoic acid. *Terat. Carcin. Mutagen.* 4, 311-326.
- KWASIGROCH T.E., VANNOY J.F., CHURCH J.K., SKALKO R.G., 1986. Retinoic acid enhances and depresses *in vitro* development of cartilaginous bone anlagen in embryonic mouse limbs. *In vitro Cell Dev. Biol.* 22, 150-156.
- LASSALLE B., ROUSSEAU A., 1983. Synthèse d'ADN dans les blastèmes de régénération de *Pleurodeles waltlii*. (Amphibien Urodèle) en culture *in vitro*. Conditions de culture. *Biol. Cell*, 47, 187-192.
- LAUTHIER M., 1977. Etude ultrastructurale des stades précoces du développement du membre postérieur de *Pleurodeles waltlii* Michah (Amphibien, Urodèle). *J. Embryol. exp. Morph.* 38, 1-18.
- LAUTHIER M., 1982. Rôle morphogénétique des constituants épidermique et mésodermique des bourgeons de membres antérieurs et postérieurs du Triton *Pleurodeles waltlii* Michah. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie. Paris.
- LEE J., TICKLE C., 1985. Retinoic acid and pattern formation in the developing chick wing. SEM and quantitative studies of early effects on the apical ectodermal ridge and bud out growth. *J. Embryol. exp. Morph.* 90, 139-169.
- LEONARD C.M., NEWMAN S.A., 1987. Nuclear events during early chondrogenesis phosphorylation of the precartilage 35,5-kDa domain-specific chromatin protein and its regulation by cyclic AMP. *Dev. Biol.* 120, 92-100.
- LESOT H., OSMAN M., RUCH J.V., 1981. Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. *Dev. Biol.*, 82, 371-381.
- LESSMÖLLMANN U., HINZ N., NEUBERT D., 1976. *In vitro* system for toxicological studies on the development of mammalian limb buds in a chemically defined medium. *Archiv. Toxicol.* 36, 169-176.
- LEV R., SPICER S.S., 1964. Specific staining of sulfate groups with Alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.* 12, 309.
- LEWIS J., 1977. Growth and determination in the developing limb. Dans : D.A. EDE, J.R. HINCHLIFFE et M. BALLS (Eds), *Vertebrate limb and somite morphogenesis.* 215-228. Cambridge University Press, Cambridge.

- LEWIS C.A., PRATT R.M., PENNYPACKER J.P., HASSELL J.R., 1978. Inhibition of limb chondrogenesis *in vitro* by vitamin A : alterations in cell surface characteristics. *Dev. Biol.* 64, 31-47.
- LHEUREUX E., THOMS S.D., CAREY F., 1986. The effects of two retinoids on limb regeneration in *Pleurodeles waltl* and *Triturus vulgaris*. *J. Embryol. exp. Morph.* 92, 165-182.
- LINSENMAYER T.F., TOOLE B.P., TRELSTAD R.L., 1973. Temporal and spatial transition in collagen types during embryonic chick limb development. *Dev. Biol.* 35, 232-239.
- MAC CABE J.A., PARKER B.W., 1975. The *in vitro* maintenance of the apical ectodermal ridge of the chick embryo wing bud : an assay for polarizing activity. *Dev. Biol.* 45, 349-357.
- MAC CABE J.A., PARKER B.W., 1976a. Evidence for a gradient of a morphogenetic substance in the developing limb. *Dev. Biol.* 54, 297-303.
- MAC CABE J.A., PARKER B., 1976b. Polarizing activity in the developing limb of the syrian hamster. *J. Exp. Zool.* 195, 311-317.
- MAC CABE J.A., RICHARDSON K.E.Y., 1982. Partial characterization of a morphogenetic factor in the developing chick limb. *J. Embryol. exp. Morph.* 67, 1-12.
- MAC CABE J.A., CALANDRA A.J., PARKER B.W., 1977. *In vitro* analysis of the distribution and nature of a morphogenetic factor in the developing chick wing. Dans : D.A. EDE, J.R. HINCHLIFFE et M. BALLS (Eds), *Vertebrate Limb and Somite Morphogenesis*. 25-39. Cambridge University Press, Cambridge.
- MAC CABE J.A., ERRICK J., SAUNDERS J.W. Jr., 1974. Ectodermal control of the dorso-ventral axis of the leg bud of the chick embryo. *Dev. Biol.* 39, 69-82.
- MAC CABE A.B., GASSELING M.T., SAUNDERS J.W. Jr., 1973. Spatiotemporal distribution of mechanisms that control outgrowth and antero-posterior polarization of the limb bud in the chick embryo. *Mech. Ageing Dev.* 2, 1-12.
- MACONNACHIE E., 1979. A study of digit fusion in the mouse embryo. *J. Embryol. exp. Morph.* 49, 259-276.
- MADEN M., 1982. Vitamin A and pattern formation in the regenerating limb. *Nature.* 295, 672-675.
- MADEN M., 1983a. The effect of vitamin A on limb regeneration in *Rana temporaria*. *Dev. Biol.* 98, 409-416.
- MADEN M., 1983b. The effect of vitamin A on the regenerating axolotl limb. *J. Embryol. exp. Morphol.* 77, 273-295.
- MADEN M., SUMMERBELL D., 1986. Retinoic acid-binding protein in the chick limb bud : identification at developmental stages and binding affinities of various retinoids. *J. Embryol. exp. Morph.* 97, 239-250.
- MADEN M., KEEBLE S., COX R.A., 1985. The characteristics of local application of retinoic acid to regenerating axolotl limb. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 194, 228-235.
- MANSON J.M., SIMONS R., 1979. *In vitro* metabolism of cyclophosphamide in limb bud culture. *Teratology* 19, 149-158.
- MANSON J.M., SMITH C.C., 1977. Influence of cyclophosphamide and 4-ketocyclophosphamide on mouse limb development. *Teratology.* 15, 291-300.
- MANSON J.M., DOURSON M.L., SMITH C.C., 1977. Effects of cytosine arabinoside on *in vivo* and *in vitro* mouse limb development. *In vitro.* 13, 434-442.
- MARKWELL M.A.K., HASS S.M., BIEBER L.L., TOLBERT N.E., 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membranes and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87, 206-210.
- MARTIN P., LEWIS J., 1986. Normal development of the skeleton in chick limb buds devoid of dorsal ectoderm. *Dev. Biol.* 118, 233-246.
- MATSUI F., OOHIRA A., SHOJI R., NOGAMI H., 1986. Glycosaminoglycans and proteoglycans synthesized by rat limb buds during prechondrogenic and chondrogenic stages. *Differentiation.* 31, 29-34.
- MATSUTANI E., KURODA Y., 1982. Effect of lectins on chondrogenesis of cultured quail limb bud cells. *Dev. Biol.* 89, 521-526.

- MATSUTANI E., YAMAGATTA T., 1982. Chick endogenous lectin enhances chondrogenesis of cultured chick limb bud cells. *Dev. Biol.* 92, 544-548.
- MEINHARDT H., 1983. A bootstrap model for the proximo distal pattern formation in vertebrate limbs. *J. Embryol. exp. Morph.* 76, 139-146.
- MELNICK M., JASKOLL T., BROWNELL A.G., MAC DOUGALL M., BESSEN C., SLAVKIN H.C., 1981. Spatiotemporal patterns of fibronectin distribution during embryonic development. I. Chick limbs. *J. Embryol. exp. Morph.* 63, 193-206.
- MERKER H.J., GÜNTHER T., 1979. The influence of insulin, cAMP and calcium ionophore X 537 A on the growth of cartilage anlagen of limb buds *in vitro*. *Experientia* 35, 1307-1308.
- MERKER H.J., GÜNTHER T., KRÜGER U., 1978. Effect of 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-xylopyranoside on the morphology of embryonic cartilage in limb bud cultures. *Teratology*. 18, 291-310.
- MIDURA R.J., CHERNEY B.W., CAPLAN A.I., 1985. The relationship of nicotinamide adenine dinucleotide to the chondrogenic differentiation of limb mesenchymal cells. *Dev. Biol.* 111, 232-242.
- MILAIRE J., 1976. Contribution cellulaire des somites à la genèse des bourgeons de membres postérieurs chez la souris. *Arch. Biol. (Bruxelles)*. 87, 315-343.
- MILAIRE J., 1976. Rudimentation digitale au cours du développement normal de l'autopode chez les mammifères. Dans : Mécanismes de la rudimentation des organes chez les embryons de Vertébrés. 221-231. Editions du C.N.R.S. Paris.
- MILAIRE J., 1978. Etude morphologique, histochimique et autoradiographique du développement du squelette des membres chez l'embryon de souris. I. Membres antérieurs. *Arch. Biol. (Bruxelles)*. 89, 169-216.
- MILAIRE J., MULNARD J., 1968. Le rôle de l'épiblaste dans la chondrogenèse du bourgeon de membre chez la Souris. *J. Embryol. exp. Morphol.* 20, 215-236.
- MILAIRE J., MULNARD J., 1984. Histogenesis in 11-day mouse embryo limb buds explanted in organ culture. *J. Exp. Zool.* 232, 359-377.
- MILLER R.P. HUSAIN M., LOHIN S., 1979. Long acting cAMP analogues enhance sulfate incorporation into matrix proteoglycans and suppress cell division of foetal rat chondrocytes in monolayers cultures. *J. Cell Physiol.* 100, 63-76.
- MIZELL M., 1968. Limb regeneration : Induction in the newborn opossum. *Science*. 161, 283-286.
- MIZELL M., ISAACS J.J., 1970. Induced regeneration of hindlimbs in the newborn opossum. *Am. Zool.* 10, 141-155.
- MUNEOKA K., BRYANT S.V., 1982. Evidence that patterning mechanisms in developing and regenerating limbs are the same. *Nature* 298, 369-371.
- NAKAMURA H., 1975. Analysis of limb anomalies induced *in vitro* by vitamin A (retinol) in mice. *Teratology*. 12, 61-70.
- NAKAMURA H., 1977. Digital anomalies in the embryonic mouse limb cultured in the presence of excess vitamin A. *Teratology*. 16, 195-216.
- NAKASHIMA K., FUJIKI Y., 1987. Effects of changes in  $Ca^{2+}$  concentration of the culture medium on the *in vitro* development of 11-day mouse embryos. *J. Exp. Zool.* 241, 191-196.
- NATHANSON M.A., HAY E.D., 1980. Analysis of cartilage differentiation from skeletal muscle grown on bone matrix. *Dev. Biol.* 78, 301-331.
- NEUBERT D., KROWKE R., 1983. Effect of thalidomide-derivatives on limb development in culture. Dans : R.O. KELLEY, P.F. GOETINCK, J.A. MAC CABE (Eds), Limb development and regeneration. Part A. 387-397. Alan R. Liss, Inc., New-York.
- NEUBERT D., RAUTENBERG M., 1976. Activity of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in mouse limb buds differentiating *in vivo* or in organ culture. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357, 1623-1635.
- NEUBERT D., MERKER H.J., TAPKEN S., 1974a. Comparative studies on the prenatal development of mouse extremities *in vivo* and in organ culture. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* 286, 251-270.

- NEUBERT D., TAPKEN S., MERKER H.J., 1974b. Induction of skeletal malformations in organ cultures of mammalian embryonic tissues. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* 286, 271-282.
- NEW D.A.T., COPPOLA P.T., COCKROFT D.L., 1976. Comparison of growth *in vitro* and *in vivo* of post-implantation rat embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 36, 133-144.
- NEWMAN S.A., FRISCH H.L., 1979. Dynamics of skeletal pattern formation in developing chick limb. *Science*. 205, 662-668.
- NEWMAN S.A., PAUTOU M.P., KIENY M., 1981. The distal boundary of myogenic primordia in chimeric avian limb buds and its relation to an accessible population of cartilage progenitor cells. *Dev. Biol.* 84, 440-448.
- NIAZI I.A., ALAM S., 1984. Regeneration of whole limbs from shank stumps in toad tadpoles treated with vitamin A. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 193, 111-116.
- NIAZI I.A., RATNASAMY C.S., 1984. Regeneration of whole limbs in toad tadpoles treated with retinol palmitate after the wound healing stage. *J. Exp. Zool.* 230, 501-505.
- NIAZI I.A., SAXENA S., 1978. Abnormal hind limb regeneration in tadpoles of the toad, *Bufo andersoni*, exposed to excess vitamin A. *Folia Biol. (Krakow)*. 26, 3-11.
- NIAZI I.A., PESCIPELLI M.J., STOCUM D.L., 1985. Stage dependent effects of retinoic acid on regenerating urodele limbs. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 194, 355-363.
- OHSUGI K., IDE H., 1986. Position specific binding of a monoclonal antibody in chick limb buds. *Dev. Biol.* 117, 676-679.
- OKAYAMA M., PACIFICI M., HOLTZER H., 1976. Differences among sulfated proteoglycans synthesized in non chondrogenic cells, presumptive chondroblasts and chondroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 3224-3228.
- ONG D.E., CHYTIL F., 1975. Retinoic acid-binding protein in rat tissue. *J. Biol. Chem.* 250, 6113-6117.
- OSMAN M., RUCH J.V., 1980. Secretion of basal lamina by trypsin-isolated embryonic mouse molar epithelia cultured *in vitro*. *Dev. Biol.* 75, 467-470.
- OSTER G.F., MURRAY J.D., MAINI P.K., 1985. A model for chondrogenic condensations in the developing limb : the role of extracellular matrix and cell tractions. *J. Embryol. exp. Morph.* 89, 93-112.
- OVADIA M., PARKER C.H., LASH J.W., 1980. Changing patterns of proteoglycan synthesis during chondrogenic differentiation. *J. Embryol. exp. Morph.* 56, 59-70.
- OWENS E.M., SOLURSH M., 1981. *In vitro* histogenic capacities of limb mesenchyme from various stage mouse embryos. *Dev. Biol.* 88, 297-311.
- OWENS E.M., SOLURSH M., 1982. Cell-cell interaction by mouse limb cells during *in vitro* chondrogenesis : analysis of the brachypod mutation. *Dev. Biol.*, 91, 376-388.
- OWENS E.M., SOLURSH M., 1983. Accelerated maturation of limb mesenchyme by the brachypod<sup>H</sup> mouse mutation. *Differentiation*, 24, 145-148.
- PARKER C.L., FINCH R.A., CRAIG HOOPER W., 1978. The effect of cytochalasin B on chondrogenesis in chick limb-bud mesoderm cells grown *in vitro*. *In vitro*, 14, 606-615.
- PAUTOU M.P., 1974. Evolution comparée de la nécrose morphogène interdigitale dans le pied de l'embryon de poulet et de canard. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 278, 2209-2212.
- PAUTOU M.P., 1976. La morphogenèse du pied de l'embryon de poulet étudiée à l'aide de malformations provoquées par le vert Janus. *J. Embryol. exp. Morph.* 35, 649-665.
- PAUTOU M.P., 1977. Dorso-ventral axis determination of chick limb bud development. Dans : D.A. EDE, J.R. HINCHLIFFE et M. BALLS (Eds), *Vertebrate Limb and somite Morphogenesis*. 257-266. Cambridge University Press, Cambridge.
- PAUTOU M.P., KIENY M., 1973. Interaction ecto-mésodermique dans l'établissement de la polarité dorso-ventrale du pied de l'embryon de poulet. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 227, 1225-1228.
- PINOT M., 1970. Le rôle du mésoderme somitique dans la morphogenèse précoce des membres de l'embryon de Poulet. *J. Embryol. exp. Morph.* 23, 109-151.
- PRATT R.M., PERRY E.L., CHAPMAN L.M., GOULDING E.H., 1984. Glucocorticoid teratogenesis in mouse whole embryo culture. *Teratology*. 30, 71-81.

- PUCHTLER H., WALDROP F.S., MELOAN S.N., TERRY M.S., CONNER H.M., 1970. Methacarn (Methanol-Carnoy) fixation. Practical and theoretical considerations. *Histochemie*. 21, 97-116.
- RAYNAUD A., 1976. Les différentes modalités de la rudimentation des membres chez les embryons de reptiles serpentiformes. Dans : Mécanismes de la rudimentation des organes chez les embryons de Vertébrés. 201-219. Editions du C.N.R.S. Paris.
- RAYNAUD A., 1977. Somites and early morphogenesis of reptile limbs. Dans: D.A. EDE, J.R. HINCHLIFFE et M. BALLS (Eds) ,Vertebrate and Somite Morphogenesis. 373-385. Cambridge University Press, Cambridge.
- REITER R., SOLURSH M., 1982. Mitogenic property of the apical ectodermal ridge. *Dev. Biol.* 93, 28-35.
- REVILLION-CARETTE F., 1986. Contribution à l'étude des effets du db AMPc sur la chondrogenèse dans l'ébauche embryonnaire de membre de souris *in vitro*. Thèse de Doctorat d'Université. Université des Sciences et Techniques de Lille.
- REVILLION-CARETTE F., DESBIENS X., DEUDON E., MEUNIER L., 1987. Chondrogenesis in mouse limb buds *in vitro*. III. Effects of ectoderm and dibutyryl cyclic AMP treatment on the monomeric and aggregate proteoglycans. *Biol. Cell.* soumis.
- REVILLION-CARETTE F., DESBIENS X., MEUNIER L., BART A., 1986. Chondrogenesis in mouse limb buds *in vitro* : Effects of dibutyryl cyclic AMP treatment. *Differentiation* 33, 121-129.
- RICHMOND A., ELMER W.A., 1980. Purification of a mouse embryo extract component which enhances chondrogenesis *in vitro*. *Dev. Biol.* 76, 366-383.
- ROUGHLEY P.J. DICKSON I.R., 1986. A comparison of proteoglycan from chick cartilage of different types and a study of the effect of vitamin D on proteoglycan structure. *Connect. Tissue Res.* 14, 187-197.
- ROWE D.A., FALLON J.F., 1982. The proximo distal determination of skeletal parts in the developing chick leg. *J. Embryol. exp. Morph.* 68, 1-7.
- ROWE D.A., FALLON J.F., 1982. Normal anterior pattern formation after barrier placement in the chick leg : further evidence on the action of polarizing zone. *J. Embryol. exp. Morph.* 69, 1-6.
- ROWE D.A., CAIRNS J.M., FALLON J.F., 1982. Spatial and temporal patterns of cell death in limb bud mesoderm after apical ectodermal ridge removal. *Dev. Biol.* 93, 83-91.
- ROYAL P.D., GOETINCK P.F., 1977. *In vitro* chondrogenesis in mouse limb mesenchymal cells ; changes in ultrastructure and proteoglycan synthesis. *J. Embryol. exp. Morph.* 39, 79-95.
- ROYAL P.D., SPARKS K.J., GOETINCK P.F., 1980. Physical and immunochemical characterization of proteoglycans synthesized during chondrogenesis in the chick embryo. *J. Biol. Chem.* 255, 9870-9878.
- SAARNI H., TAMMI M., 1977. A rapid method for separation and assay of radio labeled mucopolysaccharides from cell culture medium. *Anal. Biochem.* 81, 40-46.
- SAN ANTONIO J.D., TUAN R.S., 1986. Chondrogenesis of limb bud mesenchyme *in vitro* : stimulation by cations. *Dev. Biol.* 115, 313-324.
- SANDERS E.J. 1983. Recent progress towards understanding the roles of the basement membrane in development. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61, 949-956.
- SASSE J., HORWITZ A., PACIFICI M., HOLTZER H., 1984. Separation of precursor myogenic and chondrogenic cells in early limb bud mesenchyme by a monoclonal antibody. *J. Cell Biol.* 99, 1856-1866.
- SAUNDERS J.W. Jr., 1948. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J. Exp. Zool.* 108, 363-403.
- SAUNDERS J.W. Jr., GASSELING M.T., 1963. Trans-filter propagation of apical ectoderm maintenance factor in the chick embryo wing bud. *Dev. Biol.* 7, 64-78.
- SAUNDERS J.W. Jr., GASSELING M.T., 1968. Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. Dans : Epithelial-Mesenchymal Interactions. 78-97. Baltimore, Maryland : Williams and Wilkins.

- SAUNDERS J.W. Jr., GASSELING M.T., SAUNDERS L.C., 1962. Cellular death in morphogenesis of the avian wing. *Dev. Biol.* 5, 147-178.
- SCADDING S.R., MADEN M., 1986a. Comparison of the effects of vitamin A on limb development and regeneration in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *J. Embryol. exp. Morph.* 91, 19-34.
- SCADDING S.R., MADEN M., 1986b. Comparison of the effects of vitamin A on limb development and regeneration in *Xenopus laevis* tadpoles. *J. Embryol. exp. Morph.* 91, 35-53.
- SCADDING S.R., MADEN M., 1986c. The effects of local application of retinoic acid on limb development and regeneration in tadpoles of *Xenopus laevis*. *J. Embryol. exp. Morph.* 91, 55-63.
- SEARLS R.L., 1983. Evidence for inherent morphogenetic properties of myogenic regions of the embryonic chick wing. *J. Exp. Zool.* 226, 59-73.
- SEARLS R.L., JANNERS M.Y., 1971. The initiation of limb bud outgrowth in the embryonic chick. *Dev. Biol.* 24, 198-213.
- SEARLS R.L., SMITH A.A., 1982. Evidence that ectoderm influences the differentiation of muscle in the limb of the embryonic chick. *J. Exp. Zool.* 220, 343-351.
- SHEPARD T.H., BASS G.L., 1970. Organ culture of limb buds from riboflavin-deficient and normal rat embryos in normal and riboflavin-deficient media. *Teratology.* 3, 163-168.
- SHUR B.D., VOGLER M., KOSHER R.A., 1982. Changes in endogenous cell surface galactosyltransferase activity during *in vitro* limb bud chondrogenesis. *Exp. Cell Res.* 137, 229-237.
- SILVER M.H., FOIDART J.M., PRATT R.M., 1981. Distribution of fibronectin and collagen during mouse limb and palate development. *Differentiation.* 18, 141-149.
- SINGLEY C.T., SOLURSH M., 1980. The use of tannic acid for the ultrastructural visualization of hyaluronic acid. *Histochemistry.* 65, 93-102.
- SINGLEY C.T., SOLURSH M., 1981. The spatial distribution of hyaluronic acid and mesenchymal condensation in the embryonic chick wing. *Dev. Biol.* 84, 102-120.
- SÖDERSTRÖM K.O., MALMI R., KARJALAINEN K., 1984. Binding of fluorescein isothiocyanate conjugated lectins to rat spermatogenic cells in tissue sections. Enhancement of lectin fluorescence obtained by fixation in Bouin's fluid. *Histochemistry.* 80, 475-479.
- SOLURSH M., 1984. Ectoderm as a determinant of early tissue pattern in the limb bud. *Cell Differ.* 15, 17-24.
- SOLURSH M., REITER R.S., 1975. Determination of limb bud chondrocytes during a transient block of the cell cycle. *Cell Differ.* 4, 131-137.
- SOLURSH M., REITER R.S., 1980. Evidence for histogenic interactions during *in vitro* limb chondrogenesis. *Dev. Biol.* 78, 141-150.
- SOLURSH M., FISHER M., SINGLEY C.T., 1979. The synthesis of hyaluronic acid by ectoderm during early organogenesis in the chick embryo. *Differentiation.* 14, 77-85.
- SOLURSH M., LINSENMAYER T.F., JENSEN K.L., 1982. Chondrogenesis from single limb mesenchyme cells. *Dev. Biol.* 94, 259-264.
- SOLURSH M., SINGLEY C.T., REITER R.S., 1981. The influence of epithelia on cartilage and loose connective tissue formation by limb mesenchyme cultures. *Develop. Biol.* 86, 471-482.
- SOLURSH M., HARDINGHAM T.E., HASCALL V.C., KIMURA J.H., 1980. Separate effects of exogenous hyaluronic acid on proteoglycan synthesis and deposition in pericellular matrix by cultured chick embryo limb chondrocytes. *Dev. Biol.* 75, 121-129.
- SOLURSH M., REITER R.S., AHRENS P.B., PRATT R.M., 1979. Increase in level of cyclic AMP during avian limb chondrogenesis *in vitro*. *Differentiation* 15, 183-186.
- SOLURSH M., REITER R.S., AHRENS P.B., VERTEL B.M., 1981. Stage and position related changes in chondrogenic response of chick embryonic wing mesenchyme to treatment with dibutyryl cyclic AMP. *Dev. Biol.* 83, 9-19.

- SOLURSH M., JENSEN K.L., REITER R.S., SCHMID M., LINSENMEYER T.F., 1986. Environmental regulation of type X collagen production by cultures of limb mesenchyme, mesectoderm, and sternal chondrocytes. *Dev. Biol.* 117, 90-101.
- SOLURSH M., JENSEN K.L., SINGLEY C.T., LINSENMEYER T.F., REITER R.S., 1982. Two distinct regulatory steps in cartilage differentiation. *Dev. Biol.* 94, 311-325.
- SOLURSH M., JENSEN K.L., ZANETTI N.C., LINSENMEYER T.F., REITER R.S., 1984. Extracellular matrix mediates epithelial effects on chondrogenesis *in vitro*. *Dev. Biol.* 105, 451-457.
- STARK R., SEARLS R., 1973. A description of chick wing bud development and a model of limb morphogenesis. *Dev. Biol.* 33, 138-153.
- STEELE L.E., TRASLER D.G., NEW D.A.T., 1983. An *in vivo/in vitro* evaluation of the teratogenic action of excess vitamin A. *Teratology.* 28, 209-214.
- STOCUM D.L., 1984. The urodele limb regeneration blastema. Determination and organization of the morphogenetic field. *Differentiation.* 27, 13-28.
- STOCUM D.L., DAVIS R.M., LEGER M., CONRAD H.E., 1979. Development of the tibiotarsus in the chick embryo : biosynthetic activities of histologically distinct regions. *J. Embryol. exp. Morph.* 54, 155-170.
- SUMMERBELL D., 1974. Interaction between the proximo-distal and antero-posterior coordinates of positional value during the specification of positional information in the early development of the chick limb bud. *J. Embryol. exp. Morph.* 32, 227-237.
- SUMMERBELL D., 1977. Reduction of the rate of outgrowth, cell density, and cell division following removal of the apical ectodermal ridge of the chick limb-bud. *J. Embryol. exp. Morph.* 40, 1-21.
- SUMMERBELL D., 1979. The zone of polarizing activity : evidence for a role in normal chick limb morphogenesis. *J. Embryol. exp. Morph.* 50, 217-233.
- SUMMERBELL D., 1981. Evidence for regulation of growth, size and pattern in the developing chick limb bud. *J. Embryol. exp. Morph.* 65, 129-150.
- SUMMERBELL D., 1983. The effect of local application of retinoic acid to the anterior margin of the developing chick limb. *J. Embryol. exp. Morph.* 78, 269-289.
- SUMMERBELL D., HARVEY F., 1983. Vitamin A and the control of pattern in developing limbs. Dans : R.O. KELLEY, P.F. GOETINCK, J.A. MAC CABE (Eds), *Limb Development and Regeneration. Part A.* 109-118. Alan R. Liss, Inc., New-York.
- SUMMERBELL D., LEWIS J.H., 1975. Time, place and positional value in the chick limb bud. *J. Embryol. exp. Morph.* 33, 621-643.
- SUMMERBELL D., WOLPERT L., 1972. Cell density and cell division in the early morphogenesis of the chick wing. *Nature.* 238, 24-26.
- SUMMERBELL D., LEWIS J.H., WOLPERT L., 1973. Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature.* 244, 492-496.
- SWALLA B.J., SOLURSH M., 1984. Inhibition of limb chondrogenesis by fibronectin. *Differentiation.* 26, 42-48.
- SWALLA B.J., OWENS E.M., LINSENMEYER T.F., SOLURSH M., 1983. Two distinct classes of prechondrogenic cell types in the embryonic limb bud. *Dev. Biol.* 97, 59-69.
- SWANSON G.J., LEWIS J., 1982. The timetable of innervation and its control in the chick wing bud. *J. Embryol. exp. Morph.* 71, 121-137.
- TAKAI Y., MURASE N., HOSAKA M., SUMITOMO S., NODA Y., MORI M., 1986. Comparison of lectin binding patterns in salivary glands of mice and rats with special reference to different fixative used. *Acta Histochem.* 78, 31-47.
- TAKEDA M., IWATA H., SUZUKI S., BROWN K.S., KIMATA K., 1986. Correction of abnormal matrix formed by cmd/cmd chondrocytes in culture by exogenously added cartilage proteoglycan. *J. Cell Biol.* 103, 1605-1614.
- TANK P.W., CARLSON B.M., CONNELLY T.G., 1977. A scanning electron microscopic comparison of the development of embryonic and regenerating limbs in the Axolotl. *J. Exp. Zool.* 201, 417-430.

- TARIN D., STURDEE A.P., 1971. Early limb development of *Xenopus laevis*. J. Embryol. exp. Morph. 26, 169-179.
- TARIN D., STURDEE A.P., 1974. Ultrastructural features of ectodermal-mesenchymal relationships in the developing limb of *Xenopus laevis*. J. Embryol. exp. Morph. 31, 287-303.
- THAL G., SASSE J., HOLTZER H., PACIFICI M., 1986. Differential survival of cartilage and muscle cells in chick limb bud cell cultures maintained in chemically defined and serum-containing media. Differentiation. 31, 20-28.
- THEILER K., 1972. The house mouse. Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New-York.
- THESLEFF I., LEHTONEN E., SAXEN L., 1978. Basement membrane formation in transfilter tooth culture and its relation to odontoblast differentiation. Differentiation. 10, 71-79.
- THOROGOOD P.V., HINCHLIFFE J.R., 1975. An analysis of condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb. J. Embryol. exp. Morph. 33, 581-606.
- THOMS S.D., STOCUM D.L., 1984. Retinoic acid-induced pattern duplication in regenerating Urodele limbs. Dev. Biol. 103, 319-328.
- TICKLE C., 1981. The number of polarizing region cells required to specify additional digits in the developing chick wing. Nature. 289, 295-298.
- TICKLE C., 1983. Positional signalling by retinoic acid in the developing chick wing. Dans : R.O. KELLEY, P.F. GOETINCK et J.A. MAC CABE (Eds), Limb Development and Regeneration. Part A. 89-98. Alan R. Liss, Inc., New-York.
- TICKLE C., ALBERTS B.M., WOLPERT L., LEE J., 1982. Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. Nature. 296, 564-565.
- TICKLE C., LEE J., EICHELE G., 1985. A quantitative analysis of the effect of all-trans-retinoic acid on the pattern of chick wing development. Dev. Biol. 109, 82-95.
- TICKLE C., SUMMERBELL D., WOLPERT L., 1975. Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. Nature. 254, 199-202.
- TICKLE C., SHELLSWELL G., CRAWLEY A., WOLPERT L., 1976. Positional signalling by mouse limb polarizing region in the chick wing bud. Nature. 259, 396-397.
- TOMASEK J.J., HAAKSMA C.J. NEWMAN S.A., 1980. Regional differences in the ultrastructure of the ectodermal basal lamina during amniote limb development. J. Cell Biol. 87, 927.
- TOMASEK J.J., MAZURKIEWICZ J.E., NEWMAN S.A., 1982. Non uniform distribution of fibronectin during avian limb development. Dev. Biol. 90, 118-126.
- TOOLE B.P., 1981. Glycosaminoglycans in morphogenesis. Dans : E.D. HAY (Ed), Cell Biology of Extracellular matrix. 259-294. Plenum Press, New-York.
- TOOLE B.P. JACKSON G., GROSS J., 1972. Hyaluronate in morphogenesis : Inhibition of chondrogenesis *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69, 1384-1386.
- TOOLE B.P., GOLDBERG R.L., CHI-ROSSO G., UNDERHILL C.B., ORKIN R.W., 1984. Hyaluronate-cell interactions. Dans R.L. TRELSTAD (Ed.), The role of extracellular matrix in development. 43-66. Alan R. Liss, Inc., New-York.
- TROWELL O., 1954. A modified technique for organ culture *in vitro*. Exp. Cell Res. 6, 246-248.
- TSCHUMI P.A., 1957. The growth of the hindlimb bud of *Xenopus laevis* and its dependence upon the epidermis. J. Anat. 91, 149-173.
- UMANSKY R., 1966. The effect of cell population density on the developmental fate of reaggregating mouse limb mesenchyme. Dev. Biol. 13, 31-56.
- VASAN N.S., 1981. Proteoglycan synthesis by sternal chondrocytes perturbed with vitamin A. J. Embryol. exp. Morph. 63, 181-191.
- VASAN N.S., LASH J.W., 1979. Monomeric and aggregate proteoglycans in the chondrogenic differentiation of embryonic chick limb buds. J. Embryol. exp. Morph. 49, 47-59.

- VASAN N.S., MILLER E., 1985. Somite chondrogenesis *in vitro* : Differential induction by modified matrix-a biochemical and morphological study. *Develop. Growth and Differ.* 27, 405-417.
- VERTEL B.M., DORFMAN A., 1978. An immunohistochemical study of extracellular matrix formation during chondrogenesis. *Dev. Biol.* 62, 1-12.
- VETHAMANY-GLOBUS S., GLOBUS M., TOMLINSON B., 1978. Neural and hormonal stimulation of DNA and protein synthesis in cultured regeneration blastemata in the newt, *Notophthalmus viridescens*. *Dev. Biol.* 65, 183-192.
- VETHAMANY-GLOBUS S., GLOBUS M., DARCH A., MILTON G., TOMLINSON B.L., 1984. *In vitro* effects of insulin on macromolecular events in newt limb regeneration blastemata. *J. Exp. Zool.* 231, 63-74.
- VOGEL K.G., DOLDE J., 1979. Cell surface glycosaminoglycans are not released from human diploid fibroblasts by non-enzymatic methods. *Biochim. Biophys. Acta.* 552, 194-200.
- VON DER MARK H., VON DER MARK K., GAY S., 1976. Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluorescence. I. Preparation of type I and type II specific antibodies and their application to early stages of the chick embryo. *Dev. Biol.* 48, 237-249.
- WACHTLER F., CHRIST B., JACOB H.J., 1981. On the determination of mesodermal tissues in the avian embryonic wing bud. *Anat. Embryol.* 161, 283-290.
- WACHTLER F., CHRIST B., JACOB H.J., 1982. Grafting experiments on determination and migratory behaviour of presomitic and somatopleural cells in avian embryos. *Anat. Embryol.* 164, 369-378.
- WOLFF E. HAFFEN K., 1952. Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*. *Texas Rep. Biol. Med.* 10, 463-472.
- YAMAMURA H., NISHIMURA H., OKADA T., 1966. The effect of thio-TEPA on the fore limb buds of mouse embryos observed *in vitro*. *Acta Anatomica Nipponica.* 41, 259-267.
- YASUDA Y., 1973. Differentiation of human limb buds *in vitro*. *Anat. Rec.* 175, 561-578.
- ZANETTI N.C., SOLURSH M., 1984. Induction of chondrogenesis in limb mesenchymal cultures by disruption of actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 99, 115-123.
- ZANETTI N.C., SOLURSH M., 1986. Epithelial effects on limb chondrogenesis involve extracellular matrix and cell shape. *Dev. Biol.* 113, 110-119.
- ZIMMERMANN B., 1986. Binding of various lectins during chondrogenesis in mouse limb buds. *Acta Histochem.* S32, 127-131.
- ZIMMERMANN B., THIES M., 1984. Alteration of lectin binding during chondrogenesis of mouse limb buds. *Histochemistry.* 81, 353-361.
- ZIMMERMANN B., SCHARLACH E., KAATZ R., 1982. Cell contact and surface coat alterations of limb bud mesenchymal cells during differentiation. *J. Embryol. exp. Morph.* 72, 1-18.
- ZWILLING E., 1956. Interaction between limb-bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. I. Axis establishment. *J. Exp. Zool.* 132, 157-172.
- ZWILLING E., HANSBOROUGH L., 1956. Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. III. Experiments with polydactylous limbs. *J. Exp. Zool.* 132, 219-239.

