

50376
1987
37

50376
1987
37

N° d'ordre 97

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES ARTOIS

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

Présentée par :
Philippe ALBERT

**CONTRIBUTION DE LA CULTURE DE CELLULES A L'ETUDE DU
CONTROLE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE AU COURS DE LA
REGENERATION DU MEMBRE D'AXOLOTL (AMPHIBIEN URODELE).**



Soutenue le 2 Avril 1987 devant la commission d'examen

Président :	M.	A. CAPURON
Rapporteurs :	MM.	D. BARRITAUULT - C. CHAPRON
Directeur de thèse :	M.	B. BOILLY
Examineurs :	Mme.	M. COLLYN d'HOOGHE - M. H.J. ANTON.

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

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

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

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

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

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

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie

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

PROFESSEURS - 2ème Classe

M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CAYATTE Jean-Louis	Sciences économiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean-Jacques	Biologie
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences économiques
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean-Paul	Spectrométrie des solides
M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographi-
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphé- riques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GREGORY Pierre	I.P.A.
M. GREMY Jean-Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne

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

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Morphogenèse Animale de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois (C.N.R.S. UA 685) sous la responsabilité de Monsieur le Professeur B. BOILLY.

Je voudrais tout particulièrement exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur B. BOILLY qui a eu la patience et l'amabilité de diriger mon travail durant ces quatre années.

Je remercie vivement le Dr B. LASSALLE pour sa disponibilité et ses précieux conseils qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

Que Monsieur le Professeur A. CAPURON, Laboratoire de Morphogenèse Animale de Lille, soit remercié pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse, ainsi que Messieurs les Professeurs C. CHAPRON, Laboratoire de Neurobiologie du développement de l'Université de Bordeaux et D. BARRITAU, Laboratoire de Biotechnologie des cellules Eucaryotes de l'Université de Paris XII, qui ont accepté la charge de rapporteurs.

Je tiens aussi à exprimer mes sincères remerciements à Madame le Docteur M. COLLYN d'HOOGHE de l'Institut de recherches sur le Cancer de Lille ainsi qu'à Monsieur le Professeur H.J. ANTON de l'Université de Cologne qui ont bien voulu examiner mon travail.

Je remercie également Mademoiselle A. ROUSSEAU et Madame L. MEUNIER pour l'indispensable aide technique qu'elles m'ont apportée ainsi que Monsieur F. CHUIN qui s'est occupé de l'entretien des élevages.

Je ne saurais oublier Madame F. PIERRON pour la frappe et la mise en page de cette thèse.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION	p. 1
MATERIEL ET TECHNIQUES	p. 6
I - Techniques opératoires	p. 7
II - Conditions de culture	p. 8
III - Techniques d'observation	p. 8
IV - Mesure de l'activité prolifératrice	p. 8
V - Utilisation des inducteurs mitogènes	p. 9
VI - Dosage des protéines	p. 9
CHAPITRE I	p. 11
I. - INTRODUCTION	p. 12
II. - TECHNIQUES	p. 12
III. - RESULTATS	p. 13
A) Description du mésenchyme blastémal au moment du prélèvement.	p. 13
B) Evolution du mésenchyme blastémal au cours de la culture.	p. 13
1) Culture en l'absence d'extrait embryonnaire.	p. 13
2) Culture en présence d'extraits embryonnaires.	p. 18
C) Influence de l'insuline sur la prolifération des cellules blastémales <i>in vitro</i>	p. 18

IV. - DISCUSSION	p. 19
CHAPITRE II	p. 23
I. - INTRODUCTION	p. 24
II. - TECHNIQUES	p. 25
III. - RESULTATS	p. 26
A) Influence du liquide de Ringer de la gammaglobuline bovine	p. 26
B) Influence d'extraits nerveux hétérologues.	p. 27
C) Influence d'extraits nerveux homologues.	p. 29
1) Extrait nerveux provenant de moelle épinière d'Axolotl non amputés.	p. 29
2) Extrait nerveux provenant de moelle épinière d'Axolotl amputés et de même âge.	p. 30
3) Extrait nerveux provenant de moelle épinière d'Axolotl amputés et d'âges différents.	p. 31
IV. - DISCUSSION	p. 33
A) Stimulation de la prolifération de cellules blastémales par des extraits nerveux.	p. 33
B) Modulation de l'effet mitogène des extraits nerveux au cours de la régénération.	p. 35
CHAPITRE III	p. 37
I. - INTRODUCTION	p. 38
II. - TECHNIQUES	p. 38

A) Préparation des facteurs de croissance	p. 38
B) Utilisation des facteurs de croissance	p. 39
III. - RESULTATS	p. 39
A) Utilisation des facteurs de croissance non associés à l'héparine	p. 39
1) EDGF 0,1N	p. 39
2) EDGF I	p. 40
3) EDGF II	p. 41
B) Utilisation des facteurs de croissance associés à l'héparine.	p. 42
IV. - DISCUSSION	p. 46
A) Effets de l'EDGF sur la prolifération des cellules mésenchymateuses.	p. 46
B) Effets de l'héparine	p. 49
CHAPITRE IV	p. 52
I. - INTRODUCTION	p. 53
II. - TECHNIQUES	p. 53
III. - RESULTATS	p. 54
1) Influence de la transferrine sur la prolifération des cellules mésenchymateuses de blastème.	p. 54
2) Influence d'un enrichissement du milieu de culture en FeCl₃ sur la prolifération des cellules mésenchymateuses de blastème.	p. 55
IV. - DISCUSSION	p. 56

CHAPITRE V	p. 59
I. - INTRODUCTION	p. 60
II. - TECHNIQUES	p. 60
III. - RESULTATS	p. 61
A) Influence de l'extrait d'épiderme blastémal	p. 63
B) Influence de l'extrait de mésenchyme blastémal	p. 64
C) Influence de l'extrait de blastème complet	p. 65
IV. - DISCUSSION	p. 66
1) Influence d'un extrait d'épiderme blastémal	p. 66
2) Influence d'extraits de mésenchyme et de blastème complet.	p. 68
CONCLUSION GENERALE	p. 70
BIBLIOGRAPHIE	p. 74

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La faculté de certains animaux à régénérer leurs appendices perdus après autotomie ou amputation est très inégalement répartie dans le règne animal. Fréquente chez les Invertébrés, elle ne se rencontre chez les Vertébrés que chez les Poissons, les Amphibiens et quelques Reptiles. L'absence de pouvoir de régénération des Oiseaux et des Mammifères intrigue depuis toujours les spécialistes de la régénération dont certains nourrissent le secret espoir de restaurer cette propriété remarquable des êtres moins évolués. C'est l'une des raisons qui a fait que les Amphibiens ont retenu depuis longtemps l'attention des chercheurs. En effet, ce groupe comporte des espèces capables de régénérer leurs appendices (Urodèles) alors que d'autres perdent cette propriété lors de la métamorphose (Anoures). D'autre part, les Amphibiens présentent un certain nombre de facilités expérimentales qui ont permis d'accumuler un grand nombre de données sur ce problème, notamment en ce qui concerne la régénération du membre (Revue dans Wallace, 1981). Après amputation, la régénération du membre procède à partir de cellules mésenchymateuses issues de la souche qui s'accumulent sous l'épiderme cicatriciel ; leur intense prolifération permettra la mise en place d'un blastème (Fig 0a) qui différenciera, ultérieurement, tous les éléments de la partie amputée (Fig 0b).

La prolifération cellulaire constitue une des conditions essentielles de la régénération ; la recherche des facteurs contrôlant celle-ci constitue donc un enjeu important dans l'étude du mécanisme de la régénération. Chez les Urodèles, deux facteurs essentiels à la prolifération des cellules blastémales, l'un d'origine nerveuse, l'autre blastémal (capé épidermique) interviennent dans ce phénomène. On sait en effet depuis longtemps (Todd, 1823) que la prolifération des cellules blastémales est sous la dépendance d'un facteur ("facteur neurotrophique") émanant des nerfs brachiaux sectionnés lors de l'amputation (Revue dans Singer, 1974 et 1978 ; Geraudie et Singer, 1984 ; Carlone et Mescher, 1985), facteur dont on sait qu'il maintient les cellules en cycle (Tassava et Olsen, 1985 ; Boilly et al, 1985b ; Boilly et al, 1986). Produit par tous les types de fibres nerveuses

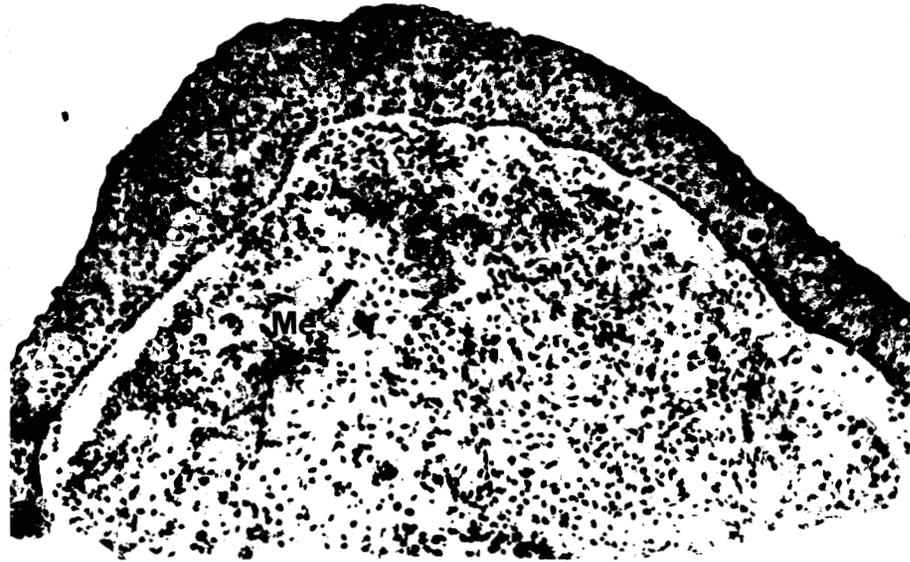


Fig. 0a. Coupe d'un blastème de régénération (stade cône) d'Axolotl. Le mésenchyme (Me) constitue un important massif cellulaire sous-jacent à la cape épidermique (Ep.). Coloration picro indigo carmin.

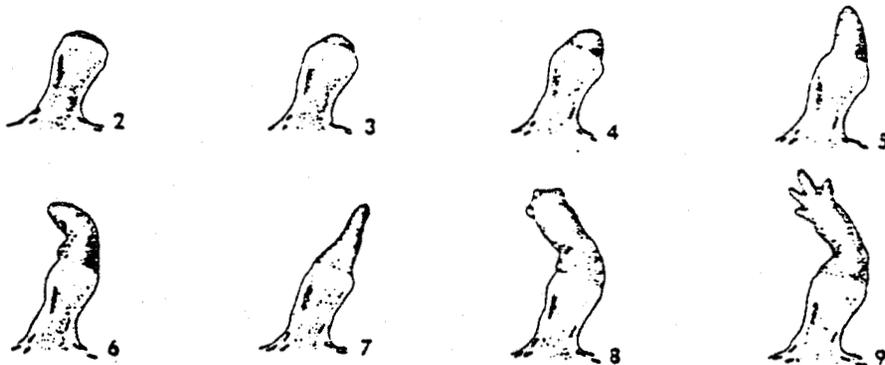


Fig. 0b. Morphologie externe des régénérats en croissance après l'amputation du membre antérieur, chez *Triturus viridescens* (selon Singer, 1973).

2 et 3 - début de formation du blastème ; 4 - stade cône précoce ; 5 - stade cône ; 6 et 7 - stades palette ; 8 - apparition des doigts ; 9 - régénérat complet.

(motrices, sensorielles, sympathiques) et capable d'agir à distance, ce "facteur neurotrophique" apparaît indispensable pendant les premières phases de la régénération (phase dépendante du système nerveux) ; au-delà de celles-ci, correspondant au stade cône âgé, la régénération peut se poursuivre en l'absence de système nerveux (phase indépendante du système nerveux) ; toutefois, le régénérat édifié dans ces conditions reste de petite taille bien que morphologiquement identique à un régénérat normal (membre miniature). Le "facteur neurotrophique", de nature polypeptidique, n'a pas encore été isolé.

Bien que jouant un rôle fondamental dans la régénération, le système nerveux ne contrôle pas la prolifération de l'ensemble des cellules blastémales. En effet, si la dénervation entraîne une diminution d'environ 60% des synthèses concernées par la prolifération (Boilly et al, 1985a), suffisante pour bloquer la régénération, il n'en est pas moins vrai que 40% de celles-ci lui échappent. On sait par ailleurs que la présence de la cape épidermique est indispensable au déroulement normal de la régénération. Le remplacement de celle-ci par de la peau différenciée (revue dans Stocum, 1985) entraîne en effet l'arrêt de la régénération. Plus récemment, Globus et al (1980) a pu montrer sur blastèmes isolés que l'absence de cape épidermique entraîne une diminution significative (de 60 à 80%) de la prolifération des cellules blastémales et corrélativement une accélération des processus de différenciation cartilagineuse. Toutefois, rien n'est connu à ce jour sur la nature de ce que Globus appelle "signal de division" produit par la cape épidermique.

Les recherches relatives à la découverte de la nature des facteurs contrôlant la prolifération des cellules blastémales n'ont concerné jusqu'à présent que le "facteur neurotrophique". Elles ont consisté à éprouver l'activité mitogène d'extraits nerveux ou de divers facteurs de croissance soit *in vivo* sur des blastèmes de membres dénervés soit *in vitro* sur des blastèmes isolés. Aucun de ces deux systèmes expérimentaux ne semble pleinement satisfaisant. *In vivo*, il est nécessaire d'utiliser des quantités importantes des substances à tester ; d'autre part, il est particulièrement difficile de contrôler ce qui est administré rendant l'interprétation des résultats particulièrement délicate. En outre, compte tenu de la régénération nerveuse, il est nécessaire de dénervé régulièrement le membre créant ainsi des traumatismes répétés chez l'animal qui peuvent engendrer des réactions inflammatoires plus ou moins importantes, réactions dont on sait qu'elles peuvent interférer avec la régénération

(Sicard, 1985). L'utilisation de blastèmes cultivés *in vitro* constitue par contre une situation plus favorable mais n'est cependant pas dépourvue d'inconvénients. En particulier, l'épiderme blastémal apparaît beaucoup moins sensible *in vitro* à la dénervation qu'*in vivo* (Lassalle et al, 1985b ; Oudkhir et al, 1986) : la réactivité du blastème à des substances mitogènes s'en trouvera donc amoindrie si la mesure de l'activité prolifératrice est effectuée sur l'ensemble du blastème. D'autre part, l'épiderme peut migrer sur la surface d'amputation du blastème et entourer complètement le massif mésenchymateux : dans ces conditions, les cellules mésenchymateuses peuvent se nécroser (Lassalle, 1983) ce qui limitera d'autant la réactivité du blastème aux facteurs mitogènes. Ces deux types de bioessais (*in vivo* et culture de blastèmes) ne permettent pas, par ailleurs, l'étude de l'influence nerveuse en l'absence de cape épidermique car les blastèmes dépourvus de cette dernière, ou sont rapidement réépidermisés (*in vivo*) ou ne survivent pas longtemps (culture de blastèmes). Enfin, la nécessité d'utiliser des techniques histologiques pour apprécier l'action de ces facteurs au niveau cellulaire et de disposer d'un très grand nombre d'animaux constituent des handicaps importants lorsqu'il est nécessaire d'effectuer de très nombreux tests sur des périodes courtes.

Ces différentes raisons nous ont conduit à utiliser la culture de cellules pour étudier les facteurs de contrôle de la prolifération cellulaire des blastèmes. Afin de travailler sur des cellules qui conservent au mieux leurs caractères de cellules blastémales, nous avons utilisé uniquement des cultures primaires. D'autre part, seules les cellules mésenchymateuses ont été utilisées car il a été montré (Boilly et al, 1985a) qu'elles sont plus sensibles que celles de la cape épidermique, au "facteur neurotrophique" et que par ailleurs, elles sont la cible du "signal de division" émanant de la cape épidermique.

Nous décrirons d'abord dans ce mémoire le comportement des cellules mésenchymateuses de blastème cultivées *in vitro* (Chapitre I) puis nous analyserons la réponse de ces cellules en présence d'extraits nerveux (Chapitre II), de facteurs mitogènes purifiés à partir du tissu nerveux (Chapitre III et IV) et enfin d'extrait de cape épidermique (Chapitre V).

MATERIEL ET TECHNIQUES

MATERIEL ET TECHNIQUES

I - Techniques opératoires

Nous avons utilisé des larves d'Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) élevées au laboratoire à la température de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ dans l'eau du robinet ; elles sont nourries à l'aide de larves de chironome et de foie de boeuf haché.

Les animaux âgés de 9 à 15 mois (7 cm à 9 cm de longueur, queue non comprise) sont amputés sous anesthésie (MS222 Sandoz à 1 ‰) au niveau du bras juste en arrière du coude et placés en groupe dans des cuvettes. Lorsque les blastèmes atteignent le stade cône (1 à 2 semaines environ après l'amputation) ils sont prélevés sous anesthésie à l'aide de ciseaux fins ; nous veillons toujours à ce que le niveau de prélèvement soit situé 1 à 2 mm au delà du plan d'amputation initial. Les blastèmes sont ensuite désinfectés dans 3 bains successifs de liquide de Ringer contenant de la pénicilline (175 U/ml) et de la streptomycine (175 $\mu\text{g/ml}$) (Eurobio). L'épiderme des blastèmes est alors séparé mécaniquement du mésenchyme à l'aide de pinces fines. Le massif mésenchymateux est récupéré et les cellules correspondantes isolées. Des expériences préalables ayant montré que les traitements enzymatiques utilisés pour libérer les cellules de leur matrice extracellulaire étaient néfastes, nous avons procédé à l'isolement de ces cellules par essaimage naturel à partir de l'explant. Le massif mésenchymateux est placé sur le fond d'une boîte de culture de 35 mm de diamètre contenant 0,5 ml de milieu ; deux massifs mésenchymateux sont placés dans chaque boîte à proximité l'un de l'autre. Afin de favoriser l'attachement et la migration des cellules, les massifs mésenchymateux sont recouverts d'une lamelle de verre, après avoir subi une légère dissociation mécanique à l'aide de fines pinces ; 24 h. après le dépôt des massifs mésenchymateux, on ajoute 1 ml du même milieu ; la lamelle recouvrant les explants est alors immergée

II - Conditions de culture

Le milieu de culture de base est constitué de MEM Earle (Seromed) dilué à 90 % contenant 0,28 U/ml d'insuline (Sigma), 2 mM L. glutamine (Sigma), 10^{-5} µg/ml de L Thyroxine (Sigma), 0,2 µg/ml de somatotropine (Sigma), 0,2 µg/ml d'hydrocortisone (Sigma), (ces trois hormones permettant une meilleure migration cellulaire) de la pénicilline (100 U/ml) et de la streptomycine (100 µg/ml). Ce milieu, tamponné par addition de NaHCO_3 , 2,2 mg/ml est ensuite passé à travers un filtre 0,45 µm (Millipore) ; son pH est voisin de 7,3 et la pression osmotique oscille entre 250 et 255 mOsm.

Les boîtes de culture ont été traitées ou non par de la gélatine à 1 % ou de la polylysine à 10 % . Le plastique non traité, ou le traitement à la gélatine ou à la poly L lysine se sont avérés peu propices à l'essaimage de cellules à partir de l'explant. Les boîtes traitées avec du collagène de type I (Cerad) ou Falcon type Primaria traitées pour primocultures ont par contre donné d'excellents résultats ; ces dernières ont été utilisées dans toutes nos cultures.

Les cultures sont menées pendant une durée de 16 jours dans une étuve maintenue à 25°C et dont l'atmosphère contient 2 % de CO_2 . Le milieu de culture est changé 2 fois par semaine .

III -Techniques d'observation

Le mésenchyme blastémal a été préalablement étudié au microscope photonique sur coupes (6 µm) de blastèmes colorés au micro-indigo carmin. Les cultures sont observées sur le vivant sur un microscope inversé à contraste de phase Diavert (Leitz) ou après fixation des cellules pendant 1 min. aux vapeurs d'osmium puis coloration pendant 3 minutes au Giemsa R (RAL) et rinçage à l'eau du robinet, ou au bleu Alcyan 0,5% pH 1 à 1,5.

IV -Mesure de l'activité prolifératrice

La synthèse de DNA a été visualisée sur des cultures incubées 24 h. en présence de 5 bromodéoxyuridine (5 BrdU) et de déoxycytidine puis fixée par de l'éthanol 75° à 5°C pendant 1 h. ; après dénaturation du DNA par incubation pendant 20 min. dans HCl 1,5 N à la température ambiante, la culture a été mise en contact avec un anticorps monoclonal anti-5 BrdU

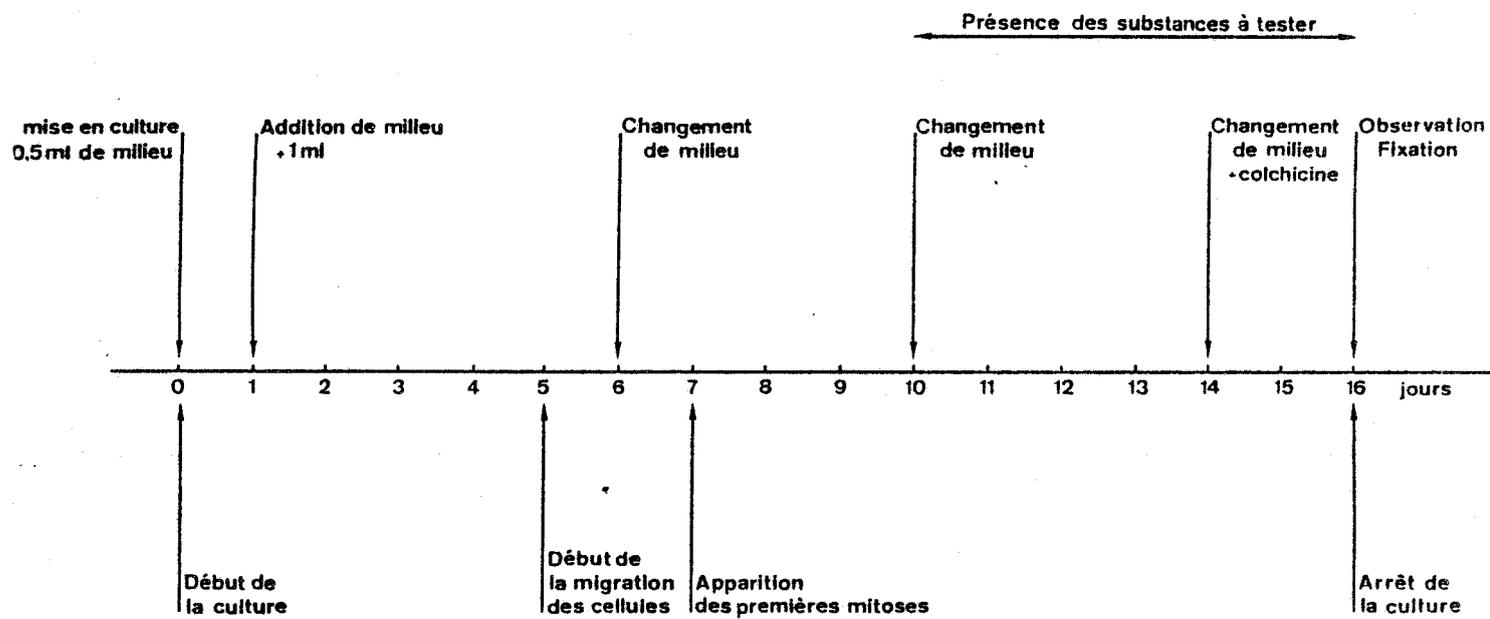


Fig. I. Protocole expérimental



(Partec) pendant 1 h à 37°C ; l'anti-5-BrdU a été révélé par immunofluorescence indirecte à l'aide d'un conjugué anti-souris IgG FITC (Sigma). Dans ces conditions, les cellules en phase S pendant la durée de l'incubation présentent un noyau dont la chromatine est fluorescente (Raza et al 1984, 1985).

La mesure de l'indice mitotique est réalisée au 16ème jour de culture après 48 h. de traitement à la colchicine (20 µg/ml) (Serva). Les cellules en mitose sont décomptées autour de l'explant dans les cellules ayant essaimé à partir de ce dernier ; cette numération est effectuée sur le vivant en contraste de phase, puis la culture est fixée et colorée et le nombre total de cellules ayant essaimé est alors compté : l'indice mitotique est représenté par le rapport du nombre de mitoses apparaissant pendant les 48 dernières heures de la culture sur le nombre total de cellules de la zone d'essaimage X 100, le calcul étant effectué sur un total de 7 à 10 boîtes de culture (soit 14 à 20 blastèmes). Les moyennes obtenues sont comparées et analysées à l'aide du test de Student. La signification des résultats est donnée aux risques 1% et 5%. Le nombre de cas pour chaque échantillon est indiqué dans les tableaux.

V - Utilisation des inducteurs mitogènes

Dans toutes nos expériences, excepté pour le sérum foetal de veau (SVF) et l'extrait embryonnaire de boeuf (EEB), l'inducteur mitogène à tester est ajouté au milieu de base 6 jours avant le terme de la culture. L'ultime changement de milieu s'effectue 48 H avant la fixation des cellules. Ce dernier milieu comprend alors le facteur mitogène à une dose strictement identique à celle utilisée précédemment, et la colchicine qui, par sa présence, bloquera les divisions cellulaires pendant 48 H (Fig 1).

VI - Dosage des protéines

Les protéines des différents extraits sont dosées selon la technique de Lowry et al (1951) modifiée par Markwell et al (1978). Les protéines sont colorées par le réactif de Folin en présence de cuivre en milieu alcalin. La coloration obtenue, qui est proportionnelle à la quantité de protéines, est mesurée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 660

nm. La courbe étalon est établie à partir d'une solution de sérum albumine bovine (SAB).

CHAPITRE I

OBTENTION ET UTILISATION DE LA CULTURE DE CELLULES MESENCHYMATEUSES DE BLASTEME DE REGENERATION

CHAPITRE I

OBTENTION ET UTILISATION DE LA CULTURE DE CELLULES MESENCHYMATEUSES DE BLASTÈME DE RÉGÉNÉRATION.

I. - INTRODUCTION

L'utilisation de la culture cellulaire dans la recherche des facteurs contrôlant la prolifération du blastème de régénération implique :

- que les conditions de culture permettent à des cellules blastémales isolées de manifester *in vitro* les mêmes potentialités qu'*in vivo*, c'est-à-dire qu'elles soient capables de proliférer activement et de se différencier ;

- que les cellules blastémales isolées soient susceptibles de réagir à des inducteurs mitogènes reconnus comme stimulant la prolifération de ces cellules. Parmi ces inducteurs, nous avons retenu l'insuline dont on sait qu'elle est capable d'augmenter significativement l'index mitotique du blastème de régénération.

Dans ce chapitre, nous décrivons les conditions de culture des cellules mésenchymateuses de blastème et leur évolution, notamment en ce qui concerne leur capacité prolifératrice en présence d'insuline.

II. - TECHNIQUES

La prolifération des cellules mésenchymateuses a été appréciée dans le milieu de base seul ou supplémenté par 10 % de sérum foetal de veau (Seromed)(SVF) ou 2,5 % d'extrait embryonnaire de boeuf (Gibco) (EEB) ; ces derniers ont été ajoutés dans le milieu de base dès la mise en culture. D'autre part, le rôle de l'insuline a été apprécié en l'absence de SVF ou de EEB ; dans tous les cas, l'insuline est ajoutée au milieu de culture de base 6 jours avant le terme de la culture.

Compte-tenu de la présence permanente de 0,28 U/ml d'insuline dans le milieu de base , l'addition de quantité croissante (de 0,14 à 0,56 U/ml)

d'insuline 6 jours avant le calcul de l'indice mitotique, met la culture en présence de concentrations d'insuline comprises entre 0,28 U/ml et 0,84 U/ml (respectivement 0,28 ; 0,42 ; 0,56 ; 0,63 ; 0,70 et 0,84 U/ml)

III. - RESULTATS

A) Description du mésenchyme blastémal au moment du prélèvement.

Au stade cône, le mésenchyme blastémal apparaît au microscope photonique comme étant constitué de nombreuses cellules ayant le même aspect histologique, disposées de façon désordonnée et le plus souvent noyées dans un matériel fibreux riche en collagène (fig.2). Des amas de cellules sanguines, notamment des érythrocytes, rompent la monotonie histologique du blastème ; à la périphérie, apparaissent des mélanocytes à longues ramifications cytoplasmiques. Les cellules mésenchymateuses présentent un noyau ovoïde caractérisé par une chromatine homogène et la présence de 2 nucléoles ; le cytoplasme apparaît homogène (fig 3); l'indice mitotique est de $2,26 \pm 0,80$.

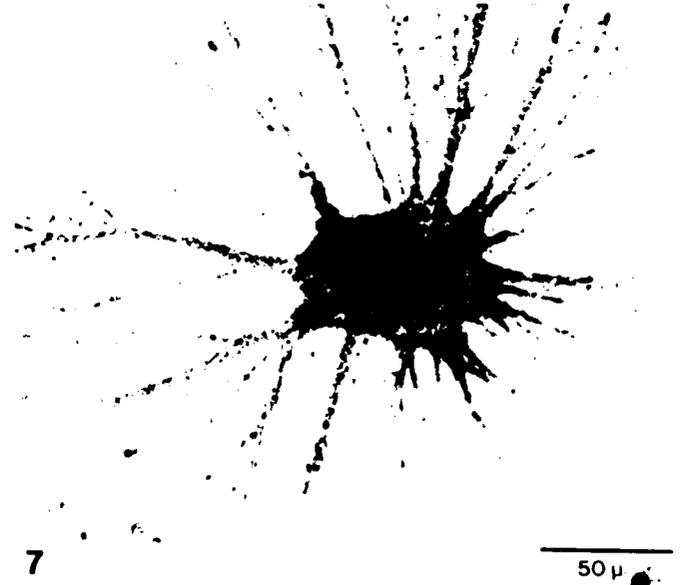
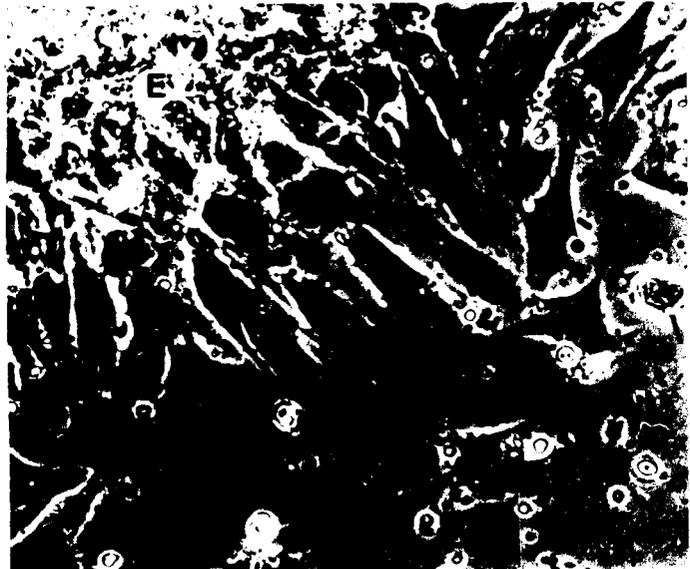
B) Evolution du mésenchyme blastémal au cours de la culture.

1) Culture en l'absence d'extrait embryonnaire.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés uniquement aux cellules essayant naturellement à partir d'un explant posé sur le fond de la boîte (cf techniques). Les premières cellules sortent de l'explant dès le 4ème jour suivant la mise en culture en particulier au niveau de la surface du blastème où la basale n'existe plus (fig.4); elles s'allongent d'abord radialement par rapport au blastème, serrées les unes contre les autres, puis se détachent de celui-ci ; elles peuvent alors rester en amas compacts ou s'isoler : elles adoptent dans ce cas une forme étoilée (fig.5). Il s'agit de cellules de grande taille ($20 \times 40 \mu\text{m}$) pourvues d'un noyau ovoïde à 2 nucléoles ; le cytoplasme apparaît homogène. On peut observer des mélanophores reconnaissables à leurs longs prolongements cytoplasmiques ; ces cellules sont les premières à sortir de l'explant (fig.6 et 7). A partir de ce stade le halo cellulaire entourant l'explant va s'étendre de plus en plus ; à 7/8 j. après la mise en culture, il constitue une couronne de 150 à 200 μm de largeur (fig. 8).

Dès le 7ème jour apparaissent des mitoses d'abord à la périphérie de

l'explant puis à l'intérieur du halo cellulaire (fig. 9). Parallèlement à la prolifération cellulaire qui va aller en s'amplifiant on assiste à des phases de différenciation. Des alignements cellulaires d'abord de 2 à 3 cellules puis plus, évoquant des myotubes apparaissent dès le 8/9ème jour mais leur fréquence reste toujours faible (fig. 10). Des nodules cartilagineux, reconnaissables à la disposition cellulaire concentrique (fig. 11) et la coloration Bleu Alcian positive de leur matrice, se manifestent dès les 9/10ème jour ; ces nodules apparaissent aussi bien dans l'explant notamment à sa périphérie où ils sont plus visibles, que dans la zone d'essaimage ; leur fréquence est plus élevée que celle des myotubes ; 3 boîtes sur 10 en possèdent (1 à 3 nodules par boîte). Le halo cellulaire progresse à mesure que le temps de culture s'allonge. 17 jours après la mise en culture les cellules ayant essaimé forment un réseau cellulaire dense (fig. 12) dans lequel on aperçoit de nombreuses mitoses après action de la colchicine ; les cellules en division sont arrondies, très réfringentes et facilement reconnaissables (fig. 13); elles ont pratiquement perdu toute adhérence avec le substrat ; leurs chromosomes apparaissent nettement en plaque équatoriale (fig. 14). La culture commence à péricliter 3 semaines environ après l'explantation ; les symptômes de dégénérescence cellulaire se manifestent nettement par l'apparition de nombreuses vacuoles cytoplasmiques puis par fragmentation et pycnose nucléaires (fig. 15). La détermination de l'indice mitotique a toujours été effectuée 16 jours après le début de la culture, époque à laquelle elle est en pleine croissance. Dans le milieu de base, l'indice mitotique est compris entre 1 et 2 % ($1,59 \pm 0,69$ moyenne établie à partir de 90 cultures) après 48 h. de traitement à la colchicine. La synthèse de DNA est attestée par l'incorporation de 5-bromodéoxyuridine (fig. 16) ; elle se poursuit tout au long de la culture.



BU
LILLE

Fig. 2. Coupe de blastème de régénération de membre d'Axiólotl (stade cône). L'épiderme (Ep) et le mésenchyme (Me) du blastème sont séparés par une basale bien nette (astérisque). Parmi les cellules mésenchymateuses dont certaines sont en mitose (flèches), on distingue quelques hématies ; contrairement à l'épiderme le massif mésenchymateux apparaît inorganisé. Coloration : picroindigo carmin. X 200

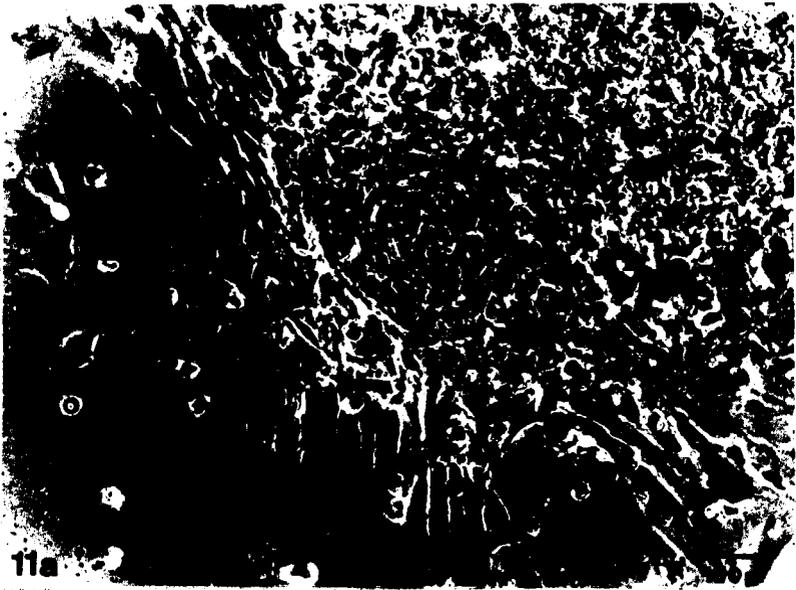
Fig. 3. Cellules mésenchymateuses de blastème en culture. Remarquer la présence de 2 nucléoles par noyau. X 350

Fig. 4. Explant mésenchymateux (E) après 4 jours de culture, la basale s'est maintenue sur la partie gauche de l'explant (flèche) ; sur la partie droite les cellules s'allongent vers l'extérieur de l'explant. Les taches noires présentes à la surface de l'explant représentent des amas de mélanophores. Contraste de phase. X 100

Fig. 5. Explant mésenchymateux (E) après 4 jours de culture. Détail d'un bord de l'explant à partir duquel essaient les cellules. A ce stade existent de nombreux déchets (points noirs, particules réfringentes) provenant de cellules nécrosées. Contraste de phase. X 220

Fig. 6. Explant mésenchymateux (E) après 4 jours de culture. Parmi les nombreux débris cellulaires remarquer la présence de 2 mélanophores. Contraste de phase. X 100

Fig. 7. Détail d'un mélanophore. Giemsa. X 350



BU
LILL

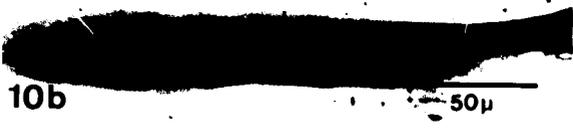
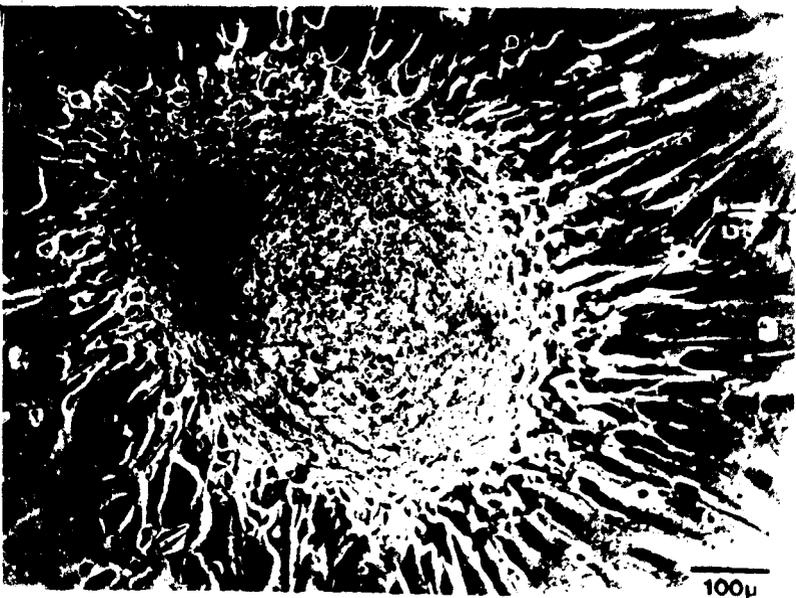


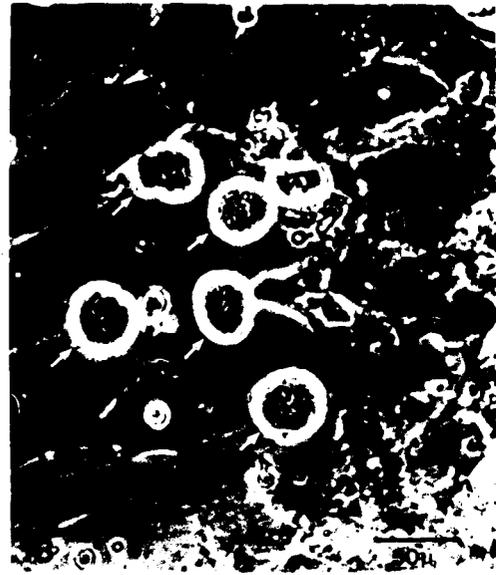
Fig. 8. Cellules mésenchymateuses isolées à partir d'un explant. Remarquer l'aspect allongé des cellules. Contraste de phase. X 100.

Fig. 9 a et b. Figures mitotiques (flèches) au sein des cellules mésenchymateuses ayant essaimé à partir d'un explant (16 jours de culture). Contraste de phase. X 450

Fig. 10 a) Alignement cellulaire évoquant des myotubes (16 jours de culture). Contraste de phase. X 100

b) Détail d'un alignement cellulaire ; remarquer la présence de 5 noyaux disposés l'un derrière l'autre. Giemsa. X 350

Fig. 11 a et b. Disposition concentrique de cellules mésenchymateuses représentant des nodules cartilagineux (flèches). En b, le nodule occupe pratiquement l'ensemble de l'explant. Contraste de phase. X 100



BU
LILLE

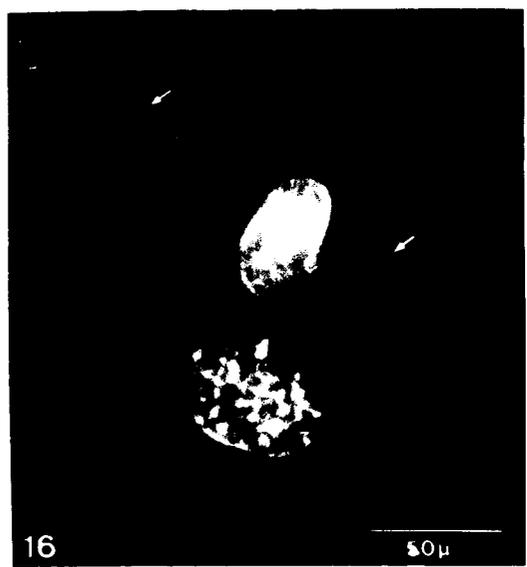


Fig. 12. Réseau cellulaire formé à partir d'un explant mésenchymateux (E) après 17 jours de culture. Giemsa. X 80

Fig. 13. Aspect des cellules mitotiques en culture après action de la colchicine (flèches) ; très réfringentes, ces cellules arrondies présentent un chromatine filamenteuse représentant des chromosomes. Contraste de phase X 220

Fig. 14 a et b. Plaques métaphasiques de cellules mésenchymateuses en culture après action de la colchicine. Contraste de phase. a) X 450 b) X 1000

Fig. 15 a et b. Cellules mésenchymateuses en dégénérescence (flèches) : vacuolisation cytoplasmique (15 a), fragmentation nucléaire (15 b). Giemsa. X 350

Fig. 16. Noyaux ayant incorporé de la 5-bromodeoxyuridine et rendu fluorescents par la fixation d'anti 5-BrdU FITC. Remarquer la présence de noyaux non fluorescents (flèches) et correspondant à des cellules hors cycle ou hors phase S pendant la période d'incubation. X 350

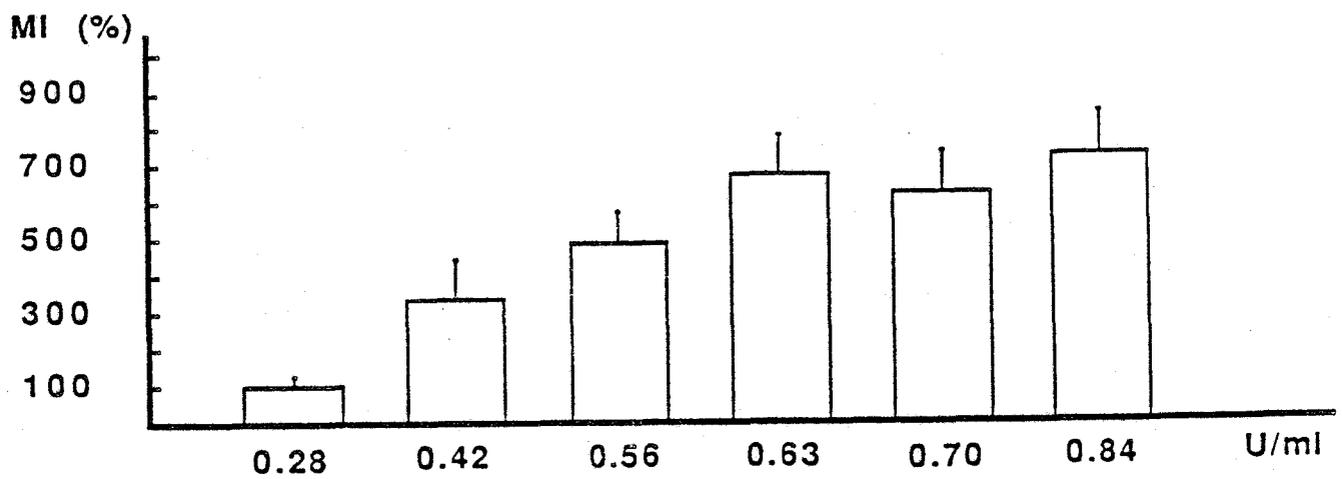


Fig. 17. Influence de la concentration d'insuline (en U/ml) sur l'indice mitotique (MI). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (0,28 U/ml, MI=100).



2) Culture en présence d'extraits embryonnaires.

L'adjonction de SVF ou de EEB au milieu de base exerce un effet positif sur les cultures. En particulier le SVF favorise la migration cellulaire à partir de l'explant permettant ainsi l'apparition de mitoses plus précocément que dans le milieu de base seul. La prolifération cellulaire est fortement stimulée (indice mitotique de $5,99 \pm 1,46$) et la survie cellulaire nettement améliorée : la culture peut atteindre 4 semaines sans apparition de symptômes de dégénérescence.

Par contre l'EEB ne semble pas, aux concentrations utilisées, avoir d'effet particulièrement net sur la migration cellulaire ; néanmoins il stimule la prolifération puisque l'indice mitotique atteint 2,3 % ($2,32 \pm 0,83$) en présence d'extrait employé à la concentration de 2,5 %.

C) Influence de l'insuline sur la prolifération des cellules blastémales *in vitro*

Les résultats obtenus montrent que le taux de prolifération est proportionnel à la concentration d'insuline jusqu'à 0,63 U/ml d'insuline concentration à partir de laquelle on atteint un plateau correspondant à un indice mitotique 6 fois supérieur à celui obtenu dans le milieu de base (tableau I et fig.17).

Concentration (U/ml)	0,28	0,42	0,56	0,63	0,70	0,84
Indice mitotique (%)	$1,40 \pm 0,37$ (6)	$4,70 \pm 1,49$ (6) **	$6,81 \pm 1,15$ (7) **	$9,44 \pm 1,50$ (7) **	$8,72 \pm 1,52$ (7) **	$10,15 \pm 1,54$ (6) **

Tableau I - Indice mitotique (en %) de cellules mésenchymateuses de blastème d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes d'insuline (en U/ml). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles

Nature du tissu	Espèces	Auteurs	Année
Tissu larvaire	<i>Rana pipiens</i>	Freed et Mezger-Freed	1969-70
	<i>Xenopus laevis</i>	Arthur et Balls	1971
	<i>Taricha torosa</i>	Chakulas, Tsai et Scheuing	1973
	<i>Xenopus laevis</i>	Pudney, Varma et Leake	1973
	<i>Xenopus laevis</i>	Anizet et Picard	1981
	<i>Xenopus laevis</i>	Bereiter et al	1981
	<i>Bombina orientalis</i>	Ellinger, Sharif et Bemiller	1983
	<i>Rana catesbeiana</i>	Nishikawa et Yoshizato	1985
Cellules sanguines	<i>Bufo marinus</i>	Rosaura et de Montbrun	1972
	<i>Bufo bufo</i>	Lenfant	1973
	<i>Xenopus laevis</i>		
	<i>Pleurodeles waltlii</i>		
Tissu adulte	<i>Xenopus laevis</i>	Chinchar et Sinclair	1978
	<i>Notophthalmus viridescens</i>	Cameron	1983
	<i>Notophthalmus viridescens</i>	Schrag et Cameron	1983
	<i>Notophthalmus viridescens</i>		
Cellules blastémales	<i>Notophthalmus viridescens</i>	Jabaily et Singer	1982
	<i>Ambystoma mexicanum</i>	Hinterberger et Cameron	1983

Tableau 2
Références bibliographiques relatives à la culture cellulaire chez les Amphibiens



le calcul a été réalisé.

Le test t de Student est utilisé pour comparer l'indice mitotique des cellules mésenchymateuses en présence de doses croissantes d'insuline par rapport à l'indice mitotique des cellules mésenchymateuses cultivées dans le milieu de base (0,28 U/ml) $*=p < 0,05$; $**=p < 0,01$.

IV. - DISCUSSION

Nos résultats montrent qu'il est possible de cultiver dans de bonnes conditions les cellules mésenchymateuses de blastème de membre d'*A. mexicanum* et que celles-ci sont susceptibles de répondre à un signal mitogène.

Jusqu'à présent les cultures cellulaires d'Amphibiens ont concerné des tissus embryonnaires larvaires ou adultes (Tableau 2).

Par contre, peu de travaux concernent les cellules de blastèmes de régénération (Jabaily et Singer, 1982 ; Hinterberger et Cameron, 1983) et ce, bien que la culture de blastèmes ait été largement utilisée (Tableau 3) ; en outre, ils sont centrés uniquement sur l'observation du comportement des cellules en culture ; dans les deux cas étudiés, les auteurs ont constaté la prolifération des cellules blastémales *in vitro* et observé la différenciation de myotubes ; aucun ne s'est intéressé au contrôle de la prolifération de ces cellules *in vitro*.

Dans notre système, l'indice mitotique dans le milieu de base est relativement élevé (entre 1 et 2 %), compte tenu du fait que les cellules évoluent en l'absence d'épiderme et de stimulation nerveuse. On sait, en effet, que l'épiderme cicatriciel recouvrant le blastème (cape épidermique) joue un rôle important dans la croissance de ce dernier (Revue dans Thornton, 1968 et Wallace, 1982) . Il a été montré *in vivo* en particulier que le remplacement de la cape épidermique par de la peau entraîne l'arrêt de la régénération (Taube, 1921); il en est de même pour des blastèmes dénudés et implantés dans le corps (Goss, 1956 ; Stocum et Dearlove, 1972) ; d'autre part, *in vitro* , l'indice mitotique (ainsi que la synthèse de DNA) du mésenchyme blastémal cultivé en l'absence de cape épidermique est toujours inférieur à celui de blastème complet (Globus et al, 1980). On sait aussi (Revue dans Singer, 1974, 1978 ; Geraudie et Singer, 1984) que les blastèmes dépourvus d'innervation ont leur croissance bloquée (si la dénervation est réalisée pendant la phase de dépendance nerveuse, c'est à

Espece	Auteur	Année
<i>Triturus cristatus</i>	Lecamp	1948
<i>Diemictylus viridescens</i>	Fimian	1959
" "	Grillo et al	1968
<i>Ambystoma maculatum</i>	Stocum	1968
<i>Triturus viridescens</i>	Dresden et Gross	1970
<i>Diemictylus viridescens</i>	Bromley et Angus	1971
<i>Notophthalmus viridescens</i>	Foret et Babich	1973
" "	Babich et Foret	1973
<i>Triturus viridescens</i>	Dresden et Moses	1973
<i>Diemictylus viridescens</i>	Vethamany-Globus et Liversage	1973
" "	Globus et Liversage	1975
<i>Ambystoma mexicanum</i>	Liversage et Globus	1977
<i>Notophthalmus viridescens</i>	Globus et Vethamany-Globus	1977
" "	Choo et al	1978
" "	Vethamany-Globus et al	1978
" "	Carlone et Foret	1979
" "	Conn et al	1979
" "	Globus et al	1980
" "	Carlone et al	1981
" "	Choo et al	1981
" "	Mescher et Loh	1981
" "	Tomlinson et al	1981
" "	Tomlinson et al	1982
" "	Globus et al	1983
<i>Pleurodeles Waltlii</i>	Lassalle	1983
<i>Notophthalmus viridescens</i>	Vethamany-Globus et al	1984
" "	Mescher et Munaim	1984
" "	Tomlinson et al	1984
" "	Munaim et Mescher	1986



Tableau 3
Références bibliographiques relatives à la culture de blastème de régénération.

dire jusqu'au stade cône moyen) ou ralentie (si la dénervation est pratiquée après ce stade). *In vitro*, la dépendance nerveuse des blastèmes a aussi été démontrée par un certain nombre d'auteurs (Globus et Liversage, 1975 ; Globus et Vethamany-Globus, 1977; Vethamany-Globus et al, 1978 ; Carlone et Foret, 1979 ; Tomlinson et al, 1981 ; Lassalle, 1983 a et b ; Lassalle et al, 1985 ; Oudkhir et al, 1985) ; comme *in vivo* la dénervation entraîne en effet une diminution importante de la synthèse de DNA et de l'indice mitotique des blastèmes cultivés *in vitro*.

Dans nos conditions de culture cellulaire excluant la participation de l'épiderme et du système nerveux on devrait donc s'attendre à un indice mitotique faible, en tout cas inférieur à celui des blastèmes évoluant *in vivo* ; or, il ne lui est guère inférieur. Ce résultat doit être relativisé si nous tenons compte à la fois des conditions de mesure de l'indice mitotique d'une part et des conditions de culture d'autre part. En effet, nous incluons dans le calcul de l'indice mitotique toutes les mitoses se déroulant pendant un laps de temps correspondant à 48 h. (en raison de l'addition de colchicine 2 jours avant le comptage des mitoses) alors que la mesure de l'indice mitotique *in vivo* ne concerne que les cellules en mitose au moment de la fixation. D'autre part, les cellules de nos cultures évoluent en présence d'une quantité non négligeable d'insuline (0,28 U/ml) hormone dont on sait qu'elle stimule l'activité prolifératrice des blastèmes *in vitro* (Globus et Liversage, 1975 ; Vethamany-Globus et al, 1978 ; Mescher et Loh, 1981 ; Lassalle, 1983 a et b). Ces conditions ont été choisies afin de limiter le risque d'erreur dans le calcul de l'indice mitotique, car dans les conditions normales, absence de colchicine et d'insuline, l'indice mitotique est particulièrement faible ; il était donc nécessaire d'augmenter le nombre de mitoses afin de rendre le décompte de celles-ci significatif ; d'autre part il fallait que cette augmentation de l'indice mitotique soit compatible avec la persistance d'une réactivité des cellules à un facteur mitogène afin d'en apprécier l'efficacité. Ces conditions sont réalisées puisque nous avons constaté que la culture est encore capable d'être stimulée par des concentrations croissantes d'insuline. En effet, nous avons observé une élévation de l'indice mitotique proportionnellement à la concentration d'insuline utilisée et ce jusqu'à une concentration de 0,63 U/ml niveau à partir duquel l'augmentation de la teneur du milieu en insuline n'augmente plus l'indice mitotique. Un comportement semblable des cellules blastémales vis à vis de l'insuline a été obtenu sur des

blastèmes cultivés *in vitro* (Lassalle, 1983 a et b ; Mescher et Loh, 1981). Toutefois, à la concentration maximale utilisée par les auteurs (correspondant à 0,28 U/ml) le plateau n'est pas atteint ; il semble cependant que celui-ci puisse l'être chez le Pleurodèle pour une concentration inférieure (0,42 U/ml) à celle utilisée dans notre système (Lassalle, communication personnelle).

Il apparaît donc qu'en culture cellulaire, le mésenchyme blastémal réagit à l'insuline de la même façon que les blastèmes cultivés *in vitro*. La culture de cellules mésenchymateuses apparaît donc comme un bon système pour rechercher les facteurs contrôlant la prolifération cellulaire des blastèmes de régénération. En outre, ce système permet d'observer directement les processus de différenciation qui peuvent se présenter au cours de la culture. La myogenèse et la chondrogenèse apparaissent comme étant relativement fréquentes dans des cultures de cellules mésenchymateuses de blastème. L'apparition dans les cultures de structures évoquant des myotubes signalée par Jabaily et Singer (1982) a aussi été observée par Hinterberger et Cameron (1983) , notamment en présence d'extrait embryonnaire de boeuf (EEB) et en milieu enrichi en Ca^{2+} (1,8 mM). L'addition d'EEB favorise de la même façon la chondrogenèse ; en son absence la chondrogenèse est limitée et les myotubes absents ; l'addition de FGF (50 ng/ml) restaurerait partiellement les capacités différenciatrices du mésenchyme en culture. Contrairement à ces auteurs nous avons obtenu une différenciation cartilagineuse et musculaire en l'absence d'EEB. Il est vraisemblable que celle-ci soit liée à la densité cellulaire qui varie en fonction de la taille et du nombre de blastèmes explantés, et qui pour des conditions de départ semblables peut aussi varier en fonction de l'aspect de l'essaimage cellulaire ; Hinterberger et Cameron (1983) avaient d'ailleurs constaté que la culture à partir de blastèmes de petite taille était moins propice à la myogenèse. L'influence de la densité cellulaire sur la chondrogenèse a aussi été montrée sur des bourgeons de membres d'embryons de poulet (Ahrens et al, 1977) et de souris (Desbiens, 1983). D'autre part, on sait que la différenciation chondroblastique est accélérée en l'absence de cape épidermique aussi bien chez les embryons de poulet (Kosher et al, 1979 ; Solursh et al, 1981) ou de souris (Desbiens et al, 1985) que dans les blastèmes de régénération de Triton (Globus et al, 1980) ; les conditions dans lesquelles évoluent les cellules blastémales d'*Axolotl in vitro* (absence de cape épidermique) représentent donc une situation favorable à la chondrogenèse.

Il apparaît donc que la culture de cellules blastémales représente un système propice aussi bien à l'étude du déterminisme de la différenciation blastémale que du contrôle de la prolifération cellulaire.

Ce système présente, par rapport à la culture de blastèmes, un certain nombre d'avantages :

- accessibilité des cellules par les métabolites et les substances dont l'action est recherchée.
- possibilité de contrôler la stimulation d'un seul type cellulaire (mésenchyme) indépendamment de la présence d'autres tissus mitogènes (épiderme).
- observation rapide des modifications induites par l'expérimentateur.

Nous nous proposons donc d'utiliser ce système pour rechercher les facteurs mitogènes liés au système nerveux et à l'épiderme.

CHAPITRE II**INFLUENCE D'EXTRAITS NERVEUX SUR LA PROLIFERATION DE
CELLULES BLASTEMALES *IN VITRO***

CHAPITRE II

INFLUENCE D'EXTRAITS NERVEUX SUR LA PROLIFERATION DE CELLULES BLASTEMALES *IN VITRO*

I. - INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que le système de culture utilisé permet aux cellules mésenchymateuses, isolées à partir de blastème de régénération (stade cône) de membre d'*Axolotl*, de se comporter comme au cours du processus de régénération, c'est-à-dire qu'elles prolifèrent activement et différencient des structures cartilagineuses et musculaires.

D'autre part, nous avons pu constater que la prolifération de ces cellules peut être stimulée par l'insuline, hormone dont le rôle sur la prolifération des blastèmes isolés avait déjà été démontré (Globus et Liversage, 1975 ; Vethamany-Globus et al, 1978 ; Mescher et Loh, 1981 ; Lassalle, 1983 a et b.)

Comme des extraits nerveux sont susceptibles de limiter ou d'abolir les effets d'une dénervation *in vivo* (Lebowitz et Singer, 1970 ; Deck, 1971 ; Singer et al, 1976 ; Jabaily et Singer, 1977) ou de stimuler la prolifération de blastèmes isolés cultivés *in vitro* (Choo et al, 1978 ; Carlone et Foret, 1979 ; Mescher et Loh, 1981 ; Choo et al, 1981 ; Carlone et Rathbone, 1985), il importait de savoir si des cellules blastémales isolées étaient susceptibles de répondre aussi à l'addition d'extraits nerveux au milieu de culture afin de pouvoir utiliser ce système expérimental, plus propice que la culture de blastème pour ce type de travail, à la recherche des facteurs mitogènes intervenant au cours de la régénération du membre.

Nous rapporterons dans ce chapitre les résultats obtenus à l'aide d'extraits nerveux hétérologues ou homologues et provenant d'animaux non amputés ou en cours de régénération.

II. - TECHNIQUES

Les tissus nerveux sont prélevés et placés immédiatement dans une solution de Ringer maintenue à 0°C par de la glace fondante. Broyés à l'aide d'un homogénéiseur de Potter, centrifugés à 25000 g pendant 1 h, le surnageant est ensuite récupéré et sa richesse en protéine déterminée.

Les extraits nerveux proviennent de :

- cerveau d'embryon de Poulet âgés de 12 jours. Cet extrait est mis en présence des cellules mésenchymateuses à des concentrations comprises entre 40 et 200 µg/ml

- cerveau et moelle épinière de Pleurodèle adulte. Les concentrations utilisées sont de 8 ; 15 et 30 µg/ml

- moelle épinière d'Axolotl :

- a) moelle épinière d'animaux non amputés âgés de 15 mois

- b) moelle épinière d'animaux amputés âgés de 15 mois

- c) moelle épinière d'animaux amputés âgés de 30 mois

L'extrait de moelle épinière (a) est utilisé à des concentrations de 15, 30, 60 et 120 µg/ml.

L'extrait de moelle épinière (b) est utilisé à une seule concentration (30 µg/ml) la moelle épinière étant prélevée 7 jours après l'amputation ou 14 jours après l'amputation.

Il est important de noter que chez un animal de 15 mois ("jeune") 14 jours correspond au temps nécessaire pour obtenir un blastème stade cône.

L'extrait de moelle épinière (c) est aussi utilisé à une seule concentration (30 µg/ml). Dans ce cas, la moelle épinière provient d'animaux "âgés" (30 mois) amputés depuis 14 jours. Les animaux âgés présentent après 14 jours une formation blastémale équivalente à celle obtenue après 7 jours chez un animal jeune.

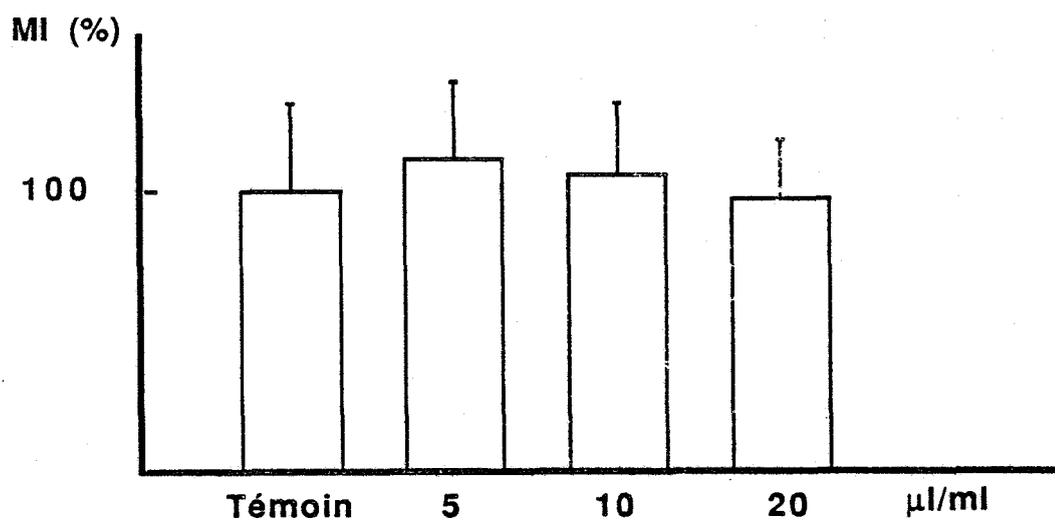


Fig. 18. Influence de la concentration d'une solution de Ringer (en $\mu\text{l/ml}$) sur l'indice mitotique (MI). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (0 μl , MI = 100).



III. - RESULTATS

Nous examinerons successivement les résultats obtenus après addition au milieu de culture d'extraits nerveux hétérologues (cerveau d'embryon de Poulet, cerveau et moelle épinière de Pleurodèle adulte) et homologues (moelle épinière d'Axolotl). Au préalable, nous apprécierons l'effet éventuel du milieu de préparation de l'extrait nerveux (liquide de Ringer) et d'une charge protéique (gammaglobuline bovine) sur la prolifération des cellules mésenchymateuses.

A) Influence du liquide de Ringer et de la gammaglobuline bovine (=GGB).

L'addition de 5 à 20 μ l/ml de liquide de Ringer (Tableau 4, Figure 18) ou de 2 à 30 μ g/ml de GGB (Bio-Rad) (Tableau 5, Figure 19) au milieu de culture ne modifie en rien le comportement des cellules blastémales ; l'index mitotique se maintient à une valeur très proche de celle observée chez les témoins (de l'ordre de 2%).

Concentration (μ g/ml)	0	5	10	20
Indice mitotique (%)	2,10 \pm 0,67 (7)	2,35 \pm 0,57 (7)	2,22 \pm 0,54 (7)	2,04 \pm 0,45 (7)

Tableau 4 - Indice mitotique (en %) de cellules mésenchymateuses de

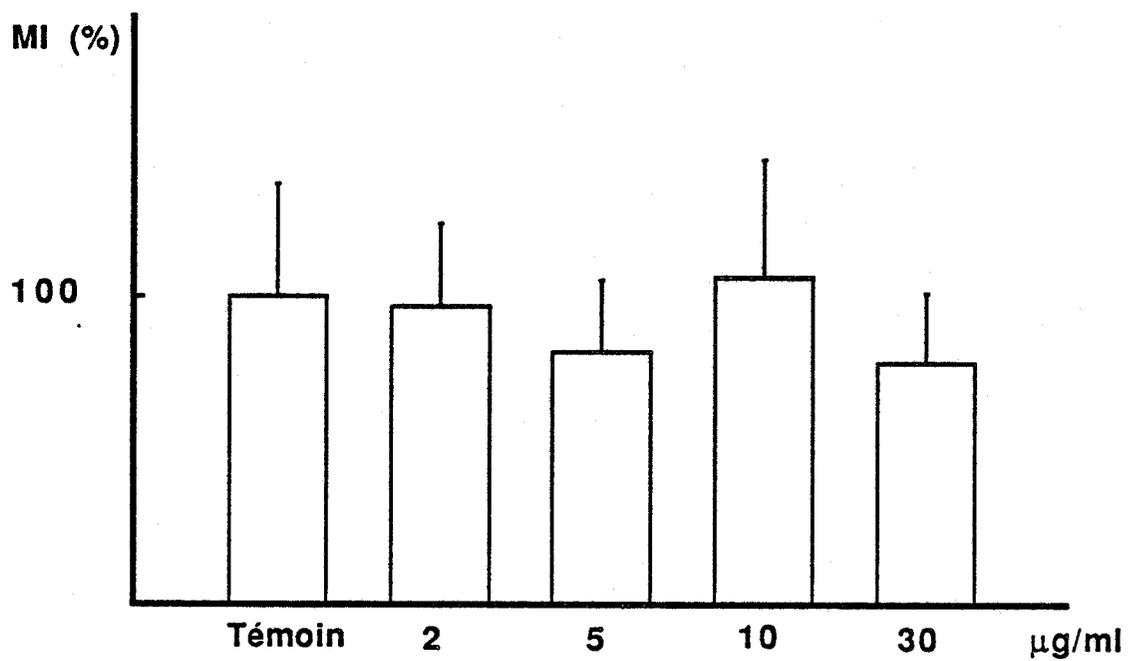


Fig. 19. Influence de la concentration de gammaglobuline bovine (en $\mu\text{g/ml}$) sur l'indice mitotique (MI). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (0 μg , MI = 100).



blastèmes d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes de **liquide de Ringer** (en $\mu\text{l/ml}$). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	2	5	10	30
Indice mitotique (%)	$2,30 \pm 0,83$ (6)	$2,21 \pm 0,62$ (6)	$1,88 \pm 0,53$ (6)	$2,45 \pm 0,86$ (6)	$1,80 \pm 0,52$ (6)

Tableau 5 - Indice mitotique (en %) de cellules mésenchymateuse de blastèmes d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes de **gammaglobuline bovine** (en $\mu\text{g/ml}$). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

B) Influence d'extraits nerveux hétérologues.

L'addition dans le milieu de culture d'extrait nerveux provenant de cerveau d'embryon de Poulet (Tableau 6, Figure 20) ou de cerveau et de moelle épinière de Pleurodèle adulte (Tableau 7, Figure 21) stimule dans tous les cas la prolifération des cellules blastémales.

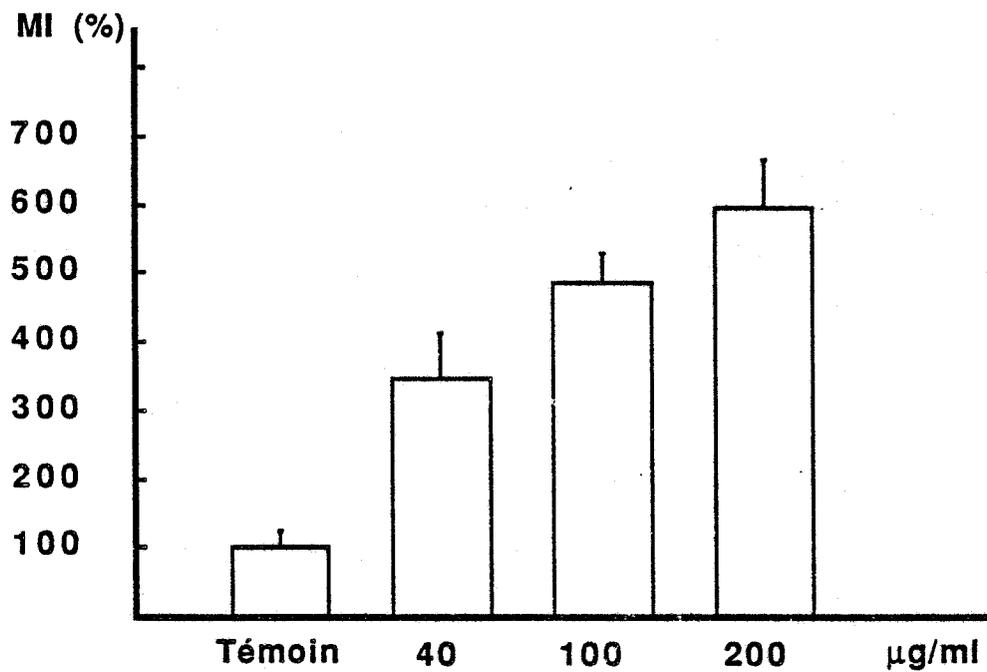


Fig. 20. Influence de la concentration d'un **extrait de cerveau d'embryon de Poulet** (en µg/ml) sur l'indice mitotique (MI). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (0 µg, MI=100)

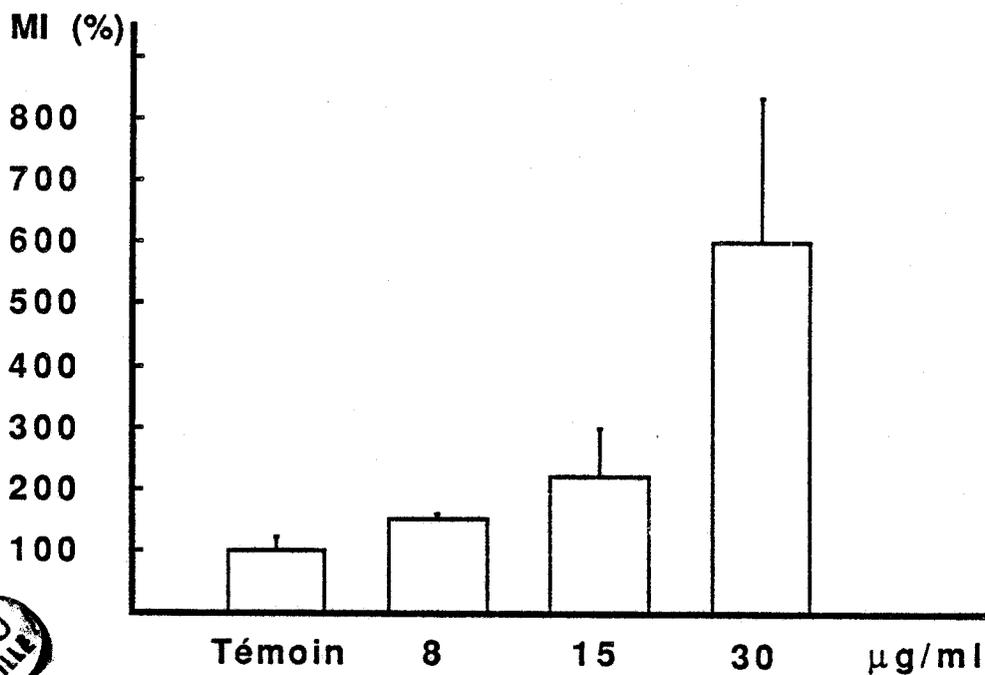


Fig. 21. Influence de la concentration d'un **extrait nerveux de Pleurodèle** (en µg/ml) sur l'indice mitotique (MI). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (0 µg, MI = 100).



Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	40	100	200
Indice mitotique (%)	1,28 \pm 0,30 (7)	4,47 \pm 0,82 (7) **	6,27 \pm 0,54 (7) **	7,67 \pm 0,86 (7) **

Tableau 6 - Indice mitotique (en%) de cellules mésenchymateuses de blastème d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes d'extrait de cerveau d'embryon de Poulet (en $\mu\text{g/ml}$). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

Le test t de Student est utilisé pour comparer les valeurs d'indice mitotique des cellules en présence d'extrait nerveux par rapport au témoin (concentration = 0 $\mu\text{g/ml}$) * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	8	15	30
Indice mitotique (%)	0,90 \pm 0,19 (8)	1,38 \pm 0,11 (7) *	2,00 \pm 0,74 (7) **	5,50 \pm 0,20 (7) **

Tableau 7 - Indice mitotique (en %) de cellules mésenchymateuses de



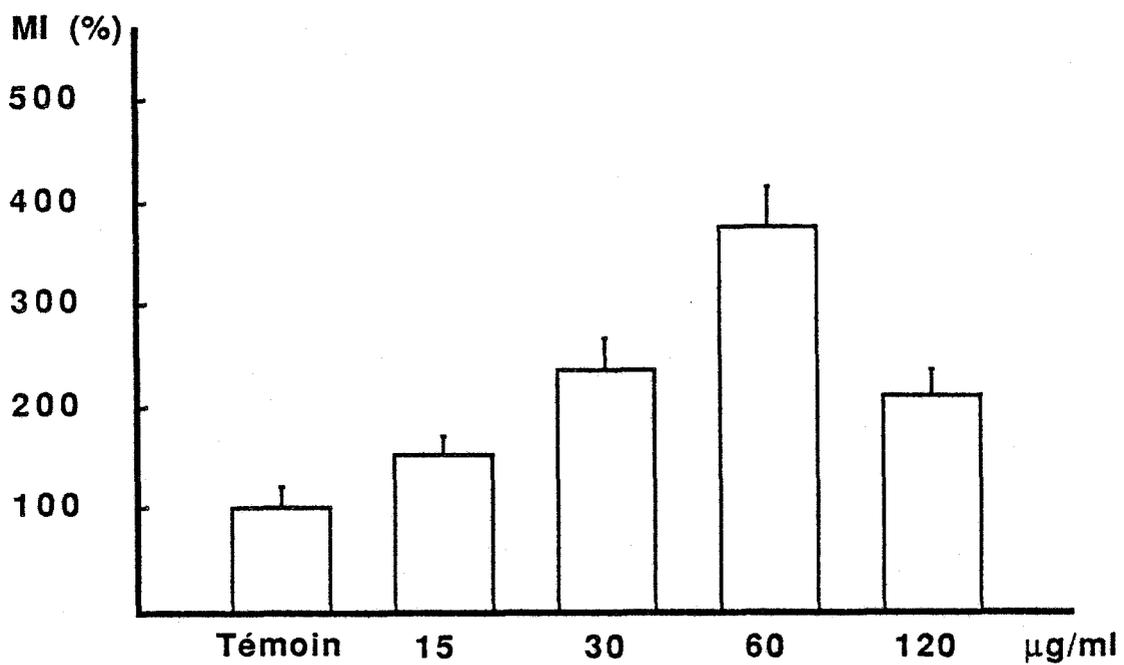


Fig. 22. Influence de la concentration d'un **extrait de moelle épinière d'Axolotl non amputés** (en µg/ml) sur l'indice mitotique (MI). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (0 µg, MI = 100).



blastèmes d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes d'**extrait nerveux de Pleurodèle** (en $\mu\text{g/ml}$). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

Le test t de Student est utilisé pour comparer les valeurs d'indice mitotique des cellules en présence d'extrait nerveux par rapport au témoin (concentration = $0\mu\text{g/ml}$) * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

L'effet obtenu est dose-dépendant. Pour les plus fortes doses utilisées ($30\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait de cerveau et de moelle épinière de Pleurodèle, $200\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait de cerveau d'embryon de Poulet) l'indice mitotique est multiplié par 6 ; aucun effet toxique ne s'est produit aux doses utilisées.

C) Influence d'extraits nerveux homologues

1) Extrait nerveux provenant de moelle épinière d'Axolotl non amputés.

Comme précédemment, l'extrait nerveux stimule la prolifération cellulaire de façon dose-dépendante (Tableau 8, Figure 22). Toutefois le maximum d'effet est obtenu à $60\mu\text{g/ml}$, dose au-delà de laquelle la stimulation obtenue est moindre. Pour $60\mu\text{g/ml}$, l'indice mitotique est multiplié par 3.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	15	30	60	120
Indice mitotique (%)	$1,92 \pm 0,40$ (6)	$2,92 \pm 0,39$ (6) **	$4,55 \pm 0,59$ (6) **	$7,25 \pm 0,75$ (6) **	$4,04 \pm 0,49$ (6) **

Tableau 8 - Indice mitotique (en %) de cellules mésenchymateuses de

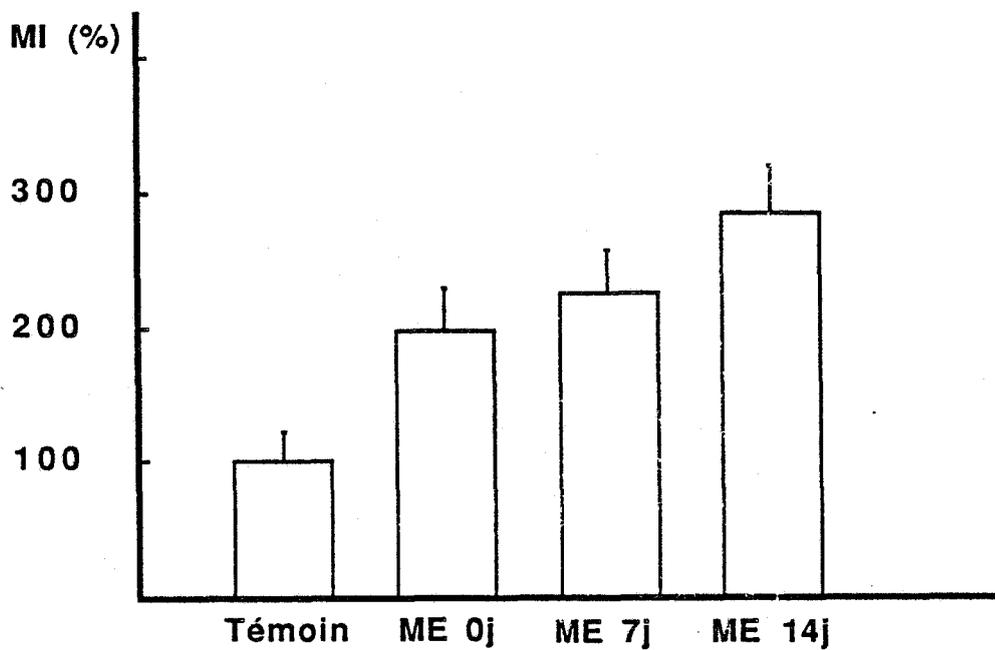


Fig. 23. Influence de la concentration d'un **extrait de moelle épinière d'Axolotl** ($30 \mu\text{g/ml}$), prélevée à des moments différents après amputation, sur l'indice mitotique (MI). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin ($0 \mu\text{g}$, $\text{MI} = 100$).



blastème d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes d'extrait de moelle épinière d'Axolotl non amputés (en $\mu\text{g/ml}$). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé. Le test t de Student est utilisé pour comparer les valeurs d'indice mitotique des cellules en présence d'extrait nerveux par rapport au témoin (concentration = $0\mu\text{g/ml}$) * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

2) Extrait nerveux provenant de moelle épinière d'Axolotl amputés et de même âge. (Tableau 9, Figure 23).

Les animaux utilisés produisent un blastème de stade cône en 14 jours ; par contre, 7 jours après amputation, le blastème obtenu est très petit (stade cône précoce) se caractérisant par une prolifération cellulaire faible.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0		30	
Durée de la régénération (jours)	0	0	7	14
Indice mitotique (%)	$2,02 \pm 0,45$ (7)	$4 \pm 0,64$ (7) **	$4,55 \pm 0,66$ (7) **	$5,74 \pm 0,74$ (7) ** .. $\Delta\Delta$

Tableau 9 - Indice mitotique (en %) de cellules mésenchymateuses de

blastème d'Axolotl placées en présence d'extrait de moelle épinière d'Axolotl (30 $\mu\text{g/ml}$), prélevée à des moments différents après l'amputation. Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

Le test t de Student est utilisé pour comparer les valeurs d'indice mitotique des cellules en présence :

- d'extrait nerveux par rapport au témoin (concentration = 0 $\mu\text{g/ml}$)
* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.
- d'extrait nerveux d'animaux amputés par rapport aux cellules placées en présence d'extrait nerveux d'animaux non amputés • = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.
- d'extrait nerveux d'animaux amputés depuis 14 jours par rapport aux cellules placées en présence d'extrait nerveux d'animaux amputés depuis 7 jours. Δ = $p < 0,05$; $\Delta\Delta$ = $p < 0,01$.

Les résultats obtenus à l'aide d'extraits de moelle provenant de ces animaux en cours de régénération montrent qu'à dose égale (30 $\mu\text{g/ml}$) les extraits provenant de moelle d'animaux amputés depuis 14 jours sont plus efficaces (indice mitotique X 3) que ceux provenant de moelle d'animaux amputés depuis seulement 7 jours (indice mitotique X 2,2). Ces derniers extraits n'apparaissent pas significativement plus efficaces que ceux provenant de moelle d'animaux non amputés (indice mitotique X 2).

3) Extrait nerveux provenant de moelle épinière d'Axolotl amputés et d'âges différents. (Tableau 10, Figure 24).

Afin de savoir si la différence d'activité des extraits de moelle sur les cellules mésenchymateuses est corrélée avec le temps séparant l'amputation du membre du prélèvement de la moelle épinière, ou plus précisément avec le stade atteint par le régénérat au moment du prélèvement de la moelle épinière, nous avons prélevé des moelles épinières chez des animaux d'âges différents.

Nous avons utilisé la moelle épinière 14 jours après l'amputation

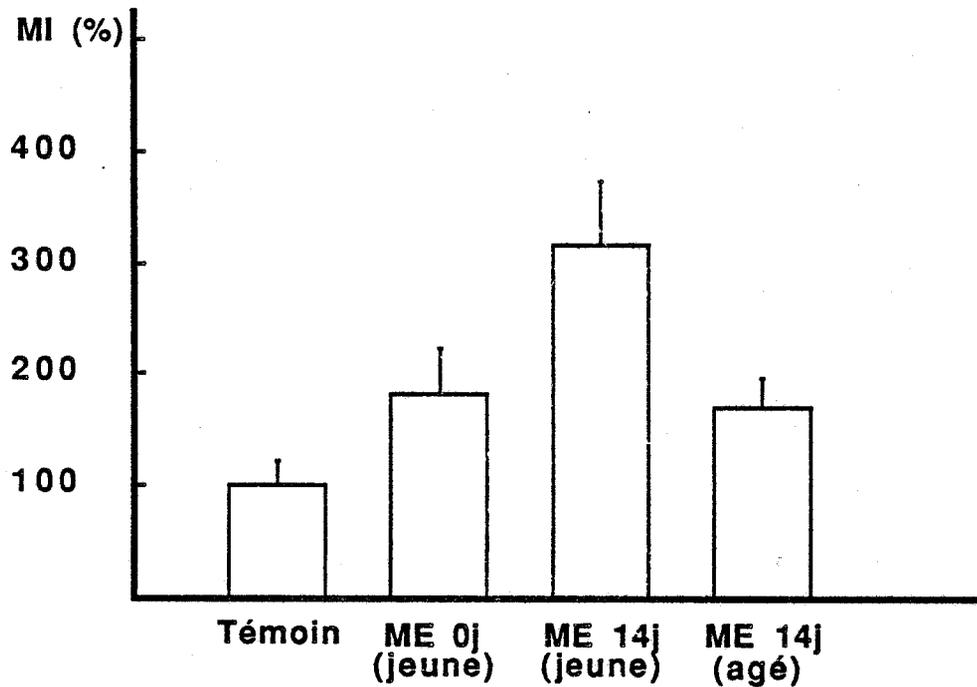


Fig. 24. Influence de la concentration d'un **extrait de moelle épinière d'Axolotl** (30 $\mu\text{g/ml}$), prélevée 14 jours après l'amputation d'animaux d'âges différents, sur l'indice mitotique (MI). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (0 μg , MI = 100).



d'animaux jeunes qui présentent à ce moment là, un blastème stade cône. Nous avons réalisé la même opération chez des animaux âgés, ces derniers présentant 14 jours après l'amputation un petit blastème correspondant au stade 7 jours chez les animaux jeunes.

Comme précédemment, on constate qu'un extrait de moelle épinière d'animaux non amputés multiplie par 2 l'indice mitotique de nos cultures alors qu'un extrait de moelle épinière provenant d'animaux jeunes amputés depuis 14 jours et ayant régénéré un cône le multiplie par un facteur 3.

Par contre, des extraits de moelle épinière provenant d'individus âgés ayant été amputés depuis 14 jours et n'ayant régénéré qu'un petit blastème ne stimule pas plus les cellules mésenchymateuses que des extraits de moelle épinière provenant d'un animal jeune non amputé.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0		30	
Durée de la régénération (jours)	0		14	
Indice mitotique (%)	1,67 \pm 0,34 (7)	3,04 \pm 0,68 (7) **	Jeune	Agé
			5,30 \pm 0,95 (7) ** ••	2,85 \pm 0,40 (7) ** $\Delta\Delta$

Tableau 10 - Indice mitotique (en%) de cellules mesenchymateuses de blastème d'Axolotl placées en présence d'extrait de moelle épinière d'Axolotl (30 $\mu\text{g/ml}$), prélevée 14 jours après l'amputation chez des

animaux d'âges différents. Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

Le test t de Student est utilisé pour comparer les valeurs d'indice mitotique des cellules en présence :

- d'extrait nerveux par rapport au témoin (Concentration = 0 $\mu\text{g/ml}$)
* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.
- d'extrait nerveux d'animaux amputés par rapport à des cellules placées en présence d'extrait nerveux d'animaux non amputés • = $p < 0,05$;
•• = $p < 0,01$.
- d'extrait nerveux d'animaux âgés et amputés depuis 14 jours par rapport à des cellules placées en présence d'extrait nerveux d'animaux jeunes amputés depuis 14 jours Δ = $p < 0,05$; $\Delta\Delta$ = $p < 0,01$.

IV. - DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent d'une part que des extraits nerveux sont susceptibles de stimuler la prolifération de cellules mésenchymateuses d'origine blastémale cultivées *in vitro* et d'autre part que l'activité mitotique de ces extraits peut être augmentée si ils proviennent de tissus nerveux impliqués dans un processus de régénération. Nous discuterons chacun de ces deux points.

A) Stimulation de la prolifération de cellules blastémales par des extraits nerveux.

Il apparaît que l'addition d'extraits nerveux au milieu de culture stimule la prolifération des cellules mésenchymateuses de blastème et ce, quelle que soit l'origine du tissu nerveux. Dans les trois cas étudiés (extrait cerveau d'embryon de Poulet, extrait de cerveau et de moelle épinière de Triton adulte, extrait de moelle épinière d'*Axolotl*) , l'effet sur la prolifération cellulaire apparaît dose-dépendant. Un tel effet a déjà été constaté en culture de blastème. Ainsi Choo et al (1978) ont observé une

augmentation de 76,7% de l'incorporation d'acides aminés ^{14}C dans les protéines de blastème de *Notophthalmus viridescens* cultivés pendant 20 h. en présence d'extrait aqueux de cerveau de triton pour des concentrations comprises entre 0,5 et 1,5 mg de protéines/ml de milieu. De même, Carlone et Foret (1979) ont constaté qu'un extrait de même nature utilisé à la concentration de 0,3 mg/ml de milieu multiplie par 4 l'indice mitotique du mésenchyme blastémal de la même espèce, après 24 h de culture en présence de cet extrait. Mescher et Loh (1981) ont aussi rapporté des observations analogues sur le même matériel ; ces auteurs signalent en effet que des extraits bruts de cerveau de *Notophthalmus viridescens* augmentent l'incorporation de Thymidine ^3H dans des blastèmes de plus de 2,5 fois (de la même façon d'ailleurs que le SVF) pour une concentration optimale de 100 $\mu\text{g/ml}$. Un extrait de cerveau d'embryon de poulet de 10 à 18 j. utilisé dans les mêmes conditions que précédemment (Choo et al, 1978) stimule aussi la synthèse protéique des blastèmes (+82,5% pour un extrait de cerveau d'embryon de 10 j. + 58% pour un extrait de cerveau d'embryon de 18 j.), le principe actif étant considéré comme correspondant à une protéine basique (Choo et al, 1981). Plus récemment, Carlone et Rathbone (1985) ont pu extraire du cerveau d'embryon de Poulet une substance mitogène, le CBGF (Chicken brain growth factor), agissant à des concentrations nanomolaires sur les blastèmes de membre : cette substance, dont le poids moléculaire est compris entre 2000 et 6000 d et présente un $\text{pI} > 8,4$, serait différente de molécules comme la substance P ou l'EGF dont l'activité sur des blastèmes avait été mise en évidence antérieurement (Mescher et Loh, 1981 ; Globus et al, 1983). L'activité de ces extraits sur les blastèmes semble d'ailleurs spécifique du tissu nerveux, indépendamment de son origine, car des extraits de tissus non nerveux (muscle ou foie) voire de la serumalbumine bovine non seulement ne stimulent pas la protéosynthèse mais l'inhibe partiellement (Choo et al, 1978). Les résultats que nous avons obtenus à l'aide d'extraits nerveux bruts sur les cellules de blastème vont dans le même sens bien que les concentrations utilisées soient beaucoup plus faibles.

Ce résultat pourrait s'expliquer par une plus grande sensibilité aux

facteurs mitogènes des cellules cultivées *in vitro* comparativement aux blastèmes, ou encore par une concentration de facteurs mitogènes plus importante dans la moelle épinière par rapport au cerveau. Bien que nous ne sachions pas si les facteurs mitogènes présents dans la moelle épinière sont identiques à ceux contenus dans le cerveau (Jennings et al, 1979), il ne nous semble pas, pour l'instant, opportun de comparer l'effet des concentrations utilisées par les différents auteurs ayant effectué ces travaux compte tenu du fait que les méthodes de préparation diffèrent et que l'extrait utilisé n'est le plus souvent qu'un extrait brut. Il en est d'ailleurs de même pour nos propres résultats qui semblent révéler des activités mitogènes différentes pour ces extraits nerveux provenant d'espèces différentes. Il est certain qu'une standardisation des méthodes de préparation et d'utilisation des extraits nerveux permettrait de déterminer avec précision l'activité mitogène d'extraits nerveux d'origine différente ; ce travail fait d'ailleurs l'objet de recherche dans notre laboratoire sur des lignées établies. D'autre part, une purification du (des) principe(s) actif(s) contenu(s) dans les extraits nerveux s'avère indispensable pour s'affranchir des inhibiteurs présents dans les extraits bruts et dont la présence est révélée par l'utilisation de concentrations élevées d'extrait nerveux aussi bien dans notre travail (Fig. 8) que dans ceux d'autres auteurs (Choo et al, 1978 ; Mescher et Loh, 1981). En effet, dans tous les cas d'essais utilisant des concentrations croissantes d'extraits nerveux, on a observé une inhibition de la prolifération à dose élevée ($> 1\text{mg/ml}$ pour Choo et al, 1978 ; $> 100\ \mu\text{g/ml}$ pour Mescher et Loh, 1981 ; $> 60\ \mu\text{g/ml}$ pour nos propres travaux), cette inhibition pouvant d'ailleurs être réversée par l'addition de sels ferriques (Munaim et Mescher, 1986) (voir chapitre IV).

B) Modulation de l'effet mitogène des extraits nerveux au cours de la régénération.

Les résultats obtenus à l'aide d'extraits provenant de moelle épinière d'*Axolotl* amputés depuis 14 jours montrent clairement que l'activité mitogène de ces extraits est supérieure (+50%) à celle d'extraits

provenant de moelle d'animaux non amputés. Par contre, nous n'avons pas observé d'augmentation significative de l'activité mitogène d'extraits provenant d'animaux amputés depuis seulement 7 jours. Or, nous savons qu'à 7 jours, le blastème est à peine ébauché et présente une activité mitotique faible alors qu'à 14 jours, le blastème a atteint le stade cône, stade caractérisé par une intense prolifération cellulaire. L'activité mitotique du blastème apparaît donc comme étant le reflet du potentiel mitogène de la moelle épinière. Ainsi les moelles épinières d'Axolotl, amputés depuis 14 jours et régénérant à des vitesses différentes en raison de leur âge, présentent un potentiel mitogène différent, les moelles d'animaux âgés et régénérant lentement, présentent un potentiel mitogène inférieur à celui d'animaux plus jeunes et régénérant plus rapidement. On peut donc penser qu'il existe une corrélation étroite entre l'activité mitogène de la moelle épinière (ou plus précisément entre la production de substances mitogènes d'origine spinale) et la régénération (exprimée en terme d'intensité de prolifération). Il est intéressant de souligner que lorsque le blastème atteint le stade cône, l'activité mitogène de la moelle est particulièrement élevée ; c'est d'ailleurs à ce stade que la protéosynthèse dans la moelle est la plus forte (Boilly et Scaps, 1986). Il est donc raisonnable de considérer que la production de substance mitogène par la moelle épinière est stimulée après amputation du membre corrélativement aux besoins en cellules correspondant à l'édification du régénérat.

CHAPITRE III

INFLUENCE DE L'EDGF I ET II SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES MESENCHYMATEUSES EN CULTURE.

CHAPITRE III

INFLUENCE DE L'EDGF I ET II SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES MESENCHYMATEUSES EN CULTURE.

I. - INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence *in vitro* le rôle mitogène d'extraits nerveux sur les cellules mésenchymateuses de blastèmes. Dans le cadre de la recherche de la nature du (des) facteur(s) trophique(s) d'origine nerveuse responsable(s) de la régénération, nous nous sommes proposés d'apprécier l'action de substances reconnues mitogènes et d'origine nerveuse. Dans ce chapitre, nous relaterons les résultats obtenus à l'aide du FGF, facteur de croissance majeur du système nerveux (Gospodarowicz et al, 1976).

Compte tenu du faible degré de purification du FGF disponible sur le marché, nous avons utilisé les deux formes de l'EDGF (EDGF I et EDGF II) purifiés à partir de rétines de bovin par le groupe de Barritault, (Barritault et al, 1982) dont on sait maintenant qu'elles correspondent aux FGF acide et basique (voir discussion).

II. - TECHNIQUES

A) Préparation des facteurs de croissance

Les facteurs de croissance issus de la rétine (EDGF) sont préparés selon la méthode utilisée par Courty et al (1985). Brièvement, les rétines provenant de bovins adultes sont prélevées sur des animaux fraîchement abattus, homogénéisées dans une solution de PBS puis centrifugées. Le surnageant est précipité au sulfate d'ammonium et la fraction active dialysée contre de l'acide acétique 0,1N puis contre du PBS. Cette fraction appelée EDGF 0,1N est ensuite chromatographiée sur heparine sépharose (Pharmacia). L'EDGF I (équivalent au FGF basique, Courty et al, 1986) est obtenu par élution de la colonne par du NaCl 1,4-1,6 M ; l'EDGF II (équivalent au FGF acide, Schreiber et al, 1985) est élué par du

NaCl 0,9-1,1M. L'EDGF II est enfin purifié par chromatographie liquide en phase reverse ; à ce stade de la purification, les deux facteurs peuvent être considérés comme pur à 95% (Moenner et al, 1986 ; Courty et al, en préparation). L'unité de stimulation (US) est mesurée selon Plouët et al (1984). Brièvement, les courbes dose-réponses sont obtenues par incorporation de Thymidine ^3H sur des cellules épithéliales de lentille de bovin (BEL) en présence d'EDGF ; l'unité de stimulation est définie par la quantité de protéine ajoutée à 1ml de milieu de culture induisant la moitié du maximum d'incorporation de Thymidine ^3H par les cellules. L'US de l'EDGF I est de 50 pg/ml (soit 3pmol/ml), celle de l'EDGF II de 500 pg/ml (soit 30 pmol/ml) et celle de l'EDGF 0,1N de 500 ng/ml.

B) Utilisation des facteurs de croissance

Les facteurs de croissance ont été employés seuls (1) soit associés à l'héparine (2).

1) L'EDGF a été utilisé soit sous une forme brute (EDGF 0,1N) à la concentration de 0,01 ; 0,1 et 1 US/ml, soit sous forme purifiée : EDGF I et EDGF II et pour chacune de ces deux formes à trois concentrations différentes : 0,1 ; 1 et 10 US/ml. Selon le cas, ces facteurs ont été utilisés soit après lyophilisation, soit après congélation.

2) Les facteurs de croissance ont été testés associés à l'héparine (Choay) (800 ng/ml) et à la concentration de 0,1 et 0,05 US/ml pour EDGF I et 0,1 US/ml pour EDGF II. D'autre part, un test dose-réponse a été réalisé pour l'héparine seule et pour quatre concentrations différentes : 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10 $\mu\text{g/ml}$.

III. - RESULTATS

Nous présenterons d'abord les résultats obtenus après utilisation des facteurs de croissance seuls, puis associés à l'héparine.

A) - Utilisation des facteurs de croissance non associés à l'héparine

1) EDGF 0,1N

Les résultats montrent que l'EDGF 0,1N stimule l'index mitotique en fonction de la quantité de facteur de croissance ajoutée au

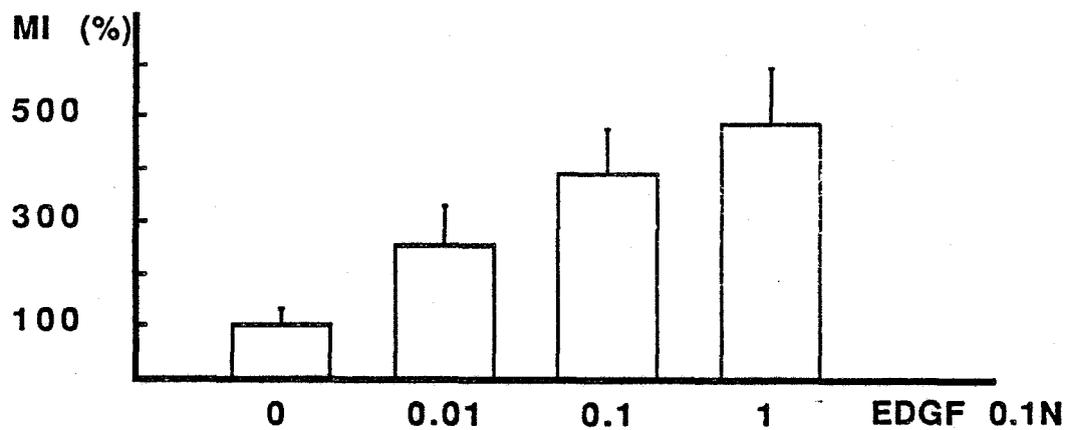


Fig. 25. Influence de concentration d'EDGF 0,1N (en US/ml) sur l'indice mitotique (MI). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (0 US/ml, MI =100).



milieu. A la plus forte dose utilisée, l'index mitotique est multiplié par un facteur de l'ordre de 5. (Tableau 11, Fig 25).

Concentration (US/ml)	0	0,01	0,1	1
Indice mitotique (%)	1,97 ± 0,65 (7)	5,04 ± 1,42 (7) **	7,68 ± 1,67 (8) **	9,57 ± 2,12 (7) **

Tableau 11 - Indice mitotique (en %) de cellules mésenchymateuses de blastème de régénération d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes d'EDGF 0,1 N (en US/ml, 1 US = 500 ng/ml). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

Le test t de Student est utilisé pour comparer les indices mitotiques des cellules mésenchymateuses placées en présence d'EDGF 0,1 N par rapport à la culture témoin (concentration =0) * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

2) EDGF I

Deux essais séparés ont été réalisés. Dans le premier essai, l'EDGF I est stocké sous forme lyophilisée ; dans le second, il est conservé à -40°C dans une solution de PBS avec 1% de sérum albumine bovine (SAB) (Tableau 12, Fig 26 et 27). Une concentration de 1 US/ml d'EDGF I permet d'obtenir la plus forte stimulation de l'indice mitotique et ceci dans les deux essais. Cette concentration permet, dans le cas le plus favorable, une multiplication par 5,7 de l'indice mitotique. Une forte concentration (10 US/ml) n'augmente pas l'indice mitotique mais semble même l'abaisser.

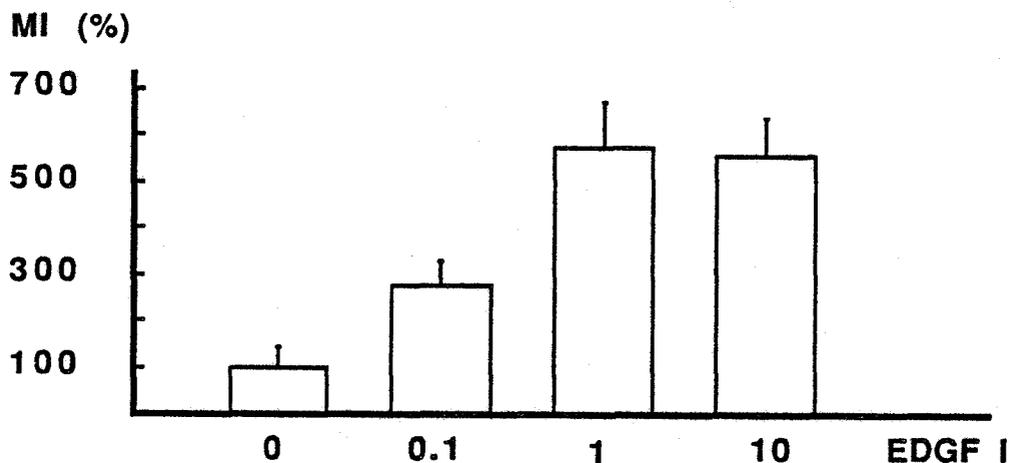


Fig. 26. Influence de la concentration d'EDGF I (en US/ml) sur l'indice mitotique (MI) (1er essai). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (0 US/ml, MI=100).

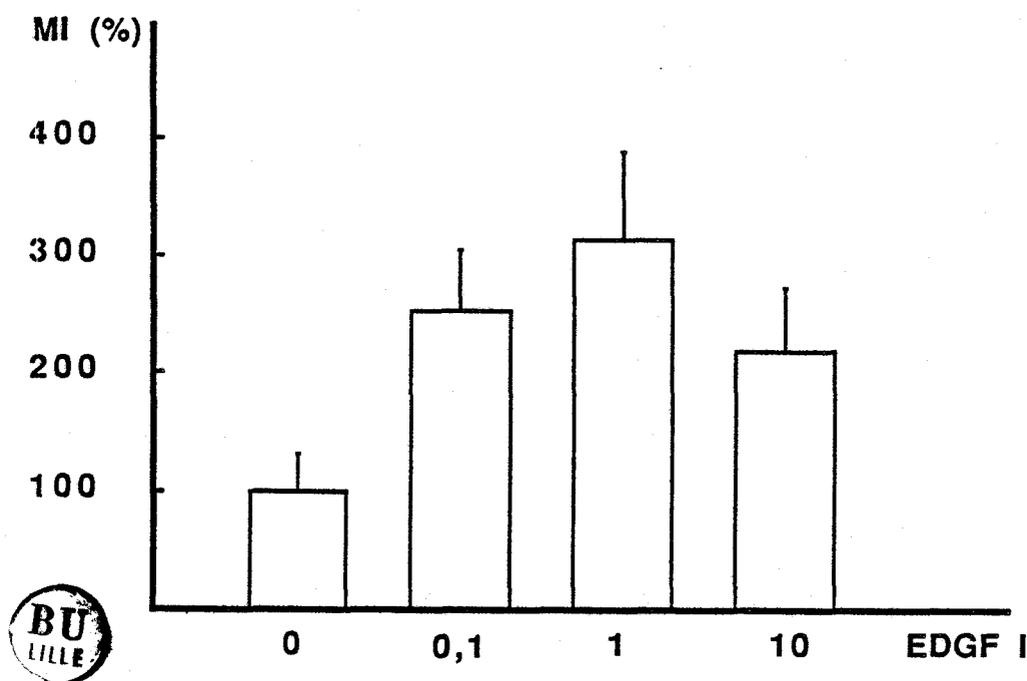


Fig. 27. Influence de la concentration d'EDGF I (en US/ml) sur l'indice mitotique (MI) (2ème essai). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (0 US/ml, MI=100).



Concentration (US/ml)	0	0,1	1	10
Indice mitotique (%) 1er essai	1,74 ± 0,72 (7)	4,81 ± 0,93 (9) **	10,0 ± 1,72 (9) **	9,66 ± 1,43 (8) **
Indice mitotique (%) 2ème essai	2,21 ± 0,66 (7)	5,61 ± 1,13 (7) **	6,94 ± 1,67 (7) **	4,84 ± 1,20 (7) **

Tableau 12 - Indice mitotique (en%) de cellules mésenchymateuses de blastème de régénération d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes d'EDGF I (en US/ml, 1 US = 50 pg/ml).

Le test t de Student est utilisé pour comparer les indices mitotiques des cellules mésenchymateuses en présence d'EDGF I par rapport à la culture témoin (concentration =0) * = p<0,05 ; ** = p<0,01.

3) EDGF II

Comme pour l'EDGF I, deux essais ont été réalisés avec les mêmes concentrations (0,1 ; 1 ; 10 US/ml). Dans les deux cas, l'EDGF II est stocké à -40°C dans une solution de PBS avec 1% de SAB pour le premier essai mais sans SAB pour le second. De la même manière que pour l'EDGF I, l'EDGF II stimule la prolifération en fonction de la concentration utilisée mais la plus forte stimulation est obtenue (respectivement x 4,9 et x 4,6) avec une dose 10 fois supérieure à celle utilisée pour l'EDGF I (Tableau 13, Fig 28 et 29).

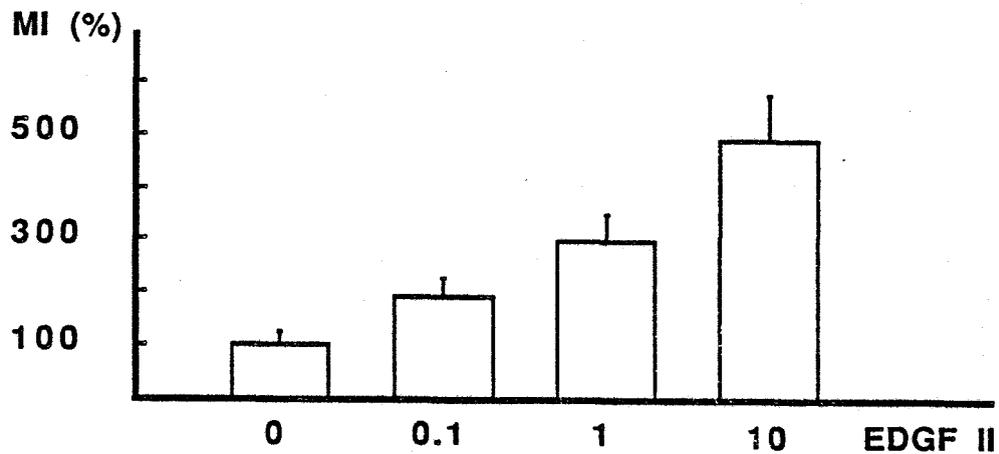


Fig. 28. Influence de la concentration d'EDGF II (en US/ml) sur l'indice mitotique (MI) (1er essai). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (0 US/ml, MI=100).

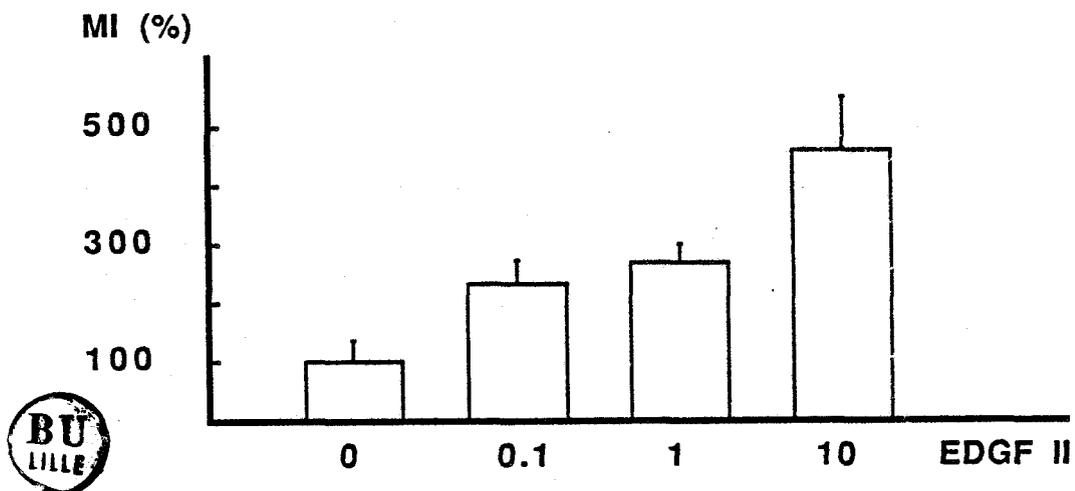


Fig. 29. Influence de la concentration d'EDGF II (en US/ml) sur l'indice mitotique (MI) (2ème essai). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (0 US/ml, MI=100).



Concentration US/ml	0	0,1	1	10
Indice mitotique (%) 1er essai	1,98 ± 0,51 (7)	3,93 ± 0,75 (8) **	5,85 ± 1,03 (7) **	9,71 ± 1,71 (7) **
Indice mitotique (%) 2ème essai	2,20 ± 0,75 (8)	5,05 ± 0,89 (7) **	5,88 ± 0,73 (8) **	10,11 ± 1,95 (7) **

Tableau 13 - Indice mitotique (en%) de cellules mésenchymateuses de blastème de régénération d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes d'EDGF II (en US/ml, 1 US = 500 pg/ml).

Le test t de Student est utilisé pour comparer les indices mitotiques des cellules mésenchymateuses en présence d'EDGF II par rapport à la culture témoin (concentration = 0) * = p<0,05 ; ** = p<0,01.

B) Utilisation des facteurs de croissance associés à l'héparine.

Deux essais ont été réalisés pour chacune des deux formes d'EDGF : EDGF I (Tableau 14, Fig 30 et 31), EDGF II (Tableau 15, Fig 32 et 33). Dans chacun de ces essais, le facteur de croissance stimule les cellules mésenchymateuses au même niveau que celui observé précédemment, indiquant une bonne reproductibilité de la réponse

cellulaire à l'EDGF (x 2,8 pour EDGF I et x2 pour EDGF II utilisés à une concentration de 0,1 US/ml). De même, l'héparine seule stimule de façon importante la prolifération cellulaire et ce, de façon dose-dépendante jusqu'à 1 µg/ml, dose pour laquelle le facteur de stimulation est d'environ 3 (Tableau 16, Fig 34).

Par contre, l'association de l'héparine (800 ng/ml) aux facteurs de croissance n'aboutit dans aucun cas à l'addition des effets obtenus séparément avec l'une ou l'autre de ces deux substances mais plutôt à une diminution de ces effets. Néanmoins, cette diminution d'efficacité de l'association héparine-facteur de croissance est beaucoup moins marquée pour l'EDGF II que pour l'EDGF I. En effet, pour l'EDGF I, le facteur de stimulation obtenu par l'utilisation de l'association héparine-facteur de croissance est significativement inférieur (-25% environ) à celui mesuré après utilisation de l'héparine seule ; par contre, il n'est pas statistiquement différent de celui obtenu après utilisation du facteur seul tout au moins lorsque celui-ci est utilisé à la dose de 0,01 US/ml; lorsque le facteur est utilisé à la dose de 0,1 US/ml ; lorsque le facteur est utilisé à la dose de 0,05 US/ml correspondant à une stimulation faible (x 1,8 contre x2,8 pour le cas précédent) l'association héparine-facteur de croissance est plus efficace (x2,5) que le facteur seul, mais toujours moins que l'héparine seule.

Par contre pour l' EDGF II, l'association héparine + facteur de croissance est toujours plus efficace que l'héparine utilisée seule (+40% et +80% respectivement pour chacun des deux essais) ou le facteur de croissance utilisé seul (+130% et +70% respectivement pour chacun des deux essais).

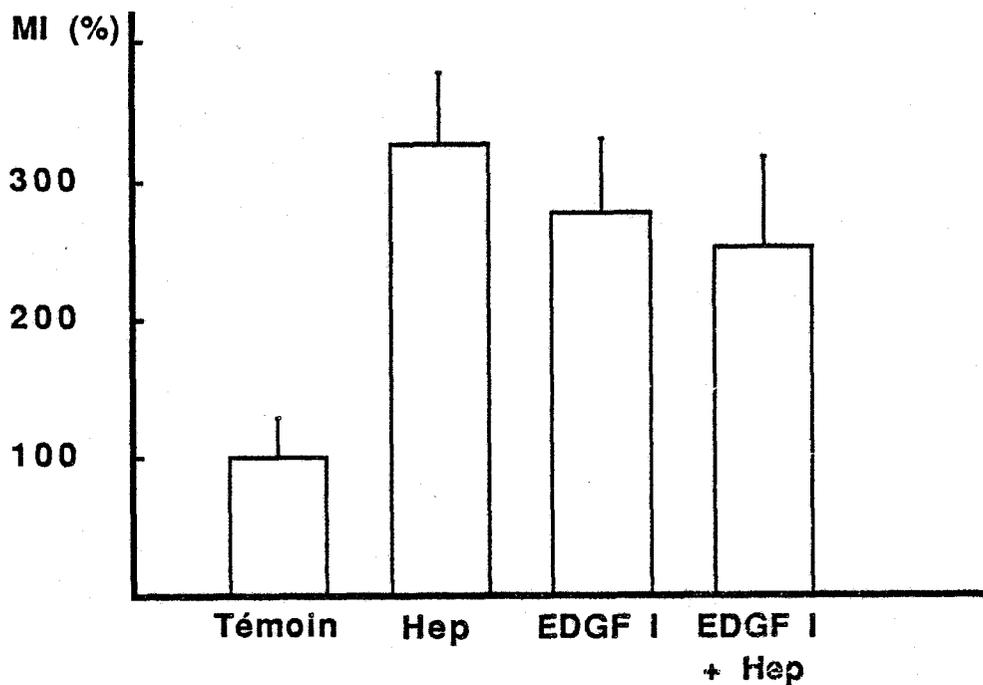


Fig. 30. Influence de l'EDGF I (0,1 US/ml) et de l'héparine (800 ng/ml) sur l'indice mitotique (MI). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (absence d'EDGF I et d'héparine, MI=100).

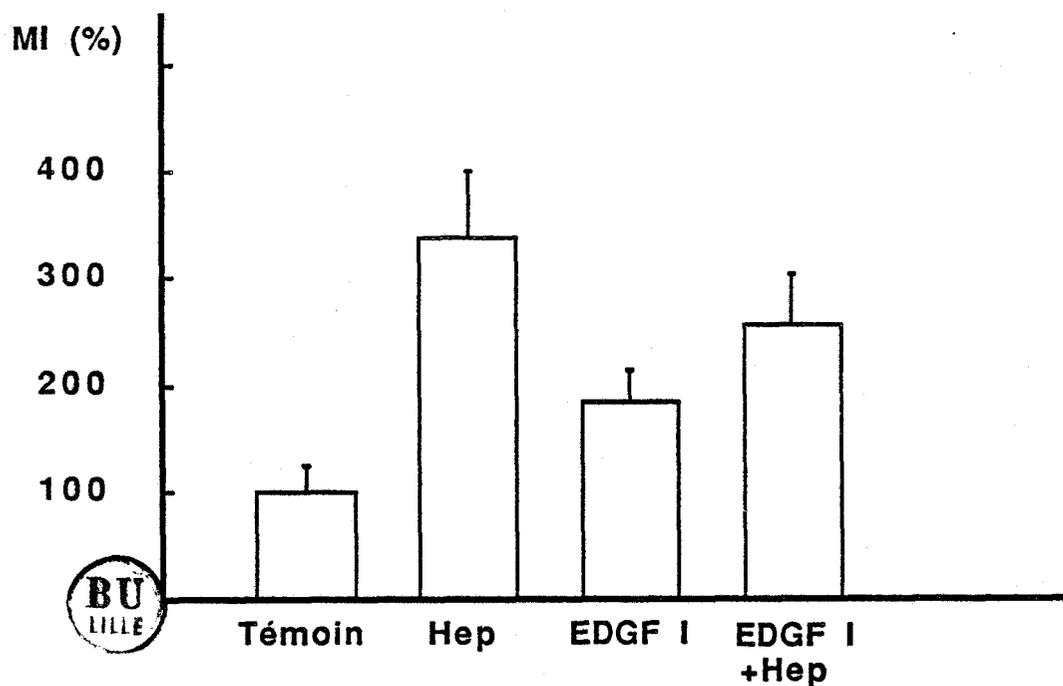


Fig. 31. Influence de l'EDGF I (0,05 US/ml) et de l'héparine (800 ng/ml) sur l'indice mitotique (MI). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (absence d'EDGF I et d'héparine, MI=100).

Concentration US/ml	0		0,05		0,1	
Héparine (800 ng/ml)	-	+	-	+	-	+
Indice mitotique (%) 1er essai	2,08 ± 0,58 (7)	6,80 ± 1,06 (7) *	/	/	5,75 ± 1,13 (7)	5,25 ± 1,35 (7)
Indice mitotique (%) 2ème essai	1,61 ± 0,41 (7)	5,44 ± 1,02 (7) **	2,95 ± 0,48 (7) **	4,14 ± 0,76 (7)	/	/

Tableau 14 - Indice mitotique (en %) de cellules mésenchymateuses de blastème de régénération d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes d'EDGF I (en US/ml) associé (+) ou non (-) à l'héparine (800 ng/ml). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

La barre (/) indique que l'essai n'a pas été réalisé.

Le test t de Student est utilisé pour comparer l'indice mitotique ;

- de cellules mésenchymateuses en présence d'héparine par rapport à l'indice mitotique de cellules mésenchymateuses en présence d'héparine + EDGF I * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

- de cellules mésenchymateuses en présence d'EDGF I par rapport à l'indice mitotique de cellules mesenchymateuses en présence d'héparine + EDGF I

• = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

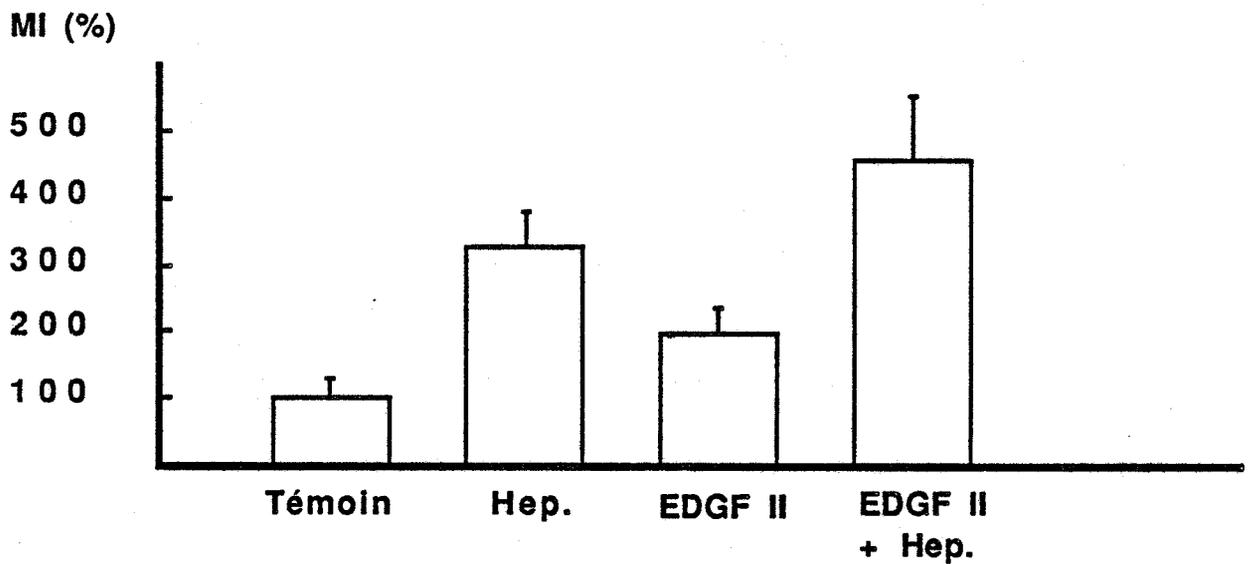


Fig. 32. Influence d'EDGF II (0,1 US/ml) et de l'héparine (800 ng/ml) sur l'indice mitotique (MI) (1er essai). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (absence d'EDGF II et d'héparine, MI=100).

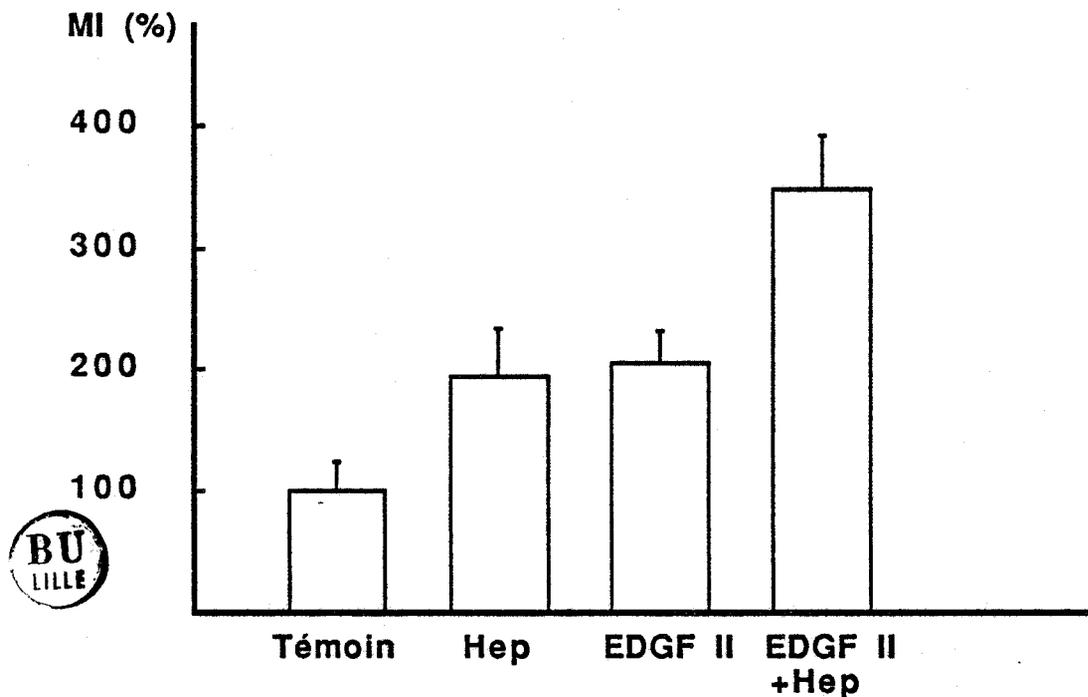


Fig. 33. Influence d'EDGF II (0,1 US/ml) et de l'héparine (800 ng/ml) sur l'indice mitotique (MI) (2ème essai). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (absence d'EDGF II et d'héparine, MI=100).

Concentration US/ml	0	0	0,1	
Héparine (800 ng/ml)	-	+	-	+
Indice mitotique (%) 1er essai	2,08 ± 0,58 (7)	6,80 ± 1,06 (7) **	4,11 ± 0,78 (7) **	9,55 ± 1,93 (7)
Indice mitotique (%) 2ème essai	1,82 ± 0,42 (7)	3,52 ± 0,72 (7) **	3,72 ± 0,48 (7) **	6,32 ± 0,80 (7)

Tableau 15 - Indice mitotique (en%) de cellules mésenchymateuses de blastème de régénération d'*Axolotl* placées en présence d'**EDGF II** (0,1 US/ml) associé (+) ou non (-) à l'**héparine** (800 ng/ml). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

Le test t de Student est utilisé pour comparer l'indice mitotique ;

- de cellules mésenchymateuses en présence d'héparine par rapport à l'indice mitotique de cellules mésenchymateuses en présence d'héparine + EDGF II * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

- de cellules mésenchymateuses en présence d'EDGF II par rapport à l'indice mitotique de cellules mésenchymateuses en présence d'héparine + EDGF II • = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

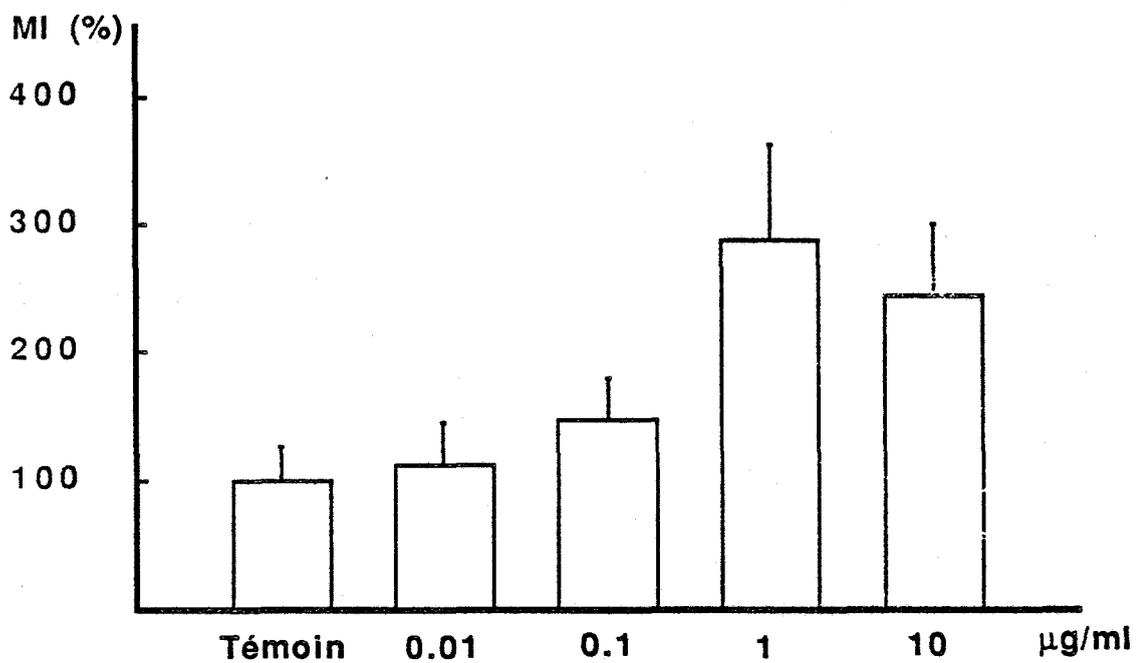


Fig. 34. Influence de la concentration d'héparine (en $\mu\text{g/ml}$) sur l'indice mitotique (MI). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin ($0\mu\text{g/ml}$, $\text{MI}=100$).



Concentration (µg/ml)	0	0,01	0,1	1	10
Indice mitotique (%)	1,93 ± 0,45 (6)	2,16 ± 0,63 (6)	2,83 ± 0,65 (6) *	5,55 ± 1,45 (6) **	4,73 ± 1,08 (6) **

Tableau 16 - Indice mitotique (en%) de cellules mésenchymateuses de blastème de régénération d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes d'héparine (en µg/ml). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

Le test t de Student est utilisé pour comparer les indices mitotiques des cellules mésenchymateuses en présence d'héparine par rapport à la culture témoin (concentration = 0) * = p<0,05 ; ** = p<0,01.

IV. - DISCUSSION

Nous considérerons les effets de l'EDGF d'abord utilisé seul puis en présence d'héparine.

A) Effets de l'EDGF sur la prolifération des cellules mésenchymateuses.

Les résultats obtenus montrent que les cellules mésenchymateuses de blastème de membre d'Axolotl sont capables de réagir à la présence d'EDGF dans leur milieu de culture en augmentant leur taux de prolifération et ce, de façon proportionnelle à la dose utilisée. A la dose optimale, l'index mitotique est multiplié par un facteur de l'ordre de 5 mais qui peut atteindre 5,7. Le taux de stimulation obtenu apparaît donc proche de celui atteint en présence d'extrait nerveux de Triton ou

d'embryon de Poulet (de l'ordre de 6). Par contre, il apparaît inférieur à celui que nous avons atteint en présence d'insuline, facteur avec lequel l'indice mitotique est multiplié par plus de 7 pour une dose de 0,84 U/ml. (33,6 μ g/ml). Néanmoins, la stimulation que nous avons obtenue à l'aide de l'EDGF apparaît la plus importante jamais obtenue sur des cellules blastémales de Triton traitées par des facteurs de croissance d'origine nerveuse que ce soit le FGF partiellement purifié (Mescher et Gospodarowicz, 1979 ; Rathbone et al, 1979 ; Gospodarowicz et Mescher, 1980 ; Carlone et al, 1981 ; Mescher et Loh, 1981 ; Chew et Cameron, 1983) ou le CBGF (facteur de croissance du cerveau de Poulet) (Carlone et Rathbone, 1985). Seuls Mescher et Gospodarowicz (1979) et Gospodarowicz et Mescher (1980) ont testé le FGF *in vivo* ; ce facteur, extrait selon le procédé de Gospodarowicz et al (1978) et correspondant à la forme basique, a été injecté sous un volume de 5 μ l de PBS dans un jeune blastème dénervé depuis 3 jours ; les blastèmes traités, étudiés histologiquement 24 H après l'injection de FGF, ont montré une bonne stimulation de l'index mitotique proportionnellement à la dose utilisée avec un effet maximum obtenu pour une dose de 50 μ g ; à cette dose, l'index mitotique bien que multiplié par 5 par rapport aux blastèmes dénervés non traités n'atteint que 70% de la valeur des témoins (blastèmes innervés). Dans notre cas, si l'on considère le témoin comme correspondant aux cellules traitées par un extrait nerveux (index mitotique x 6 par rapport aux cellules non traitées) on constate que l'EDGF amène l'index mitotique pratiquement au même niveau (index mitotique x 5,7 dans le cas le plus favorable) soit 95% de la valeur obtenue en présence d'extrait nerveux. Chew et Cameron (1983) ont aussi utilisé le FGF *in vivo* mais dans des membres normalement innervés et dont l'épiderme cicatriciel était remplacé par de la peau ; dans ce cas, le FGF utilisé à la dose de 0,1 à 0,2 μ g par implant d'Elwax 40, a permis non seulement d'effacer l'inhibition de la prolifération occasionnée par le remplacement de l'épiderme cicatriciel par de la peau mais de multiplier par 4 l'index mitotique des blastèmes traités par rapport aux blastèmes témoins. *In vitro* la stimulation observée après traitement de blastèmes entiers est relativement limitée. Carlone et al (1981) n'ont, en effet, observé qu'une multiplication maximale par 2,5 de l'index mitotique pour une dose de 10 ng/ml de FGF pituitaire bovin, le niveau de prolifération étant dose-dépendant. De même, Mescher et Loh (1981) ont rapporté une multiplication par 2,5-3 de la synthèse de DNA en présence de FGF de cerveau de bovin à la dose de

10-100 ng/ml. En culture de cellules de blastème, le FGF n'a été utilisé que par Hinterberger et Cameron (1983) ; toutefois, ces auteurs n'ont utilisé qu'une seule dose de FGF pituitaire bovin soit 50 ng/ml et n'ont signalé qu'une augmentation de l'index mitotique sans la chiffrer. En utilisant le même FGF (Collaborative Research) et à la même dose, nous avons observé qu'une augmentation de l'index mitotique de 2,5, l'indice passant de $0,9 \pm 0,3$ à $2,4 \pm 0,5$ en présence de FGF. Plus récemment, Carlone et Rathbone (1985) ont purifié partiellement un facteur de croissance à partir du cerveau de Poulet adulte : le CBGF pour "Chick Brain Growth Factor" ; ce facteur correspondant à un peptide basique de faible poids moléculaire (<6000 d) est actif sur les blastèmes cultivés *in vitro* ; il multiplie par 2,8 environ l'incorporation de Thymidine ^3H à la dose optimale de 10 ng/ml. Il apparaît donc que les auteurs ayant étudié l'effet mitogène des facteurs de croissance d'origine nerveuse n'ont utilisé que des facteurs basiques, que ce soit le FGF ou le CBGF ; tous ces facteurs stimulent la prolifération des cellules blastémales de façon plus ou moins importante.

Ils suggèrent que ces facteurs pourraient correspondre au facteur neurotrophique Brookes (1984) et Brookes et Kintner (1986) pensent aussi que le GGF (glial growth factor) un facteur de croissance basique isolé du cerveau de bovin, pourrait aussi jouer un rôle dans la stimulation nerveuse des blastèmes de Triton. Nous avons obtenu le même effet avec l'EDGF I qui, en fait, correspond au FGF basique (Courty et al, 1986). Par contre, aucun auteur n'a rapporté l'effet du FGF acide. Dans cette étude, nous avons pu constater que l'EDGF II, correspondant au FGF acide (Schreiber et al, 1985_a) stimule aussi la prolifération des cellules blastémales ; il convient cependant de remarquer que la quantité d'EDGF II nécessaire pour obtenir la plus forte stimulation ($\times 4,9$) est beaucoup plus importante (10 US/ml soit 5 ng/ml) que la quantité d'EDGF I (1 US/ml soit 50 pg/ml) nécessaire pour obtenir le même effet, c'est-à-dire 100 fois plus (en poids/volume).

Il apparaît donc que les cellules blastémales se comportent de la même façon que d'autres cellules pour lesquelles le FGF basique est toujours plus efficace que le FGF acide (Lobb et al, 1986 ; Gospodarowicz et al, 1986). Il faut toutefois noter que ceci est loin d'être une règle générale puisque Cuny et al (1986) signale une activité mitogène plus importante pour l'EDGF II par rapport à l'EDGF I dans la régénération du cristallin de triton

in vitro.

La signification biologique de ces résultats appelle un certain nombre de commentaires. Dans l'état actuel de nos connaissances, deux hypothèses peuvent être retenues. Ou bien le facteur neurotrophique (NTF) ne correspond pas à une seule entité moléculaire mais plutôt à un mélange de plusieurs facteurs de croissance et parmi ceux-ci EDGF I et II (soit les FGF basique et acide). Une situation similaire a déjà été signalée par Kaplowitz et al (1982) sur des cultures de cellules mésenchymateuses de bourgeon de membre embryonnaire de Souris : la prolifération maximale est en effet obtenue par la présence simultanée de plusieurs facteurs de croissance (EGF, FGF, insuline ou somatomedine C). Dans cette hypothèse, on comprend pourquoi la stimulation maximale obtenue par un facteur de croissance est toujours inférieure à celle donnée par un extrait nerveux (x6 dans les conditions de nos essais) ou encore le facteur neurotrophique n'est représenté que par un seul facteur de croissance. Dans ce cas, il pourrait correspondre au FGF basique, ce facteur étant capable de stimuler, dans une certaine mesure, la régénération *in vivo* (Gospodarowicz et al, 1976 ; Gospodarowicz et Mescher, 1980). Dans l'hypothèse de la présence d'un seul facteur de croissance dans le NTF, la sensibilité des cellules blastémales à d'autres facteurs de croissance (et notamment à l'EDGF II) implique que les cellules blastémales possèdent les récepteurs membranaires correspondants, ceux-ci n'étant pas concernés par la régénération.

B) EFFETS DE L'HEPARINE

Quand on compare l'effet de l'héparine associée au facteur de croissance par rapport à l'effet obtenu par le facteur de croissance seul, il apparaît nettement que l'héparine est sans effet lorsqu'elle est associée à l'EDGF I (sauf lorsque la dose du facteur est très faible, 0,05 US/ml). Par contre, l'héparine associée à l'EDGF II augmente de manière significative le niveau de stimulation obtenu avec l'EDGF II seul (entre 70% et 130%). L'effet potentialisateur de l'héparine a été montré pour l'ECGF (endothelial cell growth factor) (Maciag et al, 1982 ; Thornton et al, 1983 ; Maciag et al, 1984 ; Schreiber et al, 1985_b ; Rosenbaum et al, 1986), pour l'EDGF II (Schreiber et al, 1985_a) et pour le FGF acide (Schreiber et al,

1985_a ; Uhlrich et al, 1986). On considère actuellement qu'*in vivo* l'héparine permettrait de capter les facteurs de croissance facilitant ainsi leur action (Shing et al, 1984 ; Jeanny et al, 1987) peut-être en stabilisant la structure tertiaire comme le suggèrent Maciag et al (1984) et Gosporadowicz et Cheng (1986) ou encore en augmentant l'affinité de l'ECGF pour son récepteur (Schreiber et al, 1985_b).

Cette hypothèse est confortée par l'existence, à la surface des endothéliums, d'un heparan sulfate, structuralement et biologiquement similaire à l'héparine (Marcum et Rosenberg, 1984), qui pourrait piéger les facteurs affins pour l'héparine notamment l'ECGF (Shing et al, 1984). D'autre part, plus récemment Jeanny et al (1987) ont montré par autoradiographie que les deux formes de FGF marquées à l'¹²⁵I se fixent spécifiquement sur les membranes basales de l'oeil d'embryon de souris. La démonstration de la non intervention directe de l'héparine dans la stimulation de la croissance repose sur les effets antiprolifératifs de ce glycoaminoglycane sur différents types cellulaires comme les cellules cardiaques de Poulet transformées par le rétrovirus MC 29 (Balk et al, 1985), les cellules épithéliales de rat (Wright et al, 1985), les cellules musculaires lisses (Reilly et al, 1986) ou encore les cellules endothéliales humaines (Rosenbaum et al, 1986). Ces derniers auteurs ont d'ailleurs montré que l'inhibition de la croissance par l'héparine ne se manifeste qu'à faible concentration de sérum (1% de sérum humain) et que dans ces conditions, elle est dose-dépendante.

Nos résultats relatifs à l'utilisation de l'héparine seule sont donc en contradiction avec ces derniers, car à l'inverse, nous avons constaté une stimulation de la croissance des cellules cultivées en présence d'héparine. Ceci n'est pas sans rappeler les travaux de Ratner et al (1985) qui ont constaté qu'un héparan sulfate présent à la surface des axones des ganglions spinaux stimule la prolifération des cellules de Schwann lorsque celles-ci entrent en contact avec la surface neuronale. Toutefois, il convient de souligner que si dans le modèle de Ratner, le contact entre axone et cellule est nécessaire pour déclencher la prolifération, il n'en est pas de même au cours de la régénération du membre de triton où il a été montré que le facteur mitogène d'origine nerveuse est diffusible comme en témoignent en particulier les expériences de co-culture blastème-ganglion spinal de Globus et Véthamany-Globus (1977).

Compte tenu de l'ensemble des résultats obtenus par les autres auteurs à

savoir d'une part potentialisation de l'ECGF, du FGF acide et de l'EDGF II par l'héparine et d'autre part inhibition de la croissance par l'héparine seule, nos résultats ne peuvent être interprétés qu'en posant l'hypothèse de la production par nos cellules de facteur de croissance de type FGF acide et que ce facteur endogène serait potentialisé par l'apport d'héparine.

Dans ces conditions, un extrait de mésenchyme blastémal devrait être mitogène pour les cellules mésenchymateuses ; c'est ce que nous avons pu démontrer (voir Chapitre V).

Cette hypothèse permet de comprendre pourquoi l'héparine seule stimule plus la prolifération des cellules blastémales que l'EDGF I seul (utilisé à 0,1 ou 0,05 US/ml) (Tableau 14, Fig 30 et 31).

Par contre, la diminution de prolifération observée quand on associe EDGF I à l'héparine (de l'ordre de 25% par rapport à l'héparine seule) doit être interprétée dans le cadre d'une compétition entre le facteur endogène et l'EDGF I exogène vis à vis des récepteurs cellulaires ou encore d'une compétition de ces deux facteurs vis à vis de l'héparine pour laquelle il est connu que la forme basique (EDGF I) présente le plus d'affinité.

CHAPITRE IV

INFLUENCE DE LA TRANSFERRINE SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES MESENCHYMATEUSES EN CULTURE.

CHAPITRE IV

INFLUENCE DE LA TRANSFERRINE SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES MESENCHYMATEUSES EN CULTURE.

I. - INTRODUCTION

Comme au cours de la régénération du membre d'Amphibien, le système nerveux exerce un rôle "trophique" sur les muscles squelettiques de Vertébrés assurant la maintenance et la maturation des fibres musculaires (revue dans Guth, 1974 ; Gutmann, 1976). La substance responsable de cette action, appelée sciatine, (Markelonis et al, 1980) ou facteur neurotrophique (Popiela et Ellis, 1981) a été identifiée comme correspondant à une forme neurale de la transferrine (Kimura et al, 1981 ; Markelonis et al, 1982 ; Beach et al, 1983). Cette molécule, encore appelée "neurotransferrine" (Popiela et al, 1984) et localisée dans les motoneurones (Oh et al, 1981) exerce aussi un rôle mitogène sur les myoblastes en culture (Beach et al, 1983 ; Popiela et al, 1984) tout comme la transferrine serique sur un très grand nombre de types cellulaires (Barnes et Sato, 1980). Compte tenu de cette fonction mitogène, il nous a semblé intéressant d'apprécier l'effet de cette molécule sur les cellules blastémales en culture. Ce chapitre est destiné à préciser le rôle de la transferrine dans notre modèle.

II. - TECHNIQUES

Nous avons utilisé de la transferrine humaine (Sigma) à des concentrations comprises entre 0,2 et 20 $\mu\text{g/ml}$.

La relation entre la concentration de transferrine dans le milieu et la réponse des cellules blastémales a été recherchée dans deux essais ; le premier pour des concentrations de 0,2 ; 2 et 20 $\mu\text{g/ml}$, le second pour 0,8 ; 1,6 et 3,2 $\mu\text{g/ml}$.

L'influence d'un enrichissement du milieu en sels ferriques (100 $\mu\text{M/ml}$ de

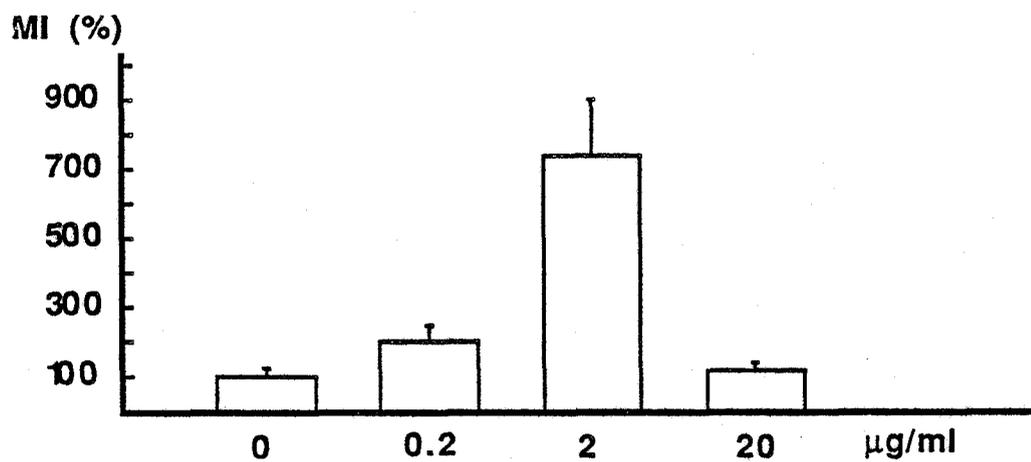


Fig. 35. Influence de la concentration de transferrine (en $\mu\text{g/ml}$) sur l'indice mitotique (MI) (1er essai). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin ($0\mu\text{g/ml}$, $\text{MI}=100$).



FeCl₃) a été étudiée en présence ou non de transferrine à la concentration de 20 µg/ml.

III. - RESULTATS

1) Influence de la transferrine sur la prolifération des cellules mésenchymateuses de blastème.

Les résultats obtenus (Tableaux 17 et 18, Figures 35 et 36) montrent que la transferrine agit de façon optimale pour des concentrations comprises entre 0,8 et 3,2 µg/ml ; pour ces concentrations, le facteur de stimulation est compris entre 10 et 12. Par contre, pour une dose dix fois plus élevée (20 µg/ml) la transferrine ne stimule pas la prolifération.

Concentration (µg/ml)	0	0,2	2	20
Indice mitotique (%)	1,30 ± 0,27 (7)	2,62 ± 0,59 (7) **	9,58 ± 2,15 (7) **	1,48 ± 0,35 (7)

Tableau 17 : Indice mitotique (en%) de cellules mésenchymateuses de blastème d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes de transferrine (en µg/ml). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

Le test t de Student est utilisé pour comparer l'indice mitotique des cellules mésenchymateuses en présence de transferrine par rapport à la culture témoin (concentration = 0) * = p < 0,05 ; ** = p < 0,01.

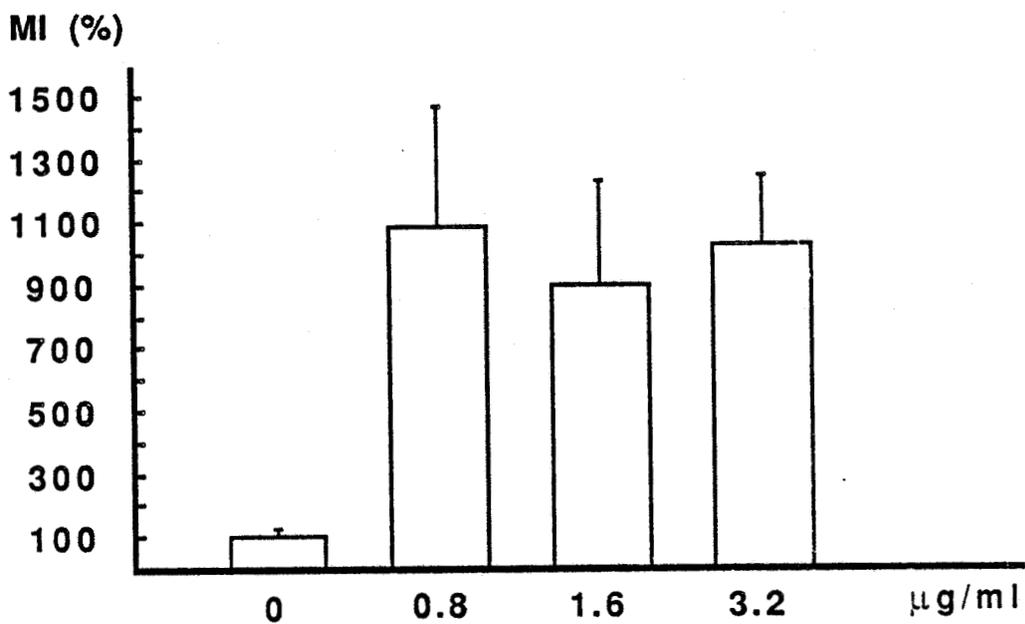


Fig. 36. Influence de la concentration de **transferrine** (en $\mu\text{g/ml}$) sur l'indice mitotique (MI) (2ème essai). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin ($0\mu\text{g/ml}$, $\text{MI}=100$).



Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	0,8	1,6	3,2
Indice mitotique (%)	$1,18 \pm 0,30$ (7)	$12,81 \pm 4,52$ (7) **	$10,68 \pm 3,86$ (7) **	$12,18 \pm 2,64$ (7) **

Tableau 18 - Indice mitotique (en %) de cellules mésenchymateuses de blastème d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes de transferrine (en $\mu\text{g/ml}$). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

Le test t de Student est utilisé pour comparer l'indice mitotique des cellules mésenchymateuses en présence de transferrine par rapport à la culture témoin (concentration = 0) * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

2) Influence d'un enrichissement du milieu de culture en FeCl_3 sur la prolifération des cellules mésenchymateuses de blastème.

L'apport de $100 \mu\text{M}$ de FeCl_3 (Tableau 19, Figure 37) en l'absence de transferrine ne modifie pas la capacité mitotique des cellules blastémales. Par contre, associé à une dose élevée de transferrine ($20 \mu\text{g/ml}$), il stimule la prolifération par un facteur 3,5 alors qu'à cette dose, la transferrine employée seule est sans effet.

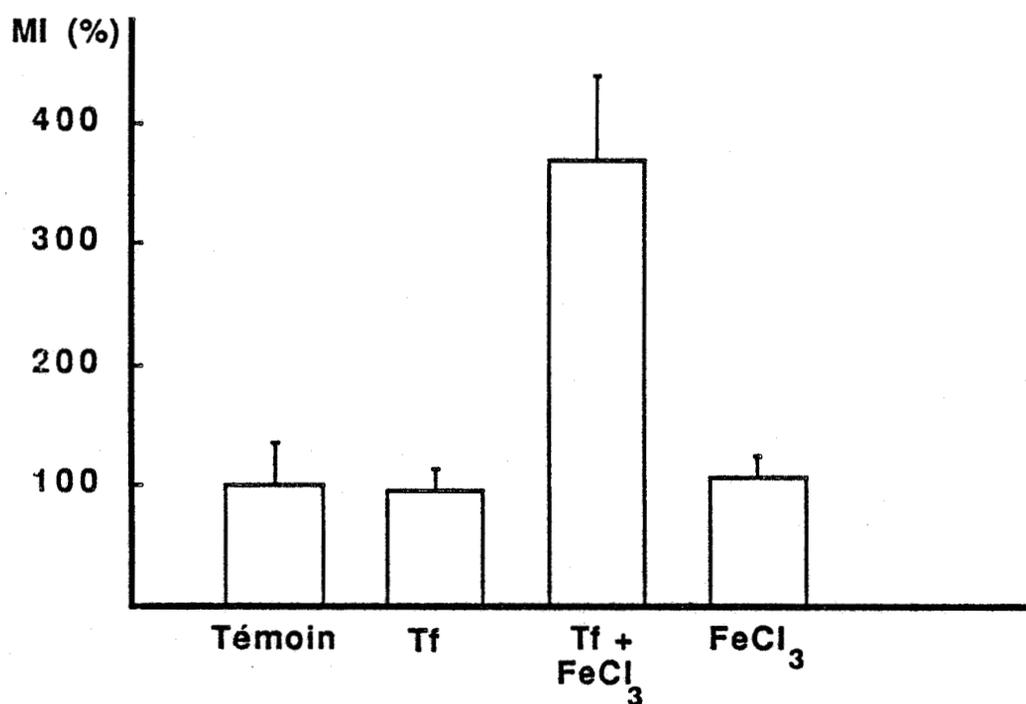


Fig. 37. Influence de la transferrine (20 μ g/ml) et du Fe Cl₃ (100 μ M/ml) sur l'indice mitotique (MI). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (absence de transferrine et de FeCl₃, MI=100).



Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	0	20	
FeCl_3 ($\mu\text{M/ml}$)	0	100	0	100
Indice mitotique (%)	$1,81 \pm 0,63$ (7)	$1,92 \pm 0,34$ (7)	$1,71 \pm 0,35$ (7)	$6,67 \pm 1,30$ (7) ** ..

Tableau 19 - Indice mitotique (en %) de cellules mésenchymateuses de blastème d'Axolotl placées en présence de transferrine (20 $\mu\text{g/ml}$) ou de FeCl_3 (100 $\mu\text{M/ml}$). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

Le test t de Student est utilisé pour comparer l'indice mitotique des cellules mésenchymateuses en présence de transferrine, de FeCl_3 ou d'une association de ces deux substances par rapport

- à l'indice mitotique des cellules cultivées dans le milieu de base (concentration = 0, FeCl_3 = 0) * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

- à l'indice mitotique des cellules cultivées en présence de 20 $\mu\text{g/ml}$ de transferrine • = $p < 0,05$.. = $p < 0,01$.

IV. - DISCUSSION

L'importance de la transferrine comme facteur nécessaire à la prolifération cellulaire est maintenant bien établie (Barnes et Sato, 1980). Son action serait due essentiellement au rôle du fer dans la prolifération cellulaire (Bezkorovainy, 1980) et à la capacité de la

transferrine à délivrer cet ion de manière appropriée aux cellules (Morgan, 1981). L'action de la transferrine, lors de la régénération, n'a été jusqu'à maintenant étudiée qu'en culture de blastème (Mescher et Munaim, 1984). Ces auteurs obtiennent, pour une concentration de transferrine de 50 $\mu\text{g/ml}$, une multiplication par 2 de l'incorporation de Thymidine ^3H dans un milieu contenant 1% de sérum foetal de veau soit une stimulation 5 à 6 fois inférieure à celle que nous avons obtenue en culture de cellules blastémales, alors que la concentration utilisée par ces auteurs est 50 fois supérieure. Cette différence d'activité pourrait être due soit à une meilleure accessibilité de la transferrine aux récepteurs membranaires des cellules mésenchymateuses en culture, soit encore à l'utilisation d'un milieu de culture dépourvu d'extrait embryonnaire dont on sait que l'activité stimulatrice est en grande partie due à la transferrine qu'il contient (Barnes et Sato, 1980). Toutefois, comme Munaim et Mescher (1986) ainsi d'ailleurs que dans d'autres systèmes biologiques (Mather et Sato, 1979 ; Brock, 1981), nous avons constaté une diminution importante de la stimulation en présence d'une concentration importante de transferrine (20 $\mu\text{g/ml}$ dans notre système et 200 $\mu\text{g/ml}$ pour Munaim et Mescher).

Selon Perez- Infante et Mather (1982), cet effet résulterait d'une compétition des molécules de transferrine portant du fer et de celles n'en portant pas vis à vis des récepteurs membranaires de la transferrine, cette compétition se traduisant par une diminution d'apport de Fe^{3+} aux cellules. Comme Munaim et Mescher, nous avons pu vérifier cette hypothèse par l'addition de FeCl_3 au milieu de culture contenant une concentration élevée de transferrine (20 $\mu\text{g/ml}$) pour laquelle aucune stimulation n'est obtenue par l'utilisation de la seule transferrine ou du seul sel ferrique. Selon Munaim et Mescher (1986), il semblerait que l'apparition d'effets inhibiteurs lors de l'utilisation de fortes concentrations d'extrait nerveux (voir chapitre II) relèverait du même mécanisme. En effet, ces auteurs ont pu montrer que l'addition de sels ferriques (100 $\mu\text{M/ml}$) en même temps qu'une forte concentration d'extrait nerveux (250 $\mu\text{g/ml}$) permettait de restaurer l'effet stimulateur de ce dernier observé pour des concentrations plus faibles. Compte tenu de ces résultats, on peut supposer que la transferrine interviendrait au moins en partie dans le contrôle de la prolifération des cellules blastémales. Dans ces conditions, on comprend mieux pourquoi des extraits de foie, siège

majeur de la synthèse de transferrine (Meek et Adamson, 1985), s'avèrent plus efficaces que des extraits de cerveau pour stimuler la prolifération de myoblastes d'embryon de Poulet (Jabaily et Singer, 1978). D'autre part, il a été montré par immunoprécipitation que le cerveau et la moelle épinière de Triton contiennent de la transferrine (Munaim et Mescher, 1986). Bien que nous ne sachions pas si la transferrine est synthétisée (Stamatos et al, 1983) ou non par les neurones (Markelonis et al, 1985), ce résultat est particulièrement intéressant quand on sait que l'expression du gène de la transferrine est régulée au cours du développement (dans différents tissus non hépatiques et notamment le cerveau) chez le Rat (Levin et al, 1984). Compte tenu de la modulation de l'effet trophique de la moelle épinière au cours de la régénération (voir chapitre II), il serait particulièrement intéressant d'apprécier de la même façon l'évolution de la transferrine dans ce tissu au cours de la régénération du membre.

CHAPITRE V

**INFLUENCE D'UN EXTRAIT D'EPIDERME BLASTEMAL SUR LA
PROLIFERATION DES CELLULES MESENCHYMATEUSES EN CULTURE.**

CHAPITRE V

INFLUENCE D'UN EXTRAIT D'ÉPIDERME BLASTÉMAL SUR LA PROLIFÉRATION DES CELLULES MÉSENCHYMATEUSES EN CULTURE.

I. - INTRODUCTION

Les modèles biologiques (*in vivo* et *in vitro*) utilisés jusqu'à présent dans le cadre de l'étude du contrôle de la prolifération cellulaire des blastèmes de régénération de membre de Triton permettent d'aborder le rôle du système nerveux dans deux types de situations expérimentales complémentaires, l'une concernant l'évolution de blastèmes dénervés, l'autre l'application d'extraits nerveux sur des blastèmes dénervés. L'étude du rôle de l'épiderme blastémal ne bénéficie pas de la même approche en raison de la difficulté à travailler sur des blastèmes qui, dépourvus de leur épiderme, dégénèrent rapidement. En particulier, l'expérience consistant à appliquer des extraits épidermiques sur des blastèmes dépourvus d'épiderme n'a jamais été réalisée. Nous avons donc mis à profit notre culture de cellules blastémales pour aborder ce problème. Nous présenterons, dans ce chapitre, les résultats relatifs aux effets d'extraits d'épiderme de blastème, de mésenchyme blastémal et de blastème complet.

II. - TECHNIQUES

L'effet de l'épiderme blastémal a été recherché comparativement à celui des autres tissus blastémaux (mésenchyme seul, blastème complet) ou non blastémaux (muscle dorsal). Les extraits sont préparés en prélevant les tissus sur des blastèmes de régénération d'*Axolotl* (stade cône), obtenus 14 jours après l'amputation d'animaux âgés de 15 mois.

Chaque extrait est préparé de la manière suivante : les tissus sont prélevés et placés dans une solution de Ringer maintenue à 0°C par de la glace fondante. Ils sont broyés à l'aide d'un homogénéiseur de Potter puis centrifugés à 25000g pendant 1 h. Le surnageant est alors

récupéré et sa richesse en protéines déterminée.

Chacun des extraits a été utilisé aux concentrations suivantes :

a) Extrait d'épiderme blastémal : 3,5 ; 10 ; 20 $\mu\text{g/ml}$ pour le premier essai et 1,75 ; 3,5 ; 7 ; 14 $\mu\text{g/ml}$ pour le second essai.

b) Extrait de mésenchyme blastémal : 3,5 ; 7 ; 14 $\mu\text{g/ml}$ pour le premier essai et 7 ; 14 ; 28 $\mu\text{g/ml}$ pour le second essai.

c) Extrait de blastème complet ; 3,5 ; 7 ; 21 ; 42 $\mu\text{g/ml}$ pour le premier essai et 7 ; 14 ; 25 $\mu\text{g/ml}$ pour le second essai.

d) Extrait de tissu musculaire (= musculus dorsalis trunci) : 3,5 ; 7 et 14 $\mu\text{g/ml}$, un seul essai ayant été réalisé.

Parallèlement à ces essais, nous avons recherché l'effet de la sérum albumine bovine afin d'étudier l'influence d'un apport de protéines dans le milieu de culture.

III. - RESULTATS

Contrairement à la sérum albumine bovine qui ne provoque pas d'augmentation significative de la prolifération (Tableau 20, Figure 38) et au muscle qui stimule légèrement celle-ci (x1,7) (Tableau 21, Figure 39), tous les extraits de tissus blastémaux stimulent la prolifération cellulaire de façon plus ou moins importante suivant le type de tissu utilisé. Dans tous les cas, la réponse des cellules aux extraits de tissus blastémaux est dose-dépendante jusqu'à une concentration au-delà de laquelle l'indice mitotique tend à diminuer.

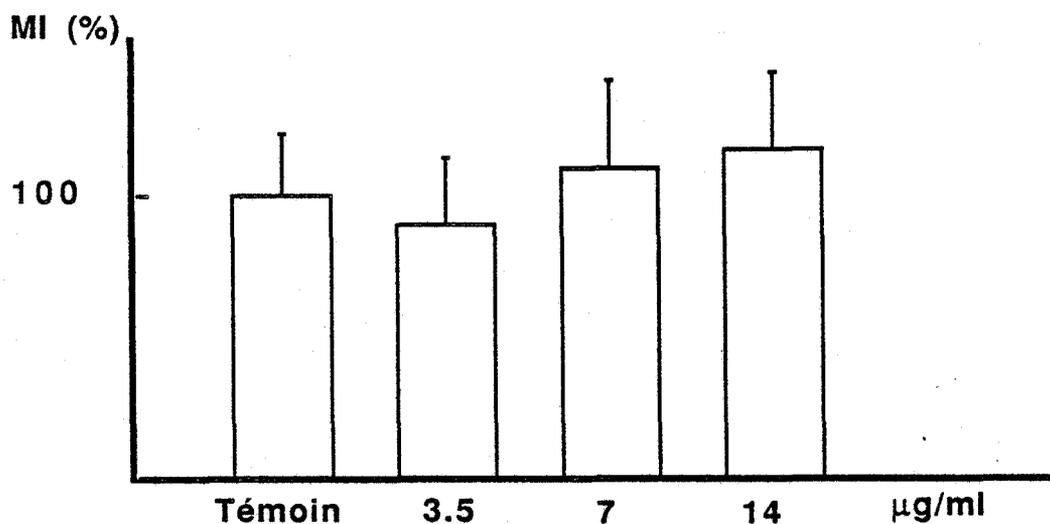


Fig. 38. Influence de la concentration de **sérum albumine bovine** (en $\mu\text{g/ml}$) sur l'indice mitotique (MI). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin ($0\mu\text{g/ml}$, $\text{MI}=100$).

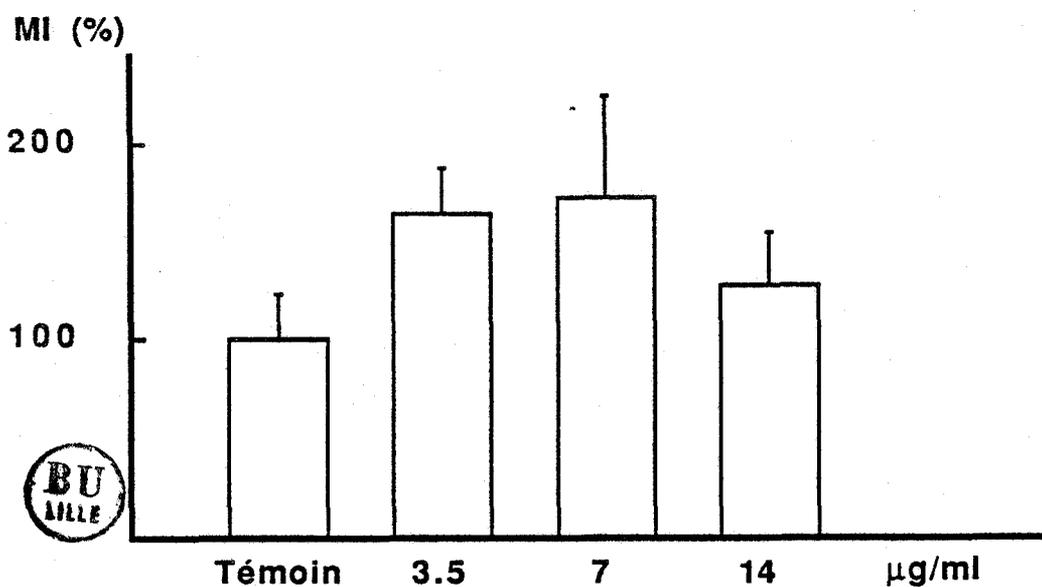


Fig. 39. Influence de la concentration d'extrait de **tissu musculaire** (en $\mu\text{g/ml}$) sur l'indice mitotique (MI). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin ($0\mu\text{g/ml}$, $\text{MI}=100$).

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	3,5	7	14
Indice mitotique (%)	$2,12 \pm 0,47$ (7)	$1,90 \pm 0,50$ (7)	$2,32 \pm 0,67$ (7)	$2,47 \pm 0,57$ (7)

Tableau 20. Indice mitotique (en%) de cellules mésenchymateuses de blastème d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes de **sérum albumine bovine** (en $\mu\text{g/ml}$). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	3,5	7	14
Indice mitotique (%)	$2,21 \pm 0,53$ (7)	$3,62 \pm 0,53$ (7) **	$3,81 \pm 1,14$ (7) **	$2,81 \pm 0,61$ (7)



Tableau 21. Indice mitotique (en %) de cellules mésenchymateuses de blastème d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes d'**extrait de tissu musculaire** (en $\mu\text{g/ml}$). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

MI (%)

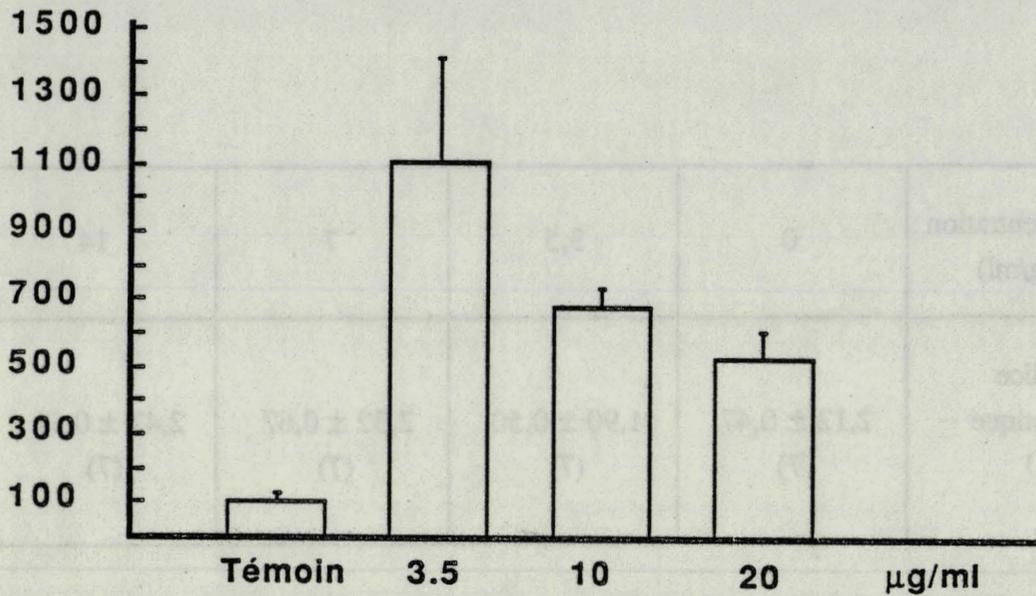


Fig. 40. Influence de la concentration d'extrait d'épiderme blastémal (en µg/ml) sur l'indice mitotique (MI) (1er essai). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (0µg/ml, MI=100).

MI (%)

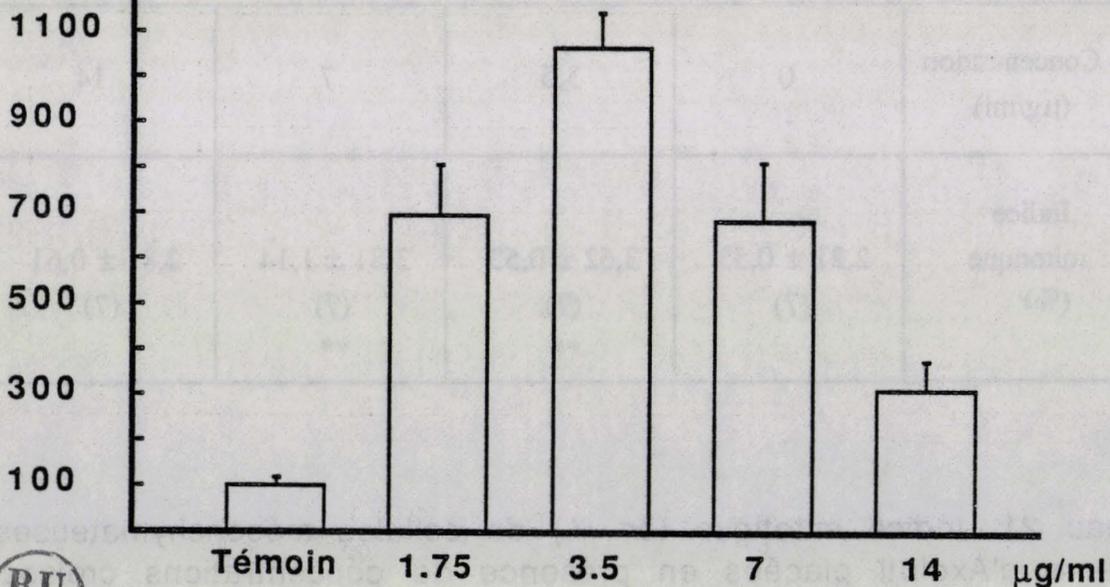


Fig. 41. Influence de la concentration d'extrait d'épiderme blastémal (en µg/ml) sur l'indice mitotique (MI) (2ème essai). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (0µg/ml, MI=100).



Le teste t de Student est utilisé pour comparer l'indice mitotique des cellules mésenchymateuses en présence d'extrait de tissu musculaire par rapport à la culture témoin (concentration=0) *=p<0,05 ; **=p<0,01.

A) Influence de l'extrait d'épiderme blastémal

L'addition d'extrait d'épiderme blastémal dans le milieu de culture conduit à une stimulation très importante de la prolifération cellulaire (Tableau 22, Figures 40 et 41). Les cellules mésenchymateuses sont particulièrement sensibles à de faibles concentrations de cet extrait, la stimulation maximale étant obtenue pour une concentration de 3,5 µg/ml, concentration à laquelle l'indice mitotique est multiplié par un facteur proche de 11.

Concentration (µg/ml)	0	1,75	3,5	7	10	14	20
Indice mitotique (%) 1er essai	1,94 ± 0,56 (7)	/	21,04 ± 5,85 (7) **	/	12,97 ± 0,99 (7) **	/	10,02 ± 1,68 (7) **
Indice mitotique (%) 2ème essai	1,71 ± 0,30 (7)	11,81 ± 1,92 (7) **	18,15 ± 1,35 (7) **	11,68 ± 2,21 (7) **	/	5,31 ± 1,15 (7) **	/

Tableau 22. Indice mitotique (en%) de cellules mésenchymateuses de blastème d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes

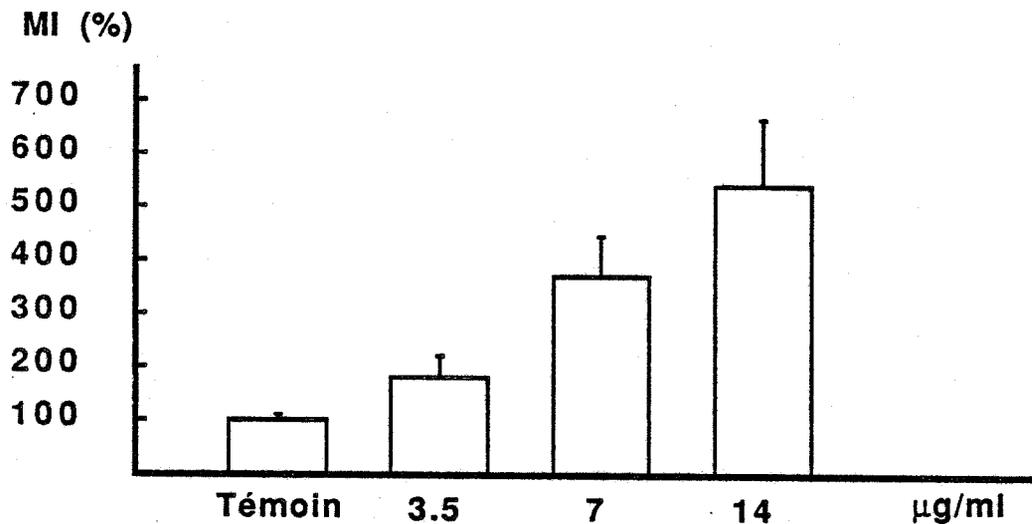


Fig. 42. Influence de la concentration d'extrait de **mésenchyme blastémal** (en $\mu\text{g/ml}$) sur l'indice mitotique (MI) (1er essai). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin ($0\mu\text{g/ml}$, $\text{MI}=100$).

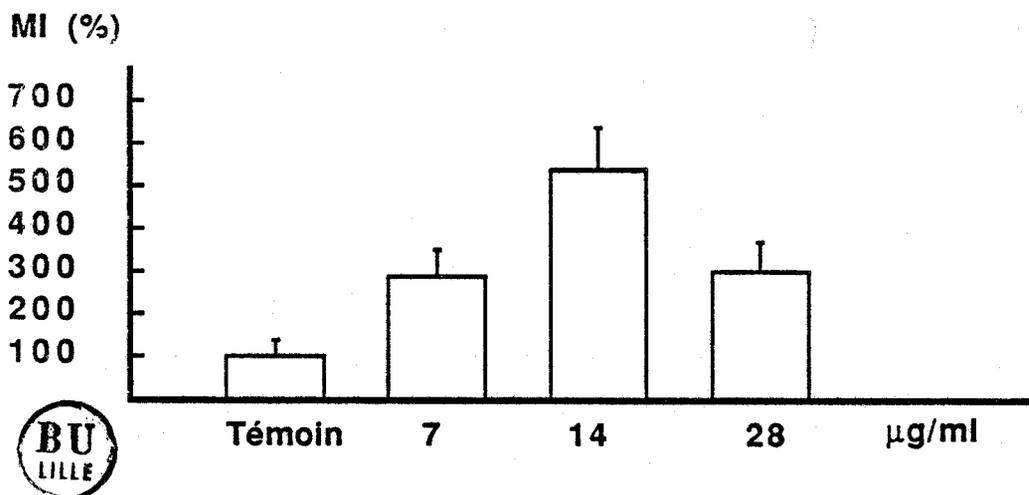


Fig. 43. Influence de la concentration d'extrait de **mésenchyme blastémal** (en $\mu\text{g/ml}$) sur l'indice mitotique (MI) (2ème essai). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin ($0\mu\text{g/ml}$, $\text{MI}=100$).



d'extrait d'épiderme blastémal (en $\mu\text{g/ml}$). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

Le test t de Student est utilisé pour comparer l'indice mitotique de cellules mésenchymateuses en présence d'extrait d'épiderme blastémal par rapport à la culture témoin (concentration=0) $*=p<0,05$; $**=p<0,01$.

La barre (/) indique que l'essai n'a pas été réalisé.

B) Influence de l'extrait de mésenchyme blastémal

L'utilisation d'une concentration de mésenchyme blastémal de 14 $\mu\text{g/ml}$ entraîne une multiplication de l'indice mitotique par un facteur proche de 5, alors qu'à faible concentration (3,5 et 7 $\mu\text{g/ml}$) la stimulation reste relativement peu élevée (Tableau 23, Figures 42 et 43). L'apport d'une quantité importante d'extrait de mésenchyme blastémal (28 $\mu\text{g/ml}$) entraîne une chute de l'indice mitotique qui retrouve, dans le deuxième essai, une valeur proche de celle obtenue avec une concentration quatre fois plus faible.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	3,5	7	14	28
Indice mitotique (%) 1er essai	2,08 \pm 0,24 (7)	3,65 \pm 0,85 (7) **	7,42 \pm 1,53 (7) **	10,82 \pm 2,55 (7) **	/
Indice mitotique (%) 2ème essai	1,64 \pm 0,56 (7)	/	4,62 \pm 1,03 (7) **	8,67 \pm 1,62 (7) **	4,84 \pm 1,06 (7) **

Tableau 23. Indice mitotique (en%) de cellules mésenchymateuses de

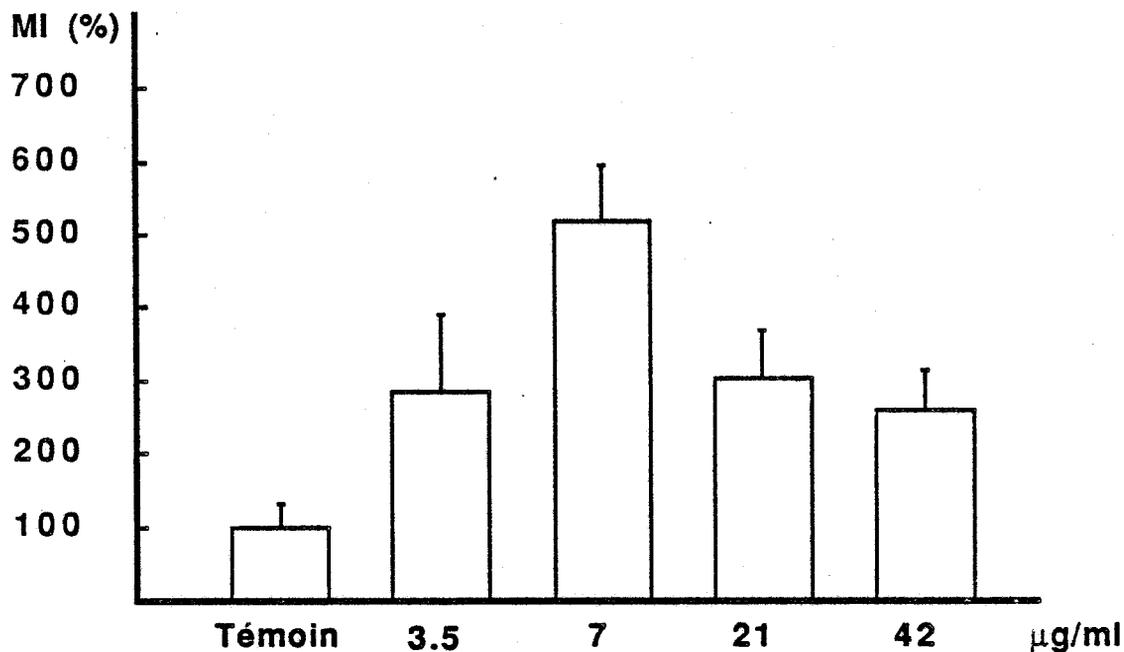


Fig. 44. Influence de la concentration d'extrait de **blastème complet** (en µg/ml) sur l'indice mitotique (MI) (1er essai). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (0µg/ml, MI=100).

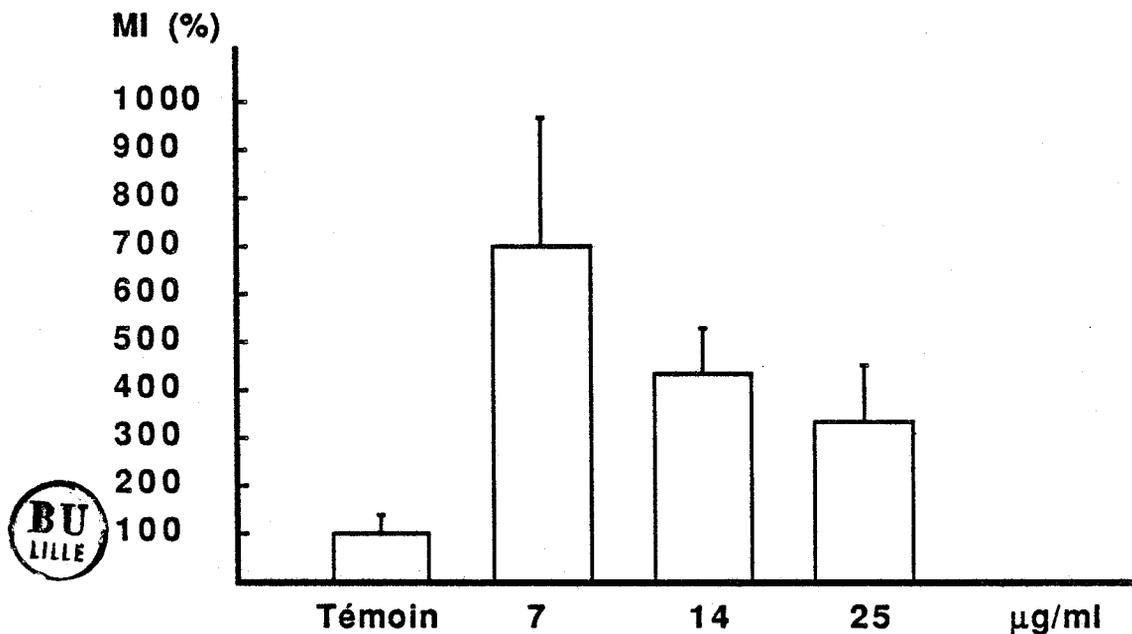


Fig. 45. Influence de la concentration d'extrait de **blastème complet** (en µg/ml) sur l'indice mitotique (MI) (2ème essai). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (0µg/ml, MI=100).

blastème d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes d'**extrait de mésenchyme blastémal** (en $\mu\text{g/ml}$). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

Le test t de Student est utilisé pour comparer l'indice mitotique de cellules mésenchymateuses en présence d'extrait de mésenchyme blastémal par rapport à la culture témoin (concentration=0) $*=p<0,05$; $**=p<0,01$.

La barre (/) indique que l'essai n'a pas été réalisé.

C) Influence de l'extrait de blastème complet

Le maximum de stimulation est obtenu pour une concentration de 7 $\mu\text{g/ml}$ (Tableau 24, Figures 44 et 45). A cette concentration, l'indice mitotique est multiplié par un facteur 7. L'addition d'extrait de blastème complet à des concentrations supérieures à 7 $\mu\text{g/ml}$ entraîne une baisse de l'indice mitotique qui reste néanmoins supérieur à celui de la culture témoin.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	3,5	7	14	21	25	42
Indice mitotique (%) 1er essai	$2,74 \pm 0,82$ (7)	$7,77 \pm 2,94$ (7) **	$14,20 \pm 2,11$ (7) **	/	$8,30 \pm 1,80$ (7) **	/	$7,10 \pm 1,51$ (7) **
Indice mitotique (%) 2ème essai	$1,80 \pm 0,69$ (7)	/	$12,65 \pm 4,15$ (7) **	$7,80 \pm 1,72$ (7) **	/	$6,05 \pm 2,08$ (7) **	/

Tableau 24. Indice mitotique (en%) de cellules mésenchymateuses de

blastème d'Axolotl placées en présence de concentrations croissantes d'**extrait de blastème complet** (en $\mu\text{g/ml}$). Entre parenthèses, nombre de boîtes sur lesquelles le calcul a été réalisé.

Le test t de Student est utilisé pour comparer l'indice mitotique des cellules mésenchymateuses en présence d'extrait de blastème complet par rapport à la culture témoin (concentration=0) *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$.

La barre (/) indique que l'essai n'a pas été réalisé.

IV. - DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent clairement que des extraits de tissus blastémaux, et notamment d'épiderme, stimulent de façon importante la prolifération des cellules mésenchymateuses en culture. L'absence d'influence de la sérum albumine bovine d'une part et la faible stimulation obtenue par l'utilisation d'extrait musculaire d'autre part, indique que l'effet stimulateur obtenu ne dépend pas d'une augmentation de la charge protéique du milieu de culture mais qu'il est en étroite relation avec l'origine blastémale des extraits utilisés.

Nous discuterons successivement les résultats obtenus avec les extraits d'épiderme blastémal puis avec ceux provenant du mésenchyme et du blastème complet.

1) Influence d'un extrait d'épiderme blastémal.

Le rôle de la cape épidermique dans la régénération du membre a d'abord été recherché *in vivo*. Compte tenu de la difficulté à maintenir *in situ* un blastème sans cape épidermique, les recherches ont été conduites sur des blastèmes dépourvus de cape épidermique implantés dans la cavité abdominale (Goss 1956_a et 1956_b) ou recouvert par un lambeau de peau (Taube, 1921 ; Mescher, 1976 ; Tassava et Garling, 1979) ou encore irradié aux UV (Thornton, 1958). Les résultats obtenus montrent que la présence de la cape épidermique est indispensable à la régénération du membre sans toutefois pouvoir en préciser le rôle exact (revue dans Stocum, 1985). Grâce à la culture de blastème, Globus et al (1980) ont pu démontrer que la cape épidermique contrôle le cycle des cellules mésenchymateuses ; en l'absence de cape épidermique, les cellules

mésenchymateuses s'engagent prématurément dans la différenciation cartilagineuse et corrélativement, l'indice mitotique diminue de façon significative. Ces auteurs suggèrent donc l'existence d'un "signal de division" produit par la cape épidermique et diffusant en direction centripète ; l'excrétion de ce signal permettrait de maintenir une zone de prolifération intense sous l'épiderme et assurerait un gradient de diffusion à l'intérieur du blastème. Singer et Salpeter (1961) ont montré au microscope électronique des images suggérant une sécrétion de matériel par les cellules de la cape épidermique dont on sait par ailleurs qu'elles se caractérisent par une synthèse de protéines et de RNA intense (Bodemer, 1963 ; Bodemer et Everett, 1959 ; Anton, 1965 ; Hay, 1966). Chapron (1974) a d'autre part montré à l'aide du fucose ^3H que les cellules de la cape épidermique synthétisent une glycoprotéine qui pourrait correspondre à de la fibronectine (Repeh et Furcht, 1982 ; Gulati et al, 1983). Enfin, un certain nombre d'arguments suggèrent que la cape épidermique pourrait être concernée dans la production de collagénase et d'acide hyaluronique (revue dans Stocum, 1985).

Cependant, si ces résultats relatifs à l'activité sécrétrice de l'épiderme permettent de comprendre comment est créé un environnement favorable au maintien de l'état indifférencié et à la prolifération cellulaire, ils ne donnent aucune indication sur la possibilité pour ce tissu de produire un facteur mitogène agissant directement sur les cellules du blastème. Par contre notre système, utilisant des cellules mésenchymateuses en culture extraites de leur matrice extracellulaire et un extrait épidermique, permet de répondre à cette question. Nous avons pu constater que l'épiderme blastémal contient une substance mitogène particulièrement active puisqu'une concentration dix fois inférieure à celle employée avec un extrait nerveux stimule deux fois plus la prolifération des cellules mésenchymateuses que ce dernier. Nos résultats montrent donc que le "signal de division" de Globus et al (1980) se comporte comme un facteur de croissance. Chew et Cameron (1983) ont d'ailleurs réussi à restimuler la prolifération de blastèmes dont la cape épidermique avait été remplacée par un lambeau de peau, à l'aide d'implant d'Elwax 40 contenant soit du FGF soit de l'ECGF ; ces auteurs ont observé une augmentation de l'index mitotique de 5 (avec l'ECGF) à 10 fois (avec le FGF) par rapport aux blastèmes recouverts de peau. Toutefois, on ne peut savoir, dans les conditions de cette expérience, si les facteurs de croissance utilisés suppléent l'absence de cape épidermique par augmentation du taux de

facteur neurotrophique ou remplacent effectivement la cape épidermique.

2) Influence d'extraits de mésenchyme et de blastème complet.

Dans nos résultats, il apparaît qu'un extrait de mésenchyme bien que deux fois moins efficace qu'un extrait d'épiderme pour une dose quatre fois supérieure, stimule de façon significative la prolifération des cellules mésenchymateuses. En effet, cet extrait apparaît pratiquement aussi efficace qu'un extrait nerveux (voir chapitre II). Dans l'état actuel de nos connaissances, deux hypothèses peuvent être proposées ; ou bien l'effet mitogène du mésenchyme provient des cellules mésenchymateuses elles-mêmes, ou encore l'effet mitogène du mésenchyme est dû à la présence dans ce tissu des facteurs de croissance issus du système nerveux ou de la cape épidermique.

La première hypothèse a déjà été envisagée pour expliquer la stimulation de la prolifération de cellules mésenchymateuses traitées avec de l'héparine en l'absence de facteur de croissance (voir chapitre III) ; dans cette hypothèse, le facteur produit par le mésenchyme serait mitogène pour les cellules mésenchymateuses elles-mêmes. L'hypothèse d'une autostimulation des cellules mésenchymateuses, rappelant le mode autocrine de sécrétion des facteurs de croissance tumoraux (Todaro et al, 1979), n'exclue pas cependant la possibilité pour le facteur mitogène d'origine mésenchymateuse de contrôler la prolifération des cellules de la cape épidermique.

La deuxième hypothèse correspond à celle proposée par différents auteurs ayant utilisé des extraits de blastème complet dans des membres dénervés (Deck et Futch, 1969 ; Burnett et al, 1971) ou irradiés (Deck et Dent, 1970). Ces extraits, supposés contenir le facteur neurotrophique ayant diffusé à partir du système nerveux (Burnett et al, 1971), ont permis la formation d'un blastème dans 76% des membres dénervés (Deck et Futch, 1969) ou d'assurer une "régénération normale" de ces membres (Burnett et al, 1971) mais sont restés inefficaces sur des membres irradiés (Deck et Dent, 1970). Brockes (1984) et Brockes et Kintner (1986) ont d'ailleurs montré que le blastème contient du GGF (Glial growth factor) facteur de croissance spécifique des cellules de Schwann de Rat et que ce facteur disparaît des membres dénervés.

Nos résultats permettent de considérer qu'une partie au moins de l'effet

mitogène d'un extrait de blastème complet provient de la cape épidermique, cette dernière représentant pratiquement en volume la moitié du blastème, l'autre provenant du mésenchyme. On comprend que dans ces conditions, un extrait de blastème stimule plus qu'un extrait de mésenchyme et moins qu'un extrait d'épiderme, l'effet maximum correspondant à la moyenne des stimulations les plus élevées obtenues séparément pour chaque tissu blastémal, et ceci, pour une concentration représentant la moyenne des concentrations utilisées pour obtenir ces effets.

CONCLUSION GENERALE

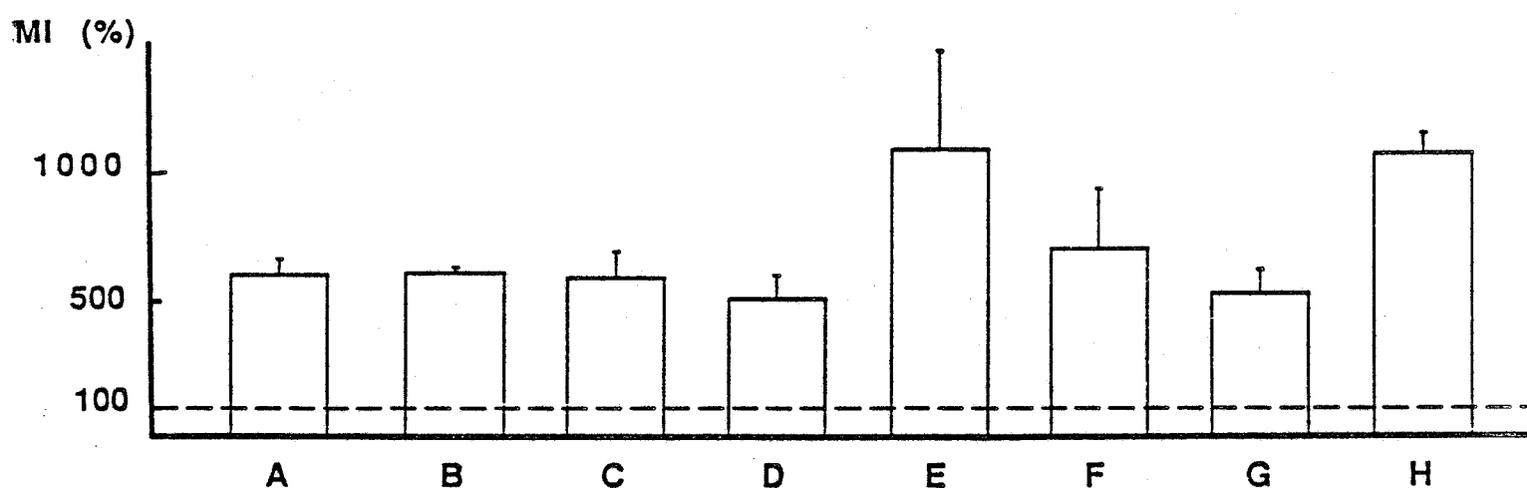


Fig. 46. Stimulation de l'indice mitotique (en %) de cellules mésenchymateuses de blastème de régénération d'Axolotl placées en présence d'extraits tissulaires ou de facteurs mitogènes par rapport à la culture témoin (ligne pointillée).

Seul le maximum de stimulation est indiqué.

- A - addition de 200 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait de cerveau d'embryon de Poulet
- B - addition de 30 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait nerveux de Triton
- C - addition de 50 pg/ml d'EDGF I (FGF basique)
- D - addition de 5 ng/ml d'EDGF II (FGF acide)
- E - addition de 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de transferrine
- F - addition de 7 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait de blastème complet
- G - addition de 14 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait de mésenchyme blastémal
- H - addition de 3,5 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait de cape épidermique.

CONCLUSION GENERALE

L'ensemble des résultats obtenus dans ce travail permet d'affirmer que la culture primaire de cellules mésenchymateuses de blastème de régénération de membre d'*Axolotl* constitue un excellent modèle d'étude du contrôle de la prolifération des cellules blastémales.

Ce système n'apparaît pas en particulier déconnecté de la réalité biologique du problème étudié. C'est ainsi que les cellules blastémales se comportent en culture comme dans le blastème entier que celui-ci soit étudié *in vitro* ou *in vivo*. En effet, elles restent capables de proliférer et de se différencier (en chondrocytes et fibres musculaires) et sont notamment susceptibles de réagir aux stimulations mitogènes émanant du système nerveux.

D'autre part, la culture de cellules blastémales présente l'avantage de permettre l'étude d'un seul type cellulaire (le mésenchyme) en dehors de toute autre influence tissulaire (l'épiderme en particulier) ce qui n'était pas possible jusqu'à présent. En outre, elle facilite l'observation des réactions cellulaires aux différents traitements utilisés sans avoir recours, comme précédemment, aux fastidieuses techniques histologiques.

L'utilisation intensive de la culture de cellules blastémales a permis de démontrer que ce type de bioessai se caractérise par une excellente fiabilité en raison de la bonne reproductibilité des résultats obtenus et une grande sensibilité (Fig. 46). C'est ainsi qu'un extrait nerveux de Triton employé à 30 $\mu\text{g/ml}$ engendre une stimulation de la prolifération 2,5 fois plus importante que la stimulation maximum obtenue par Munaim et Mescher (1986) avec une concentration trois fois plus élevée. Il en est de même pour la transferrine qui, utilisée à la concentration de 2 $\mu\text{g/ml}$, provoque une stimulation de la prolifération cellulaire trois fois supérieure à la stimulation maximum obtenue par Mescher et Munaim (1984) avec une dose 25 fois supérieure. De la même façon, des facteurs de croissance purifiés à partir de tissu nerveux agissent à des concentrations picomolaires en culture cellulaire alors qu'en culture de blastème, ils stimulent la prolifération à des concentrations nanomolaires (Carlone et Rathbone, 1985).

Grâce à ce système d'étude, nous avons confirmé le rôle

important du système nerveux dans la régénération du membre et vérifié l'efficacité de la transferrine et de facteurs de croissance d'origine nerveuse (FGF), facteurs que d'ailleurs nous avons utilisés, pour la première fois dans ce modèle, à l'état purifié et sous ses deux formes acide et basique.

D'autre part, nous avons apporté un certain nombre de résultats nouveaux notamment en ce qui concerne le rôle du système nerveux et de la cape épidermique dans le contrôle de la prolifération cellulaire des blastèmes de régénération.

A) Rôle du système nerveux.

Nous avons montré, pour la première fois, que la production de facteurs mitogènes par le système nerveux, et tout particulièrement par la moelle épinière, est modulée au cours de la régénération. La production de ces facteurs, plus importante au cours de la régénération, apparaît donc comme une réponse au traumatisme subi par l'animal amputé, nécessitant l'accumulation d'un grand nombre de cellules régénératrices indispensables à la reconstitution des parties perdues.

D'autre part, nous avons pu montrer que parmi les facteurs de croissance extraits du système nerveux la forme basique du FGF apparaît environ cent fois plus efficace que la forme acide, l'activité de cette dernière forme étant potentialisée par l'héparine comme d'ailleurs dans d'autres systèmes biologiques. L'efficacité de ces deux facteurs sur les cellules blastémales plaide en faveur de la complexité du "facteur neurotrophique" suggéré par Singer (1974), qui considère que le "facteur neurotrophique" pourrait correspondre à une association de plusieurs facteurs mitogènes et non à une seule entité moléculaire.

B) Rôle de la cape épidermique.

L'utilisation de la culture cellulaire a permis, pour la première fois, de mettre en évidence l'existence d'une activité mitogène liée directement à la cape épidermique. Cette activité pressentie par un certain nombre d'auteurs (Mescher, 1976 ; Tassava et Garling, 1979 ; Globus, 1980) n'avait pas pu être démontrée en raison de la difficulté ou de l'impossibilité de maintenir, *in vivo* ou en culture, des blastèmes dénudés. Grâce à la culture de cellules blastémales, nous avons pu montrer que la cape épidermique

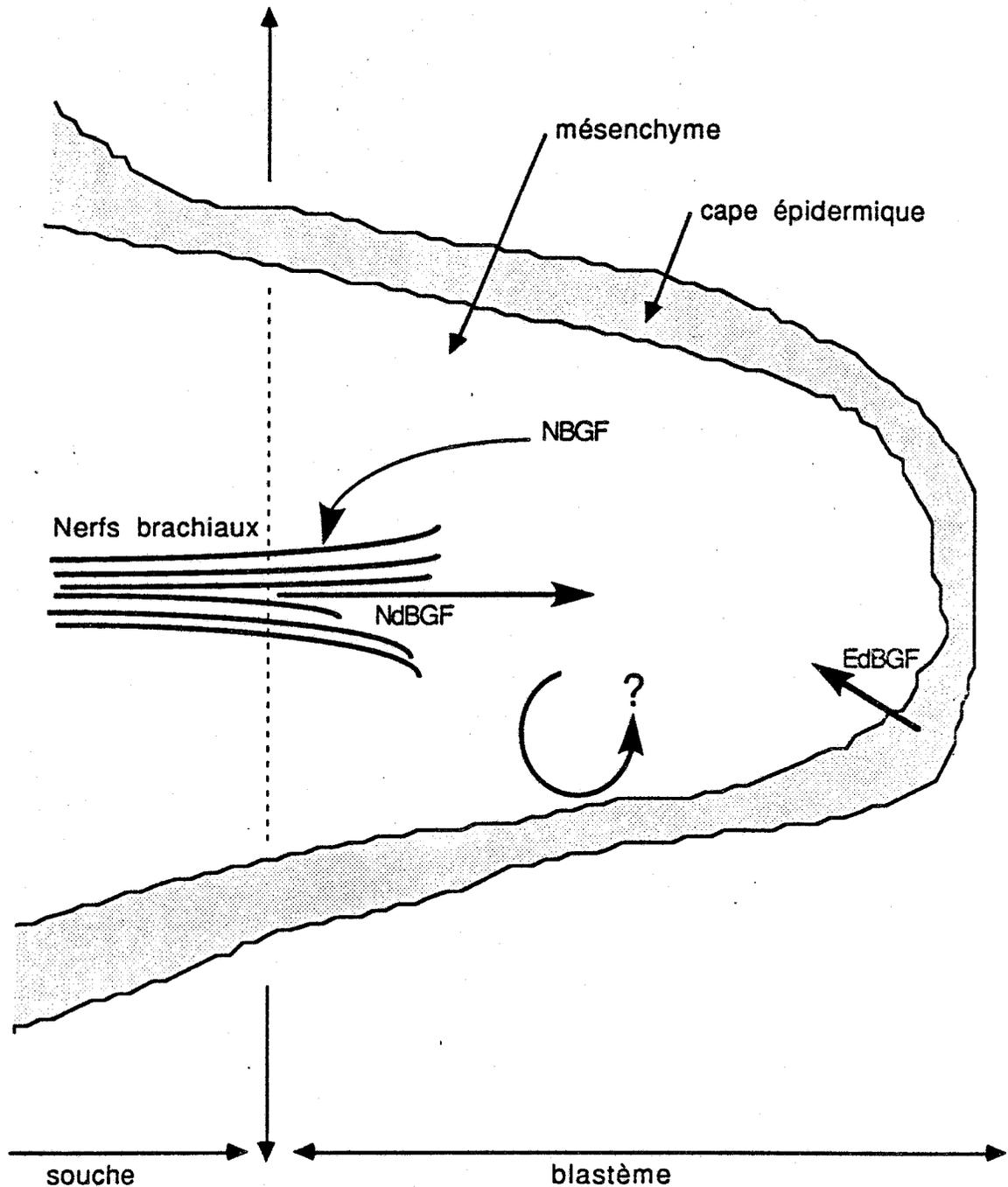


Fig. 47. Schéma récapitulatif de l'action des facteurs de croissance intervenant au cours de la régénération du membre d'Axolotl.

EdBGF : Epidermis derived Blastema Growth factor

NdBGF : Nerve derived Blastema Growth factor

BNTF : Blastemal neurotrophic factor.

contient un facteur mitogène extrêmement puissant puisqu'il stimule 2,6 fois plus qu'un extrait de moelle épinière pour une concentration en protéines 17 fois inférieure (Fig. 46).

Compte tenu de ces résultats, nous proposons de dénommer EdBGF (Epidermis derived Blastema Growth Factor) le facteur mitogène produit par la cape épidermique et NdBGF (Nerve derived Blastema Growth Factor) le facteur mitogène produit au cours de la régénération par le système nerveux (Fig. 47). Le NdBGF correspondant au NTF (Neurotrophic Factor ou "facteur neurotrophique" de Singer, 1974), terme qui nous semble particulièrement ambigu depuis qu'il a été démontré dans notre laboratoire (Lassalle et al, 1987) que le mésenchyme de blastème produit un facteur de croissance nerveux stimulant la régénération des fibres nerveuses amputées, le BNTF (blastemal neurotrophic factor).

Nous ne savons pas, pour l'instant, si le NdBGF et le EdBGF agissent sur les mêmes cellules ou sur deux populations différentes comme pourraient le laisser supposer les résultats relatifs à la prolifération de membre dénervé (Boilly et al, 1986). En effet, la dénervation d'un membre, si elle est suffisante pour bloquer la régénération, ne contrôle que 60% de la prolifération cellulaire. On peut donc supposer qu'une partie au moins des 40% restant est sous le contrôle de la cape épidermique (Boilly et Albert, 1987) ou/et peut-être de facteur(s) produit(s) par les cellules mésenchymateuses elles-mêmes comme le laissent supposer nos résultats relatifs à l'action de l'héparine utilisée en l'absence de FGF et à celle d'extrait de mésenchyme. Toutefois, tant qu'il n'aura pas été démontré que le rôle mitogène du mésenchyme n'est pas dû à la présence du NdBGF ou de l'EdBGF, comme le supposent Burnett et al (1971) et Brockes (1984) pour le facteur d'origine nerveuse*, la production par le mésenchyme blastémal d'un facteur stimulant par un mécanisme autocrine les cellules mésenchymateuses du blastème restera du domaine de l'hypothèse.

Il importera désormais de préciser la nature des facteurs mitogènes contrôlant la prolifération des cellules blastémales sur la base de la culture de cellules mésenchymateuses de blastème.

*Il convient de signaler que ces auteurs qui ont utilisé des extraits de blastème complet ne tiennent pas compte de la cape épidermique qui, à elle seule, peut expliquer l'effet mitogène observé après utilisation de ces extraits.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- AHRENS P.B., SOLURSH M et REITER RS., (1977). Stage related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev. Biol.*, **60**, 69-82.
- ANIZET M.P., HUWE B., PAYS A., et PICARD J.J., (1981). Characterization of a new cell line, XL2 obtained from *Xenopus laevis* and determination of optimal culture conditions. *In vitro*, **17**, 267-274.
- ANTON H.J., (1965). The origin of blastema cells and protein synthesis during forelimb regeneration in *Triturus*. In *Regeneration in Animals and Related problems*, Kiortsis V et Trampusch H eds, North Holland Amsterdam, 377-395.
- ARTHUR E. et BALLS M., (1971). Amphibian cells *in vitro*. I. Growth of *Xenopus* cells in a soft agar medium and on agar surface. *Exp. Cell Res.*, **64**, 113-118.
- BABICH G.L. et FORET J.E., (1973). Effects of dibutyryl cyclic AMP and related compounds on newt limb regeneration blastemas *in vitro* : II ¹⁴C Leucine incorporation. *Oncology*, **28**, 89-95.
- BALK S.D., RILEY T.M., GUNTHER H.S., MORISI A., (1985). Heparin-treated, V-MYC - transformed chicken heart mesenchymal cells assume a normal morphology but are hypersensitive to epidermal growth factor (EGF) and brain fibroblast growth factor (b FGF) ; cells transformed by the V-Ha- Ras oncogene are refractory to FGF and b FGF but are hypersensitive to insulin-like growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **82**, 5781-5785.
- BARNES D. et SATO G., (1980). Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal .Biochem*, **102**, 255-270.
- BARRITAU D., PLOUET J., COURTY J. et COURTOIS Y., (1982). Purification, characterization and biological properties of the eye derived growth factor from retina : analogies with brain derwed growth factor. *J. Neuroscience Res.*, **8**, 477-490.
- BEACH R., POPIELA H. et FESTOFF B., (1983). The identification of neurotrophic factor as a transferrin. *Febs letter*, **156**, 151-156.

- BEREITER-HAHN J., STROHMEIER R., KUNZENBACHER I., BECK K. et VOTH M., (1981). Locomotion of *Xenopus* epidermis cells in primary culture. *J. Cell. Science*, **52**, 289-311.
- BEZKOROVAINY A., (1980). Biochemistry of non heme iron. *Plenum, New-York*.
- BODEMER C.W., (1963). Distribution of ribonucleic acid in the regenerating urodele limb as determined by autoradiographic localization of Uridine-³H. *Anat. Rec.*, **142**, 457-468.
- BODEMER C.W. et EVERETT N.B., (1959). Localization of newly synthesized proteins in regenerating newt limbs as determined by radio autoradiographic localization of injected methionine-³⁵S. *Dev. Biol.*, **1**, 327-342.
- BOILLY B., OUDKHIR M. et LASSALLE B., (1985 a.) Rôle du système nerveux sur la prolifération cellulaire des blastèmes de régénération de membre de Triton (*Pleurodeles waltlii* Michah). *Develop. Growth and Differ.*, **27**, 129-135.
- BOILLY B., OUDKHIR M. et LASSALLE B., (1985 b.) Control of the blastemal cell cycle by the periferal nervous system during newt limb regeneration continuous labeling analysis. *Biol. Cell.*, **55**, 107-112.
- BOILLY B., MOUSTAFA Y. et OUDKHIR M., (1986). Image analysis of blastema cell proliferation in denervated limb regenerates of the newt, *Pleurodeles waltlii* M. *Differentiation*, **32**, 208-214.
- BOILLY B. et ALBERT P., (1987). Control of blastema cell proliferation during newt limb regeneration : *in vitro* cell culture study. *Anat. Micro. Morph. Exp.* (in press).
- BOILLY B. et SCAPS P., (1987). Biosynthetic activities in spinal cord during limb regeneration of Axolotl. *Arch. Anat. Micro. Morph. Exp.* (in press).
- BROCK J.H., (1981). The effect of iron and transferrin on the responses of serum-free cultures of mouse lymphocytes to concanavalin-A and lipopolysaccharide. *Immunology*, **43**, 387-392.
- BROCKES J.P., LEMKE G.E. et BALZER D.R., (1980). Purification and preliminary characterization of glial growth factor from the bovine pituitary. *J. Biol. Chem.*, **255**, 8374-8377.
- BROCKES J.P., (1984). Mitogenic growth factors and nerve dependence of limb regeneration. *Science*, **225**, 1280-1287.
- BROCKES J.P. et KINTNER C.R., (1986). Glial growth factor and nerve-dependent proliferation in the regeneration in the blastema of Urodele Amphibians. *Cell*, **45**, 301-306.

- BROMLEY S.C. et D.J. ANGUS, (1971). Early regenerative responses of amputated limbs of the newt. *Notophthalmus viridescens* to culture conditions. *Dev. Biol.*, **26**, 652-657.
- BURNETT A.L., KARY C.E. et LAGORIO A.M., (1971). Induction of growth in newt and frog limbs after perfusion with extracts from newt blastemas. *Nature*, **234**, 98-99.
- CAMERON J.A., (1983). Regeneration of skeletal muscle in *Notophthalmus viridescens*. In : *Limb Development and Regeneration*, Part. A. J.F. Fallon and A.I. Caplan, ed. Alan R. Liss, New-York, 491-500.
- CARLONE R.L. et FORET J.E., (1979.) Stimulation of mitosis in cultured limb blastemata of the newt, *Notophthalmus viridescens*. *J. Exp. Zool.*, **210**, 245-252.
- CARLONE R.L., GANAGARAJAH M. et RATHBONE M.P., (1981). Bovine pituitary fibroblast growth factor has neurotrophic activity for newt limb regenerates and skeletal muscle *in vitro*. *Exp. Cell Res.*, **132**, 15-21.
- CARLONE R.L. et MESCHER A., (1985). Trophic factors from nerves ; in Sicard, *Regulation of Vertebrate limb regeneration*. Oxford Univ Press. 93-105.
- CARLONE R.L. et RATHBONE M.P., (1985). Partial purification of a low molecular weight growth factor from chicken brain. *J. Cell. Physiol.*, **124**, 467-473
- CHAKULAS J.J., TSAI T. et SCHEVING L.E., (1973.) The histogenetic and biosynthetic capabilities of Urodele chondrocytes after short-term and prolonged culture *in vitro*. *Develop. Growth and Differ.*, **14**, 325-335.
- CHAPRON C., (1973). Etude comparée de la matrice et du mode d'action des substances neurotrophiques intervenant dans la régénération des Oligochètes et des Amphibiens. *C.R. Acad. Sciences. Paris*, **276**, 1463-1466.
- CHAPRON C., (1974). Mise en évidence du rôle, dans la régénération des Amphibiens, d'une glycoprotéine sécrétée par la cape apicale : étude cytochimique et autoradiographique en microscopie électronique. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **32**, 133-145.

- CHEW K.E. et CAMERON J.A., (1983). Increase in mitotic activity of regenerating Axolotl limb by growth factor-impregnated implants. *J. Exp. Zool.*, **226**, 325-329.
- CHINCHAR G.D., et SINCLAIR J.H., (1978). Amphibian cells in culture. I. Nutritional studies. *J. Cell. Physiol.*, **96**, 333-342.
- CHOO A.F., LOGAN D.M. et RATHBONE M.P., (1978). Nerve trophic effects : an *in vitro* assay for factors involved in regulation in regulation of protein synthesis in regenerating amphibian limbs. *J. Exp. Zool.*, **206**, 347-354.
- CHOO A.F., LOGAN D.M. et RATHBONE M.P., (1981). Nerve trophic effects : partial purification from chick embryo brains of proteins that stimulate protein synthesis in cultured newt blastemata. *Exp. Neur.*, **73**, 558-570.
- CLARK H.F., (1972). Cultivation of cells from poikilothermic vertebrates. In : *Growth nutrition and metabolism of cells in culture*. G.H. Rothblat. and V.J. Cristofalo ed. London Academic Press, Vol. 2, 286-325.
- CONN M.E., DEARLOVE G.E. et DRESDEN M.H., (1979). Selection of a chemically defined medium for culturing adult newt forelimb regenerates. *In vitro*, **15**, 409-414.
- COURTY J., LORET C., MOENNER M., CHEVALLIER B., LAGENTE O., COURTOIS Y. et BARRITAU D., (1985). Bovine retina contains three growth factors activities with different affinity to heparin : eye derived growth factor I, II, III. *Biochimie*, **67**, 265-269.
- COURTY J., CHEVALLIER B., MOENNER M., LORET C., LAGENTE O., BOHLEN P., COURTOIS Y. et BARRITAU D., (1986). Evidence for FGF-like growth factor in adult bovine retina : analogies with EDGF I. *Biochem . Biophys. Res .Comm.*, **136**, 102-108.
- CUNY R., JEANNY J.C. et COURTOIS Y., (1986). Lens regeneration from cultured newt irises stimulated by retina-derived factors (EDGFs). *Differentiation*, **32**, 221-229.
- DECK J.D. et FUTCH C.B., (1969). The effects of infused materials upon the regeneration of newt limbs : I Blastemal extracts in denervated limb stumps. *Dev. Biol.*, **20**, 332-348.
- DECK J.D. et DENT J.N., (1970). The effects of induced materials upon the regeneration of newt limbs : III Blastemal extracts and alkaline phosphatase in irradiated limb stumps. *Anat. Rec.*, **168**, 525-536.

- DECK J.D., (1971). The effects of infused materials upon the regeneration of newt limbs. III Blastemal extracts from newt brain and spinal cord. *Acta. Anat.*, **79**, 321-332.
- DESBIENS X., (1983). Etude expérimentale de l'effet de l'ectoderme sur la chondrification du mésoderme de membre embryonnaire de souris *in vitro*. *C.R. Hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris*, **296**, 593-596.
- DESBIENS X., CARETTE F., MEUNIER L. et BART A., (1985.) Chondrogenèse dans le bourgeon de membre de souris *in vitro*. I. Effet de l'ectoderme. *Biol. Cell.*, **55**, 113-124.
- DRESDEN M.H. et J. GROSS. (1970). The collagenolytic enzyme of the regenerating limb of the newt *Triturus viridescens*. *Dev. Biol.*, **22**, 129-137.
- DRESDEN M.H. et MOSES R.E., (1973). Denervation effects on newt limb regeneration : DNA polymerase activity *in vitro*. *Dev. Biol.*, **34**, 346-350.
- ELLINGER M.S., SHARIF S. et BEMILLER P.M., (1983). Amphibian cell culture : established fibroblastic line from embryos of the discoglossid Frog, *Bombina orientalis*. *In vitro*, **19**, 429-434.
- FIMIAN W.J. Jr, (1959). The *in vitro* cultivation of amphibian blastema tissue. *J. Exp. Zool.*, **140**, 125-143.
- FORET J.E. et BABICH G.L., (1973) Effects of dibutyryl cAMP and related compounds on newt limb regeneration blastemas *in vitro*. I. ³H-thymidine incorporation. *Oncology*, **28**, 83-88.
- FREED J.J., et L. MEZGER-FREED, (1970a). Culture methods for anuran cells. In : *Methods in Cell Physiology*. Vol. 4. D.M. Prescott Ed. Academic Press, 19-47.
- FREED J.J. et MEZGER-FREED. L., (1970 b.) Stable haploid cultured cell lines from frog embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **65**, 337-344.
- FREED J.J., MEZGER-FREED L. et SCHATZ S.A. (1969). Characteristics of cell lines from haploid and diploid anuran embryos in *Biology of amphibian tumors*, M. Mizell ed. Springer Verlag, Berlin, 101-111.
- GERAUDIE J. et SINGER M., (1984). Rôle du système nerveux périphérique au cours de la régénération des appendices de Vertébrés. *Ann. Biol.*, **23**, 243-270.
- GLOBUS M. et R.A. LIVERSAGE, (1975a). *In vitro* studies of limb regeneration in adult *Diemictylus viridescens* : neural dependence of blastemal cells for growth and differentiation. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **33**, 813-829.

- GLOBUS M., et R.A. LIVERSAGE, (1975b). Differentiation *in vitro* of innervated tail regenerates in larval *Ambystoma*. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **33**, 803-812.
- GLOBUS M. et S. VETHAMANY-GLOBUS. (1977). Transfilter mitogenic effect of dorsal root ganglia on cultured regeneration blastemata, in the newt, *Notophthalmus viridescens*. *Dev. Biol.*, **56**, 316-323.
- GLOBUS M., VETHAMANY-GLOBUS S. et LEE Y.C.I., (1980). Effect of apical epidermal cup on mitotic cycle and cartilage differentiation in regeneration blastemata in the newt. *Notophthalmus viridescens*. *Dev. Biol.*, **75**, 358-372.
- GLOBUS M., VETHAMANY-GLOBUS S., KESIK A. et MILTON G., (1983). Roles of neural peptide substance P and calcium in blastema cell proliferation in the newt, *Notophthalmus viridescens*. In *Limb development and Regeneration*, Part A, J.F. Fallon and A.I. Caplan, ed. Alan R. Liss, New-York, 547-555.
- GLOBUS M., VETHAMANY-GLOBUS S., (1985). *In vitro* studies of controlling factors in newt limb regeneration : In Sicard, *Regulation of Vertebrate limb regeneration*. Oxford University Press, 106-127.
- GOSPODAROWICZ D., WESEMAN J., MORAN J.J. et LINDSTROM J., (1976). Effect of fibroblast growth factor on the division and fusion of bovine myoblasts. *J. Cell. Biol.*, **70**, 395-399.
- GOSPODAROWICZ D., BIALECKI H. et GREENBURG G., (1978). Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. *J. Biol. Chem.*, **253**, 3736-3743.
- GOSPODAROWICZ D. et MESCHER A.L., (1980). Fibroblast growth factor and the control of vertebrate regeneration and repair. *Ann. New-York Acad. Sciences*, **339**, 151-172.
- GOSPODAROWICZ D. et CHENG J. (1986). Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J. of Cell. Physiol.*, **128**, 475-484.
- GOSS R.J., (1956a). Regenerative inhibition following limb amputation and immediate insertion into the body cavity. *Anat. Rec.* **126**, 15-28.
- GOSS R.J., (1956b). The regenerative responses of amputated limbs to delayed insertion into the body cavity. *Anat. Rec.*, **126**, 283-297.
- GRILLO H.C., C.M. LEPIERE, M.H. DRESDEN et J. GROSS, (1968). Collagenolytic activity in regenerating forelimbs of the adult newt (*Triturus viridescens*). *Dev. Biol.* **17**, 571-583.

- GULATI A.K., ZALEWSKI A.A. et REDDI A.H., (1983). An immuno fluorescent study of the distribution of fibronectin and laminin during limb regeneration in the adult newt. *Dev. Biol.* **96**, 355-365.
- GUTH L., (1974). "Trophic" functions. In "The peripheral nervous system", J.I. Hubbard, eds, Plenum New-York. 329-343.
- GUTMANN E., (1976). Neurotrophic relations *Annu. Rev. Physiol.*, **38**, 177-216.
- HAY E.D., (1966). Metabolic patterns in limb development and regeneration : In Organogenesis, Dehaan R.L. et Ursprung H., eds, Holt, Rinehart et Winston, New-York, 315-336.
- HINTERBERGER T.J. et CAMERON J. A. (1983). Muscle and cartilage differentiation in Axolotl limb regeneration blastema cultures. *J. Exp. Zool.*, **226**, 399-407.
- IDE H., (1974). Proliferation of Amphibian melanophores *in vitro* .*Dev. Biol.*, **41**, 380-384.
- JABAILY J.A. et SINGER M., (1977). Neurotrophic stimulation of DNA synthesis in the regenerating forelimb of the newt *Triturus*. *J. Exp. Zool.*, **199**, 251-256.
- JABAILY J.A. et SINGER M., (1978). Neurotrophic and hepatotrophic stimulation of proliferation of embryonic chick muscle cells *in vitro*. Assay and partial characterization of mitogenic activity in chick embryonic organs and tissue extracts. *Dev. Biol.*, **64**, 189-202.
- JABAILY J.A., BLUE P. et SINGER M., (1982). The culturing of dissociated newt forelimb regenerate cells. *J. Exp. Zool.*, **219**, 67-73.
- JEANNY J.C., FAYERN N., MOENNER M., CHEVALLIER B., BARRITAULT D. et COURTOIS Y., (1987). Specific fixation of bovine brain and retinal acidic and basic fibroblast growth factor to mouse embryonic eye basement membranes. *Exp. Cell. Res.* (in press).
- JENNINGS T., JONES R.D. et LIPTON A., (1979). A growth factor from spinal cord. *J. Cell. Physiol.*, **100**, 273-278.
- KAPLOWITZ P., D'ERCOLE J. et UNDERWOOD L., (1982). Stimulation of embryonic mouse limb bud mesenchymal cell growth by peptide growth factors. *J. Cell. Physiol.*, **112**, 353-359.
- KIMURA I., HASEGAWA T., MIURA T. et OZAWA E., (1981). Muscle trophic factor is identical transferrin. *Proc Japan. Acad.*, **57**, 201-205.

- KOSHER R.A., SAVAGE M.P. et CHAN S.C., (1979). *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. Morphol.*, **50**, 75-97.
- LASSALLE B., (1983a.) DNA synthesis and cellular proliferation in cultured newt blastemas .In : *Limb development and Regeneration*, Part. A, J.F. Fallon and A.I. Caplan, ed. Alan R. Liss, New-York, 547-555.
- LASSALLE B. (1983b). Synthèses d'ADN dans les blastèmes de régénération de *Pleurodeles waltlii* (Amphibien urodèle) en culture *in vitro* . Conditions de culture. *Biol. Cell*, **47**, 187-192.
- LASSALLE B., OUDKHIR M., VAN RAPENBUSCH S. et BOILLY B., (1985.) Rôle du système nerveux dans la prolifération cellulaire des constituants épidermique et mésenchymateux des blastèmes de régénération de membre d'un Triton Pleurodèle (*Pleurodeles waltlii* Michah) en culture. *Biol. Cell.*, **53**, 37-40.
- LASSALLE B., BAUDUIN B. et BOILLY B. (1987). Neurotrophic influence of regenerating newt blastemas on spinal cord neurite growth *in vitro*. *Anat. Micro. Morph. Exp.* (in press).
- LEBOWITZ P. et SINGER M., (1970). Neurotrophic control of protein synthesis in the regenerating limb of the newt, *Triturus*. *Nature*, **225**, 824-827.
- LECAMP M., (1948). Régénération chez le Triton *in vitro* et *in vivo*. *C.R. Acad. Sci.*, **226**, 695-696.
- LENFANT M., (1973.) Culture à court terme de cellules sanguines et analyse du caryotype chez les Amphibiens. *Ann. Embryol. Morph.*, **6**, 55-62.
- LEVIN M., TUIL D., UZAN G., DREYFUS J.C. et KAHN A., (1984). Expression of the transferrin gene during development of non-hepatic tissues : high level of transferrin m RNA in foetal muscle and adult brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 212-217.
- LIVERSAGE R.A., et M. GLOBUS, (1977). *In vitro* regeneration of innervated forelimb deplants of *Ambystoma larvae*. *Can. J. Zool.*, **55**, 1195-1199.
- LOBB R.R., HARPER J.W. et FETT J.W., (1986). Purification of heparin-binding growth factors. *Analytical Biochemistry*, **154**, 1-14.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.T., FARR A.L. et RANDALL R.J., (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.

- MACIAG T., HOOVER G.A. et WEINSTEIN R., (1982). High and low molecular weight forms of endothelial cell growth factor. *J. Biol. Chem.*, **257**, 5333-5336.
- MACIAG T., MEHLMAN T., FRIESEL R. et SCHREIBER A.B., (1984). Heparin binds endothelial cell growth factor ; the principal endothelial cell mitogen in bovine brain. *Science*, **225**, 932-934.
- MARCUM J.A. et ROSENBERG R.D., (1984). Anticoagulant by active heparin-like molecules from vascular tissues.. *Biochemistry*, **23**, 1730-1737.
- MARKELONIS G., KEMERER V. et HWAN OH T., (1980). Sciatin : purification and characterization of a myotrophic protein from chicken sciatic nerves. *J. Biol. Chem*, **255**, 8967-8970.
- MARKELONIS G., BRADSHAW R., HWAN OH T., JOHNSON J. et BATES O., (1982). Sciatin is a transferrin-like polypeptide. *J. of. Neurochemistry*, **39**, 315-320.
- MARKELONIS G., HWAN OH T., PARK L., CHA C., SOFIA C., KIM J. et AZARI P., (1985). Synthesis of the transferrin receptor by cultures of embryonic chicken spinal neurons. *J. Cell. Biol.*, **100**, 8-17.
- MARKWELL M.A.K., HAAS S.M., BIEDER L.L. et TOLBERT N.E., (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membranes and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.*, **87**, 206-210.
- MATHER J.P. et SATO G.H., (1979). The growth of mouse melanoma cells in hormone-supplemented serum-free medium. *Exp. Cell. Res.*, **120**, 191-200.
- MEEK J. et ADAMSON E.D., (1985). Transferrin in foetal and adult mouse tissues : synthesis, storage and secretion. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **86**, 205-218.
- MESCHER A.L., (1976). Effects on adult newt limb regeneration of partial and complete skin flaps over the amputation surface. *J. Exp. Zool.*, **195**, 117-127.
- MESCHER A.L. et GOSPODAROWICZ D., (1979). Mitogenic effect of a growth factor derived from myelin on denervated regenerates of newt forelimbs. *J. Exp. Zool.*, **207**, 497-503.
- MESCHER A.L. et LOH J.J., (1981). Newt forelimb regeneration blastema *in vitro* : cellular response to explantation and effects of various growth-promoting substances. *J. Exp. Zool.*, **216**, 235-245.

- MESCHER AL. et MUNAIM S., (1984). "Trophic" effect of transferrin on Amphibian limb regeneration blastemas. *J. Exp. Zool.*, **230**, 485-490.
- MOENNER M., CHEVALLIER B., BADET J. et BARRITAU D., (1986). Evidence and characterization of the receptor to eye-derived growth factor I, the retinal form of basic fibroblast growth factor, on bovine epithelial lens cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5024-5028.
- MONNICKENDAM M.A. et M. BALLS, (1973). Amphibian organ culture. *Experientia*, **29**, 1-17.
- MORGAN E.H., (1981). Transferrin biochemistry, physiology and clinical significance. *Mol. Aspects. Med.*, **4**, 1-123.
- MUNAIM S. et MESCHER A., (1986). Transferrin and the trophic effect of neural tissue on Amphibian limb regeneration blastemas. *Dev. Biol.*, **116**, 138-142.
- NISHIKAWA A. et YOSHIKAWA K., (1985). Isolation and characterization of mesenchymal cells from the tail of Bullfrog tadpoles. *Develop. Growth and Differ.*, **27**, 621-631.
- OH T., SOFIA C., KIM Y., CARROLL C., KIM H., MARKELONIS G. et REIER P., (1981). Sciatin : immunocytochemical localization of a myotrophic protein in chicken neural tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 1205-1212.
- OUDKHIR M., BOILLY B. et LASSALLE B., (1985.) Cell cycle changes after denervation of the newt limb regenerate studied *in vitro*. *Experientia* **42**, 189-190.
- OUDKHIR M., BOILLY B., LHEUREUX E. et LASSALLE B., (1985). Influence of denervation on the regeneration of Pleurodeles limbs. Cytophotometric study of nuclear DNA from blastemal cells. *Differentiation*, **29**, 116-120.
- PEREZ-INFANTE V. et MATHER J.P., (1982). The role of transferrin in the growth of testicular cell lines in serum-free medium. *Exp. Cell. Res.*, **142**, 325-332.
- PLOUET J., COURTY J., OLIVIE M., COURTOIS Y. et BARRITAU D., (1984). A highly reliable and sensitive assay for the purification of cellular growth factors. *Cel. Mol. Biol.*, **30**, 105-110.
- POPIELA H. et ELLIS S., (1981) Neurotrophic factor : characterization and partial purification. *Dev. Biol.*, **83**, 266-277.
- POPIELA H., TAYLOR D., ELLIS S., BEACH R. et FESTOFF B., (1984). Regulation of mitotic activity and the cell cycle in primary chick muscle cells by neurotransferrin. *J. Cell. Physiol.*, **119**, 234-240.

- PUDNEY M., VARMA M.G.R. et LEAKE C.J., (1973). Establishment of a cell line (XTC-2) from the South African clawed toad ; *Xenopus laevis*. *Experientia*, **29**, 466-467.
- RAFFERTY K.A. Jr., (1969). Mass culture of amphibian cells : methods and observations concerning stability of cell type. In : *Biology of amphibian tumors*, M. Mizell ed. Springer Verlag, Berlin, 52-81.
- RAFFERTY K.A. Jr., (1976). The physiology of amphibian cells in culture. In : *Physiology of Amphibia*. Vol. 3 .B. Lofts ed. Academic press, London, 111-162.
- RATHBONE M.P., CARLONE R.L. et GANAGARAJAH M., (1979). Neurotrophic like effects of bovine pituitary fibroblast growth factor on regenerating limb blastema and skeletal muscles of newts *in vitro*. *Amer. Zool.*, **19**, 925.
- RATNER N., BUNGE R. et GLASER L., (1985). A neuronal cell surface heparan sulfate proteoglycan is required for dorsal root ganglion neuron stimulation of Schwann cell proliferation. *J. Cell. Biol.*, **101**, 744-754.
- RAZA A., PREISLER H.D., MAYERS G.L. et BANKERT R., (1984.) Rapid enumeration of S-phase cells by means of monoclonal antibodies. *New Eng. J. Med.*, **310**, 991.
- RAZA A., UCAR K., BHAYAMA R., KEMPSKI M. et PREISLER H.D., (1985). Utility and sensitivity of anti Brd U antibodies in assening S-phase cells compared to autoradiography. *Cell Biochem. and Function*, **3**, 149-153.
- REILLY C.F., FRITZE L. et ROSENBERG R.D., (1986). Heparin inhibition of smooth muscle cell proliferation : a cellular site of action. *J. Cell. Physiol.*, **129**, 11-19.
- REPESH L.A. et FURCHT L.T., (1982). Distribution of fibronectin in regenerating limbs of the adult newt, *Notophthalmus viridescens*. *Differentiation*, **22**, 125-131.
- ROSAURA BELLO U. et URBANEJA DE MONTBRUN M., (1972). Cultivos *in vitro* de sangre de Amphibia Anura (*Bufo marinus*). *Acta Cient. Venezolana*, **23**, 137-142.
- ROSENBAUM J., TOBELEM G., MOLHO P., BARZU T. et CAEN J.P., (1986). Modulation of endothelial cells growth induced by heparin. *Cell. Biol. Int. Rep.*, **10**, 437-446.

- SCHRAG J.A. et CAMERON J.A., (1983). Regeneration of adult newt skeletal muscle tissue *in vitro*. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **77**, 255-271.
- SCHREIBER A.B., KENNEY J., KOWALSKI J., THOMAS A., GIMENEZ-GALLEGO G., RIOS-CANDELORE M., DI SALVO J., BARRITAU D., COURTY J., COURTOIS Y., MOENNER M., LORET C., BURGESS W.H., MEHLMAN T., FRIESEL R., JOHNSON W. et MACIAG T., (1985a). A unique family of endothelial cell polypeptide mitogens : endothelial cell growth factor, brain-derived acidic fibroblast growth factor and eye-derived growth factor II. *J. Cell. Biol.*, **101**, 1623-1626.
- SCHREIBER A.B., KENNEY J., KOWALSKI J., FRIESEL R., MEHLMAN T. et MACIAG T., (1985b). The interaction of endothelial cell growth factor with heparin : characterization by receptor and antibody recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6138-6142.
- SHING Y., FOLKMAN J., SULLIVAN R., BATTERFIELD C., MURRAY J. et KLAGSBRUN M., (1984). Heparin affinity : purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science*, **222**, 1296-1299.
- SICARD R.E. (1985). Leukocytic and immunological influence on regeneration of Amphibian forelimbs ; in Sicard, *Regulation of Vertebrate limb regeneration*. Oxford Univ. Press.
- SINGER M. et SALPETER M., (1961). Regeneration in Vertebrates : the role of the wound epithelium. *In growth in living systems*, MX Zarrow, eds, Basic books, New-York, 277-311.
- SINGER M., (1973). Limb regeneration in the vertebrate. *Add. Wels. Mod in Biology*, **6**, 27.
- SINGER M., (1974.) Neurotrophic control of limb regeneration in the newt. *Ann. NY Acad. Sci.* **228**, 308-322.
- SINGER M., MAIER C. et Mc NUTT W., (1976). Neurotrophic activity of brain extracts in forelimb regeneration of the urodele, *Triturus*. *J. Exp. Zool.*, **190**, 111-116.
- SINGER M., (1978). On the nature of the neurotrophic phenomenon in urodele limb regeneration. *Am. Zool.*, **18**, 829-841.
- SOLURSH M., SINGLEY C.T. et REITER R.S., (1981). The influence of epithelia on cartilage and loose connective tissue formation by limb mesenchyme cultures. *Dev. Biol.*, **86**, 471-482.
- SOOY L.E., et L. MEZGER-FREED, (1970). A serum macromolecule-supplemented medium for frog cell lines. *Exp. Cell Res.*, **60**, 482-485.

- STAMATOS C., SQUICCIARINI J. et FINE R., (1983). Chick embryo spinal cord neurons synthesize a transferrin-like myotrophic protein. *FEBS Letters*, **153**, 387-390.
- STOCUM D.L., (1968). The urodele limb regeneration blastema : A self-organizing system. *Dev. Biol.*, **18**, 441-456.
- STOCUM D.L. et DEARLOVE G., (1972). Epidermal-mesodermal interaction during morphogenesis of the limb regeneration blastema in larval salamanders. *J. Exp. Zool.*, **181**, 49-62.
- STOCUM D.L., (1985). Role of the skin in urodele limb regeneration ; in Sicard, *Regulation of Vertebrate limb regeneration*, Oxford Univ. Press, 32-53.
- TASSAVA R.A. et GARLING D.J., (1979). Regenerative responses in larval axolotl limbs with skin grafts over the amputation surface. *J. Exp. Zool.*, **208**, 97-110.
- TASSAVA R.A. et OLSEN C., (1985). Neurotrophic influences on cellular proliferation in urodele limb regeneration : *in vivo* experiments ; in Sicard, *Regulation of Vertebrate limb regeneration*, Oxford Univ. Press, 81-92.
- TAUBE E., (1921). Regeneration mit Reterligung ortsfremder Haut bei Tritonen. *Wilh. Roux'Archiv.*, **49**, 269-315.
- THORNTON C.S., (1958). The inhibition of limb regeneration in urodele larvae by localized irradiation with ultra-violet light. *J. Exp. Zool.*, **137**, 153-180.
- THORNTON C.S., (1968). Amphibian limb regeneration. In : *Advances in Morphogenesis*, M. Abercrombie, J. Brachet and T. King ed. Academic Press, New-York, **7**, 205-250.
- THORNTON C.S., MUELLER S.N. et LEVINE E.M., (1983). Human endothelial cells : use of heparin in cloning and long-term serial propagation. *Science*, **222**, 623-625.
- TODARO G., DE LARCO J.E., MARQUARDT H., BRYANT M.L., SHERWIN S.A. et SLISKI A.H., (1979). Polypeptide growth factors produced by tumor cells and virus transformed cells : a possible growth advantage for the producer cell. *Bock A and B*, New-York. Cold spring Harbor, **14**, 113-127.
- TODD T.J., (1823). On the process of reproduction of the members of the aquatic salamander. *Quart. J. Sci., Lit. Arts*, **16**, 84-96.

- TOMLINSON B.L., GLOBUS M. et VETHAMANY-GLOBUS S., (1981). Promotion of mitosis in cultured newt limb regenerates by a diffusible nerve factor. *In vitro*, **17**, 167-172.
- TOMLINSON B.L., GLOBUS M. et VETHAMANY-GLOBUS S. (1982). Studies of mitosis in excised limb regenerates of the newt, *Notophthalmus viridescens*. *J. Exp. Zool.*, **223**, 115-122.
- TOMLINSON B.L., GLOBUS M. et VETHAMANY-GLOBUS S., (1984). The blastema cell cycle *in vitro* and attempted restoration of blastema cell cycling in denervated blastemata of the adult newt, *Notophthalmus viridescens*. *J. Exp. Zool.*, **232**, 249-258.
- ULRICH S., LAGENTE O., LENFANT M., COURTOIS Y., (1986). Effect of heparin on the stimulation of non vascular cells by human acid and basic FGF. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **137**, 1205-1213.
- VETHAMANY-GLOBUS S., GLOBUS M. et TOMLINSON B., (1978). Neural and hormonal stimulation of DNA and protein synthesis in cultured regeneration blastemata in the newt *Notophthalmus viridescens*. *Develop. Biol.* **65**, 183-192.
- VETHAMANY-GLOBUS S., GLOBUS M., DARCH A., MILTON G., TOMLINSON B.L. et ROTH D., (1984). *In vitro* effects of macromolecular synthetic events in newt limb regeneration blastemata. *J. Exp. Zool.*, **231**, 63-74.
- WALLACE H., (1982). Vertebrate limb regenerate. John Wiley & Sons, Chichester. 276 p.
- WOLF K., (1979). Cold-blooded vertebrate cell and tissue culture . In : *Methods in enzymology*, vol. 58, W.B. Jacoby and I.H. Paston ed. Academic Press, New-York, 466-477.
- WOLF K. et QUIMBY M.C., (1964). Amphibian cell culture : permanent cell line from the bullfrog (*Rana catesbiana*). *Science*, **144**, 1578-1580.
- WRIGHT T.C., JOHNSTONE T.V., CASTELLOT J.J. et KARNOVSKY M.J., (1985). Inhibition of rat cervical epithelial cell growth by heparin and its reversal by EGF. *J. Cell. Physiol.*, **125**, 499-506.
- YOSHIZATO K. et NISHIKAWA A., (1985). Epidermal cells of the anuran tadpole tail : its isolation and characterization *in vitro*. *Zool. Science.*, **2**, 201-211.



Les Amphibiens représentent les seuls Vertébrés capables de régénérer leurs membres après amputation. L'intérêt de ce phénomène a conduit de nombreux chercheurs à étudier les facteurs de contrôle de cette remarquable réparation tissulaire.

Compte tenu des limites imposées par les techniques utilisées jusqu'à présent (expérimentation *in vivo*, culture de blastème de régénération), nous avons mis au point une culture primaire de cellules mésenchymateuses de blastème de régénération de membre d'*Axolotl*.

Les résultats obtenus montrent que ce système représente un excellent modèle d'étude du contrôle de la prolifération cellulaire, car il n'est pas déconnecté de la réalité biologique du problème étudié (les cellules en culture sont capables de se différencier et de proliférer comme *in vivo*) et permet l'étude d'un seul type cellulaire en dehors de toute autre influence tissulaire ; en outre, ce système apparaît très fiable et remarquablement sensible.

Grâce à ce système, nous avons confirmé le rôle important du système nerveux dans la régénération du membre et vérifié l'efficacité de la transferrine et d'un facteur de croissance d'origine nerveuse (FGF) facteur que nous avons utilisé pour la première fois à l'état purifié et sous ses deux formes, acide et basique en présence ou non d'héparine. Le FGF agit à des concentrations nanomolaires ; la forme acide est moins active que la forme basique mais peut être potentialisée par l'héparine. Nous avons montré, par ailleurs, que la production de facteurs(s) mitogènes(s) par le système nerveux est modulée au cours de la régénération.

D'autre part, l'utilisation de la culture cellulaire a permis pour la première fois de mettre en évidence l'existence d'un facteur mitogène soluble produit par la cape épidermique, facteur qui apparaît beaucoup plus actif encore que le facteur nerveux, et de poser l'hypothèse de la production par les cellules mésenchymateuses elles-mêmes d'un facteur mitogène agissant selon un mode autocrine.

