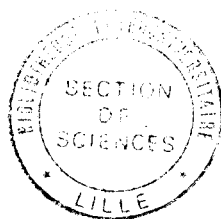


50376
1988
103

N° d'ordre 255



50376
1988
103

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES ARTOIS

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

Présentée par :
Stéphane VANRAPENBUSCH

**INFLUENCE DE LA DENERVATION SUR LA FORMATION DU COLLAGENE
AU SEIN DE REGENERATS DE MEMBRE DU TRITON, PLEURODELES WALTII
ETUDES MORPHOLOGIQUE ET CYTOPHOTOMETRIQUE**

Soutenu le 5 juillet 1988 devant le jury :

Président : M. A. CAPURON
Rapporteurs : M. J. DUFER
M. A. LEMOIGNE
Directeur deThèse : M. B. LASSALLE

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

M. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

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

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

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN

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

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

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

M. A. DUBRULLE.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. FARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNELLE Jean Pierre	Chimie-Physique
M. BOSQ Denis	Probabilités
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie-Physique
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DHAINAUT André	Biologie animale
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GRANELLE Jean jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LEROY Jean Marie	Spectrochimie
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MIGEON Michel	E.U.D.I.L.
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PETIT Francis	Chimie organique
M. POUZET Pierre	Modélisation - Calcul scientifique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHAMPS Joel	Spectroscopie moléculaire
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

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

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

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

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Morphogenèse animale de LILLE (CNRS UA. 685) sous la responsabilité de B. LASSALLE. Il fait suite à l'obtention d'un D.E.A. sous la responsabilité de M. le Professeur B. BOILLY qui m'a accueilli dans son laboratoire. Je l'en remercie.

Je tiens tout particulièrement à remercier M. le Docteur B. LASSALLE pour la constante attention dont il a fait preuve à mon égard tout au long de ces travaux. Qu'il trouve dans ce mémoire le témoignage de ma profonde sympathie.

Je remercie M. le Professeur A. CAPURON d'avoir bien voulu examiner ce mémoire et d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie vivement M. le Professeur J. DUFER de l'Université de REIMS et M. le Professeur A. LEMOIGNE de l'Université de PARIS VAL-DE-MARNE d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Mes remerciements vont également à MMmes AUGER, LYOEN, FERREIRA, BONNET et à M. CHUIN pour l'aide technique qu'ils m'ont apportée dans la réalisation de ce travail, ainsi qu'à Mme LALOUX pour la frappe de ce manuscrit.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
MATERIEL ET METHODES.....	5
MATERIEL.....	6
TECHNIQUES	6
CHAPITRE I (Etude ultrastructurale).....	7
INTRODUCTION.....	8
TECHNIQUES (Microscopie Electronique).....	14
RESULTATS	14
DISCUSSION	17
CHAPITRE II (Dosage du collagène).....	21
INTRODUCTION.....	22
TECHNIQUES	22
Techniques histologiques	22
Techniques biochimiques	23
Dosage cytophotométrique du collagène	23
Analyse statistiques	24
RESULTATS	24
Gamme étalon	24
Spécificité du rouge Sirius	25
Effet de la dénervation.....	25
Dosage biochimique	25
Analyse d'images	27
DISCUSSION	28
CHAPITRE III (Les différents types de collagène)	31
INTRODUCTION.....	32
TECHNIQUES	32
Immunocytochimie.....	32
Techniques de culture.....	32
RESULTATS	33
1 - Détection immunocytochimique des collagènes	33
* Mise en évidence du collagène de type I	33
* Mise en évidence du collagène de type III	34
* Mise en évidence du collagène de type IV	34
2 - Culture in vitro d'explants	34
DISCUSSION	34

CHAPITRE IV (Cellules impliquées dans la synthèse de collagène).....	38
INTRODUCTION.....	39
TECHNIQUES	39
A - Analyse d'images.....	39
B - Méthode des écrasements tissulaires (squashes).....	45
C - Techniques autoradiographiques.....	45
RESULTATS	46
Incorporation de 3H-proline	46
Observations histologiques	46
Analyse d'images	47
- Cinétique cellulaire	47
- Analyse des cellules hors cycle.....	49
DISCUSSION	55
CONCLUSION GENERALE	58
RESUME.....	60
BIBLIOGRAPHIE.....	63

INTRODUCTION

Régénérer un membre amputé de façon traumatique ou expérimentale n'est pas l'apanage de tous les Vertébrés. Seule la classe des Amphibiens en est capable. Néanmoins, tous les Amphibiens ne conservent pas ce pouvoir tout le long de leur vie. Les Anoures ne régènèrent plus la partie manquante à partir de la métamorphose. Les Urodèles, par contre, remplacent cette partie manquante aussi bien pendant le stade larvaire que pendant la vie adulte. La régénération d'un membre amputé reste donc un fait exceptionnel chez les Vertébrés.

Dans les heures qui suivent l'amputation d'un membre d'Amphibiens Urodèles, il se forme à la surface du moignon un épiderme cicatriciel, d'abord constitué d'une seule couche de cellules, et qui par la suite devient pluristratifié par la migration des cellules épidermiques de la souche. Parallèlement à l'établissement et à l'épaississement de ce film épidermique, les tissus de la souche vont subir une réorganisation importante. La matrice, érodée par digestion enzymatique, va progressivement libérer des cellules qui vont s'accumuler sous l'épiderme cicatriciel. Ces cellules, ayant probablement comme origine les différents tissus constituant la souche, se dédifférencient et se multiplient activement par mitose. Une dizaine de jours après l'amputation, l'accumulation de cellules mésodermiques aboutit à la formation d'un petit massif cellulaire appelé blastème de régénération. Par suite de l'intense activité prolifératrice des cellules, ce régénérat prend très rapidement l'allure d'un cône. Il s'aplatit ensuite dorso-ventralement et prend la forme d'une palette. A ce stade, le régénérat présente des signes de différenciation qui s'expriment sous la forme de condensations cellulaires mésodermiques, prémices de futures parties osseuses. Ces condensations, qui conduisent à la formation de nodules cartilagineux, apparaissent d'abord dans la région proximale, puis s'étendent de plus en plus distalement. Progressivement, l'ébauche du membre régénéré apparaît. Enfin, la nécrose d'un certain nombre de zones aboutit à l'individualisation des doigts.

Ainsi, en moins de deux mois, des processus de dédifférenciation, de prolifération et de différenciation aboutissent à la mise en place d'une véritable réplique fonctionnelle du membre amputé (revue dans WALLACE, 1981).

Ces processus régénératifs sont sous l'étroite dépendance du tissu nerveux. En effet, si la dénervation est réalisée sur de jeunes régénérats, ces derniers s'atrophient et se résorbent lentement (SINGER et CRAVEN, 1948). De plus, lorsqu'un moignon de membre est dénervé au moment où le blastème de régénération atteint le stade cône, et qu'immédiatement on injecte à l'animal un précurseur radioactif des protéines, on

constate qu'après une augmentation transitoire de la synthèse protéique, se situant quatre heures après la résection des nerfs, celle-ci chute d'environ 40% vingt-quatre heures après le début de l'expérience, par rapport à la valeur enregistrée dans le blastème controlatéral témoin innervé (LEBOWITZ et SINGER, 1970 ; SINGER et CASTON, 1972 ; DRESDEN, 1969). Cette diminution de la synthèse protéique dans les régénérats dénervés concerne, semble-t-il, la totalité des protéines, aucune d'entre-elles n'ayant été identifiée comme spécifiquement affectée par la dénervation (SINGER, 1978).

Cependant, en 1979, MAILMAN et DRESDEN ont étudié l'effet de la résection des nerfs sur la synthèse de deux protéines spécifiques du métabolisme protéique de la matrice extracellulaire au cours de la régénération. L'étude portait sur l'activité de la collagénase, enzyme particulièrement active lors des phases de dédifférenciation prenant place au cours de la régénération d'un membre amputé et sur la synthèse du collagène, protéine marqueur de la différenciation dans le régénérat.

Si l'activité collagénasique ne semble pas affectée par la dénervation tout le long de la régénération, il n'en est pas de même pour la synthèse du collagène. Ces auteurs ont en effet montré qu'à la suite d'une dénervation, l'incorporation de proline tritiée est beaucoup plus importante dans les protéines collagéniques que dans les protéines non collagéniques.

Il apparaissait donc que la dénervation pouvait affecter spécifiquement le métabolisme de certaines protéines. Les résultats de MAILMAN et DRESDEN ont été obtenus sur des régénérats ayant atteint le stade palette, stade qui, rappelons-le, est qualifié d'indépendant du système nerveux. Cette indépendance est toute relative puisque, même à ce stade, la prolifération cellulaire est fortement diminuée mais la masse cellulaire est alors suffisante pour qu'une différenciation se produise et conduise à l'élaboration d'un membre miniature.

Parallèlement à ces résultats biochimiques, d'autres auteurs ont étudié les modifications cytologiques consécutives à la dénervation. L'étude cinétique microscopique de ces régénérats démontre un appauvrissement du nombre de cellules au sein du blastème et l'apparition progressive d'une matrice conjonctive extracellulaire (BRYANT et coll, 1971).

BRYANT et coll. ont ainsi examiné en microscopie électronique la destinée des cellules mésenchymateuses d'un blastème dénervé. Selon ces auteurs, la dénervation de jeunes régénérats se traduit par une réorganisation au sein des différents types cellulaires composant le massif blastémal. Le blastème de régénération est essentiellement constitué

de quatre types cellulaires, respectivement constitués de cellules dites "communes", "pâles", "vacuolaires" et "phagocytaires". Chez le témoin, la plus grande majorité des cellules sont des cellules communes. Chez les dénervés, corrélativement à une diminution significative du nombre de ces cellules communes, on note la présence en nombre non négligeable des cellules pâles et des cellules vacuolaires, extrêmement rares dans les blastèmes témoins. De plus la matrice extracellulaire y prend une importance beaucoup plus grande. Ces résultats ont été obtenus sur des régénérats ayant atteint le stade cône. La destinée et le rôle de ces différents types cellulaires, notamment dans l'élaboration de la matrice extracellulaire, restent très peu connus.

La modulation de l'activité prolifératrice des cellules blastémales par le système nerveux constitue un modèle favorable à l'expérimentation. La dénervation devrait permettre de mettre en évidence la filiation éventuelle existante entre les diverses catégories cellulaires et les effets sur la synthèse de la matrice. Nous avons donc repris l'étude des effets du système nerveux sur le blastème de régénération d'une part en analysant de manière qualitative et quantitative la formation du collagène en présence ou en l'absence de système nerveux, et d'autre part, en précisant l'évolution des cellules blastémales dans les mêmes conditions expérimentales, après caractérisation morphologique et cytophotométrique.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

Le travail a été effectué sur une espèce d'Amphibiens Urodèles : *Pleurodeles waltii* Michah. provenant d'un élevage réalisé au laboratoire.

Les animaux sont maintenus dans l'eau de robinet à la température de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. L'alimentation est constituée soit de larves de chironomes, soit de foie de boeuf haché.

Des animaux adultes d'une taille comprise entre 6 et 8 cm, queue non comprise ont été utilisés dans la majorité de nos expériences. Dans quelques cas, de jeunes animaux ont été utilisés (5 cm, queue non comprise)

TECHNIQUES

* Obtention des explants :

Les blastèmes de régénération sont obtenus par section des membres antérieurs au niveau du stylopode à proximité du coude.

Les animaux sont au préalable anesthésiés au MS222 (Tricaine méthane Sulfonate, Sandoz) à 1%.

* Pratique de la dénervation :

Celle-ci est effectuée au moment où le régénérat a atteint le stade cône, environ 20 jours après l'amputation. Elle consiste à sectionner les nerfs spinaux 3, 4 et 5 au niveau du plexus brachial du membre droit, le membre gauche dont l'innervation est conservée constitue alors le témoin. La section est large et permet d'éviter l'éventuelle réinnervation du blastème par les fibres nerveuses régénérées dans les jours qui suivent l'opération.

CHAPITRE I
Etude ultrastructurale

INTRODUCTION

Le collagène est certainement la protéine structurale la plus répandue chez les eucaryotes. Ce rôle structural lui a été attribué parce qu'on la rencontre aussi bien dans la mésoglyée des coelentérés, que dans la cuticule de l'*Ascaris* ou encore dans la peau, les os, les tendons et même dans la cornée des Vertébrés où son agencement est celui d'une structure quasi-cristalline. Cette protéine a fait l'objet de très nombreuses études au cours de la dernière décennie. Il s'est en effet avéré qu'il existe non pas un seul type de collagène, mais toute une série de molécules de collagène génétiquement distincts. Une douzaine de molécules différentes sont actuellement recensées et numérotées de I à XII. Ces molécules différentes à plus d'un titre possèdent néanmoins des propriétés chimiques et physiques communes. Parallèlement à leur découverte, il s'est avéré que les constituants de la famille des collagènes avaient des fonctions biologiques autres que structurales. Certes ces molécules constituent des éléments structuraux importants des tissus mais interagissent également avec d'autres glycoprotéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, la laminine ou encore la chondronectine ainsi qu'avec des récepteurs membranaires des cellules avoisinantes. Ces interactions étroites influencent la survie cellulaire, la migration cellulaire, la différenciation et la régénération. Le tableau 1 résume la localisation des principaux collagènes.

Structure de la molécule de collagène

En microscopie photonique, la matrice extra-cellulaire apparaît sous la forme d'un réseau de filaments enchevêtrés et disposés entre les cellules. Ces filaments résultent de l'assemblage de filaments beaucoup plus fins : les fibrilles. Chaque fibrille de collagène est constituée d'un grand nombre d'unités élémentaires : les molécules de collagène. L'isolement de la molécule de collagène est dû à GROSS et coll., 1954. Ces auteurs ont montré qu'en faisant varier les conditions d'extraction de tissus conjonctifs, la molécule de collagène apparaît au microscope électronique sous différentes configurations. Dans les tubes à essais, les précipités des molécules de collagène sont constitués de molécules natives et de molécules baptisées FLS et SLS, ces dernières correspondant à des réarrangements particuliers des molécules de collagène.

La molécule de collagène est une protéine de 300 nm de long et d'une épaisseur de 1,4 nm. Elle est constituée de trois chaînes polypeptidiques dénommées chaîne α (PIEZ et

LIKINS, 1960). Chaque chaîne α résulte de l'agencement linéaire d'acides aminés. Le nombre d'acides aminés avoisine 1050 pour chaque chaîne α .

Quelque soit le type de collagène auquel on s'adresse, la molécule de collagène est constituée de chaînes α polypeptidiques. C'est la nature des chaînes α composant la molécule de collagène qui diffère d'un type de collagène à un autre. Sept chaînes α différentes ont été recensées. La nature et la séquence des acides aminés varie d'une chaîne à l'autre. Les chaînes α des collagènes de type I, II et III ont été largement étudiées du point de vue séquence polypeptidique. Certains acides aminés sont retrouvés en très grand nombre au sein de ces chaînes α . Le glycolle est l'acide aminé le plus répandu dans les chaînes α . Ces chaînes α sont constituées d'une séquence primaire répétitive X-Y-Gly dans laquelle la troisième position est toujours occupée par cet acide aminé. Les autres acides aminés les plus fréquents sont la proline et l'hydroxyproline. Ces 3 acides aminés sont primordiaux pour l'agencement des 3 chaînes α les unes par rapport aux autres. En effet, chaque molécule de collagène est constituée de 3 chaînes α qui s'agencent en une triple hélice. Cette disposition en triple hélice procure à la molécule de collagène une certaine rigidité ainsi qu'une certaine résistance vis à vis des enzymes protéolytiques.

La triple hélice représente 95% de la longueur de la molécule de collagène. De part et d'autre de cette région, on trouve deux régions NH_2 et COOH terminales non hélicoïdales qualifiées de télépeptides et représentant les 5% restant de la longueur de la molécule. Ces extensions peptidiques terminales jouent un rôle très important puisque c'est à leur niveau que se mettent en place des liaisons intermoléculaires entre molécules de collagène au sein des fibrilles de collagène. Contrairement à la région centrale en triple hélice de la molécule de collagène particulièrement résistante aux protéases comme la pepsine, les télépeptides n'ayant pas de configuration hélicoïdale sont facilement lysés par ces mêmes enzymes.

La biosynthèse du collagène (fig.1)

Les chaînes polypeptidiques de collagène ou chaînes α sont synthétisées au niveau des ribosomes membranaires sous la forme de précurseurs de plus grande taille appelées les pro-chaînes α . Ces précurseurs possèdent comme toutes les protéines et ceci à l'issue de leur synthèse, une séquence peptidique signal (OLSEN, 1981) qui leur permet de traverser la membrane des saccules du réticulum endoplasmique et de s'y accumuler. Ce peptide signal est ensuite excisé dans les cavités de ce même réticulum. D'autre part, les

hétérogénéité génétique			
polypeptides ou chaînes de collagène	molécules de collagène en triple hélice	nom	distribution dans les principaux tissus
$\alpha 1 (I)$ $\alpha 2 (I)$	$[\alpha 1 (I)]_2 \alpha 2 (I)$	type I	peau, os, tendons, ligaments, cornée organes internes tissus embryonnaires et inflammation
	$[\alpha 1 (I)]_3$	type I trimère	
$\alpha 1 (II)$	$[\alpha 1 (II)]_3$	type II	cartilage, corps vitreux
$\alpha 1 (III)$	$[\alpha 1 (III)]_3$	type III	vaisseaux sanguins, peau, organes internes
$\alpha 1 (IV)$ $\alpha 2 (IV)^*$	$[\alpha 1 (IV)] ?$	type IV	membranes basales
$\alpha 1 (V)$ $\alpha 2 (V)$ $\alpha 3 (V)^*$	$[\alpha 1 (V)]_2 \alpha 2 (V)$	type V	membranes basales organes internes

Tableau 1 - Principaux types de collagène (d'après TRELSTAD, 1981)

pro-chaînes α possèdent des séquences d'acides aminés supplémentaires appelées rallonges peptidiques à leurs deux extrémités amino et carboxy terminales. Ce sont probablement ces rallonges peptidiques qui guident l'agencement de 3 pro-chaînes α entre elles pour former la triple hélice caractéristique de la molécule de collagène. En effet, l'agencement spontané de pro-chaînes α en triple hélice est possible en tube à essais dans des conditions où celui des chaînes α est impossible. Le compartiment précis où aurait lieu cet assemblage reste inconnu. Il semblerait que cette étape primordiale se déroulerait dans les cavités intracytoplasmiques de la cellule. Toujours au niveau du réticulum endoplasmique, certains des résidus proline et lysine des pro-chaînes α sont hydroxylés, ceci avant que les pro-chaînes α s'assemblent entre elles. L'assemblage des pro-chaînes α par trois donne naissance à un type de molécules précurseurs des molécules de collagène : les molécules de procollagène. Les résidus OH proline et OH lysine sont caractéristiques de la molécule de collagène. Cette hydroxylation est une étape primordiale à plus d'un titre. En effet, dans des conditions où l'hydroxylation de la

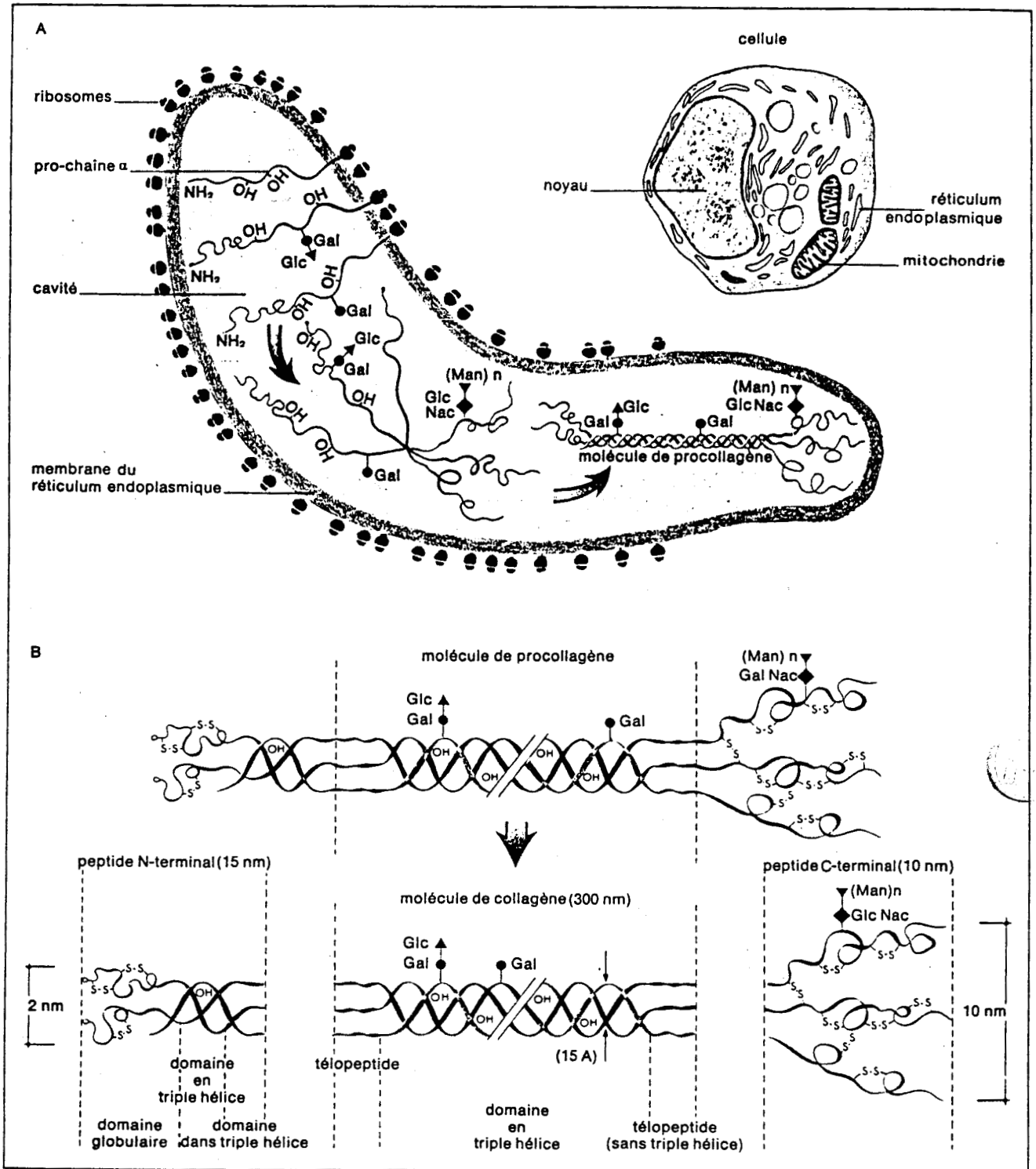


Figure 1— Comme toutes les protéines, le collagène est fabriqué à l'intérieur des cellules par traduction du message génétique sur les ribosomes.

(A). Ce schéma montre une cellule avec ses différentes organites : le collagène étant destiné à l'exportation est sécrété dans des cavités de réticulum endoplasmique qui vont donner des vacuoles. Celles-ci se sont ensuite déversées à la surface de la cellule. A l'intérieur d'une cavité du réticulum endoplasmique, chacune des chaînes polypeptidiques de la triple hélice est synthétisée sur un ribosome, puis s'associe pour former la molécule définitive. En réalité, la chaîne polypeptidique qui sort du ribosome est une pro-chaîne α , plus longue que la chaîne définitive, et qui sera coupée. L'assemblage dans la cavité des pro-chaînes α donne une molécule de procollagène.

(B). Ces schémas détaillent la structure des molécules de procollagène et de collagène, organisée en différentes portions. On remarquera que les peptides terminaux contiennent des petits domaines organisés en triple hélice. Inversement, la molécule de collagène a ses parties terminales libres : ce sont les télopeptides. Glc et Gal représentent les sucres glucose et galactose, qui sont liés aux hydroxylisines de la triple hélice. Man et GlcNac représentent les sucres mannose et N-acétylglucosamine, qui ne figurent que sur les peptides terminaux.

proline ne peut se réaliser (manque d'oxygène, carence en fer ou en acide ascorbique), la formation de la triple hélice de procollagène est inhibée. Par ailleurs, l'hydroxylation des résidus de lysine est indispensable à l'étape suivante qui consiste en une glycosylation des molécules de procollagène. Les résidus hydroxylysyl peuvent être glycosylés pour former des résidus galactosyl hydroxylysine ou glucosyl-galactosyl-hydroxylysine ; le galactose est d'abord fixé enzymatiquement par une liaison O-glycosidique ; par la suite, une molécule de glucose est ajoutée à l'édifice moléculaire (GRANT et al, 1972). Deux enzymes catalysent cette réaction : la galactosyl transférase et la glucosyl transférase ; Tout comme les réactions d'hydroxylation, les réactions de glycosylation ont lieu avant la formation de la triple hélice. La glycosylation de résidus lysyl sous forme de triple hélice est impossible à réaliser (RISTELLI et al, 1976).

Ce type de modifications post-traductionnelles varie d'un type de collagène à un autre. Les chaînes polysaccharidiques ajoutées sont courtes et ne contiennent pas d'acide sialique. Le taux de glycosylation varie également avec le type de collagène. Toutes ces modifications étant achevées, la cellule va sécréter les molécules de procollagène dans l'espace extracellulaire. Au cours de ce processus de sécrétion, les rallonges peptidiques des molécules de procollagène de type I, II et III sont éliminées par des peptidases procollagéniques. Le clivage de ces peptides transforme les molécules de procollagène en molécule de collagène caractéristique dont la majeure partie est constituée d'un domaine en triple hélice limité de part et d'autre par 2 régions non hélicoïdales : les télépeptides. Dans la littérature, ce type de molécules obtenues après clivage des rallonges peptidique est encore appelé tropocollagène.

Immédiatement après cette étape cruciale, les molécules de collagène s'assemblent dans l'espace extracellulaire, à proximité de la surface cellulaire sous la forme de fibrilles de collagène. Ainsi, l'existence des rallonges peptidiques au sein des cavités cellulaires inhibe l'assemblage en fibrilles de collagène de grande taille, ce qui serait néfaste à la cellule. Le procollagène IV ne subit pas de clivage des rallonges peptidiques après sécrétion. Le collagène IV considéré comme spécifique des membranes basales ne forme pas de fibrilles comme c'est le cas pour les collagènes I, II et III.

Les fibrilles de collagène isolées, fixées et colorées, observées en microscopie électronique possèdent des striations transversales tous les 67 nm. Ceci est dû à l'arrangement des molécules de collagène au sein des fibrilles. En effet, une molécule de collagène ou de tropocollagène est constituée d'unités répétitives de 67 nm de longueur (D) qui est composée d'une région claire et d'une région sombre. Une molécule de

collagène de 300 nm de longueur correspond donc à 4,4 D. Toutes les molécules de collagène sont espacées d'une longueur D. Cet assemblage sert vraisemblablement à maximiser la résistance de l'édifice terminal.

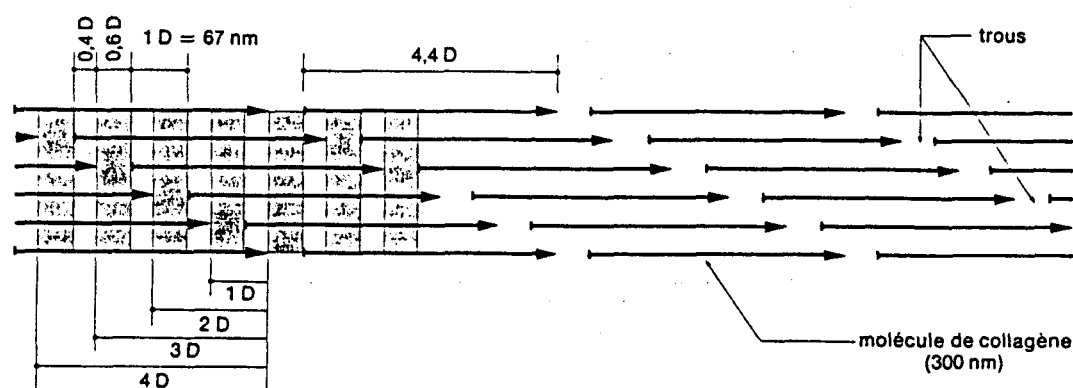


Figure 2 - Arrangement en treillis des molécules de collagène.

La disposition est celle de la structure périodique qui donne la fibrille striée. Au sein de la fibrille, l'extrémité de chaque molécule de collagène est décalée d'une valeur de 0,1,2,3 ou 4 D de l'extrémité de ses voisines. Les décalages produisent des trous dans la fibre (ce qui, semble-t-il, donne dans le tissu osseux, un point d'amorçage pour la minéralisation de ce tissu). En microscopie électronique, les bandes sombres correspondent à la pénétration du colorant dans les trous. Chaque molécule de collagène mesure 300 nm de long et 1,4 nm d'épaisseur.

Les molécules de collagène sont adjacentes sur près du 1/4 de leur longueur et il existe ainsi un espace vide entre l'extrémité NH_2 terminale d'une molécule et l'extrémité COOH terminale d'une autre molécule. Ces espaces sont des zones où s'accumule le tétr oxyde d'osmium, fixateur utilisé en microscopie électronique. Les régions au niveau desquelles ce colorant ne s'accumule pas sont celles où les molécules de collagène se chevauchent complètement. Dans ces conditions, en coloration négative, la période D comprend une zone de non chevauchement de 0,6 D de longueur et une zone de chevauchement de 0,4 D de longueur.

Ce modèle est actuellement unanimement accepté. Ce n'est par contre pas le cas en ce qui concerne l'assemblage dans les trois dimensions d'une fibrille cylindrique. Selon un des

modèles en vigueur, les groupes de molécules de collagène commencent par s'assembler en longues sous-unités hélicoïdales encore appelées microfibrilles, comportant 5 molécules de collagène par tour d'hélice. Ces microfibrilles s'aplatiraient et s'assembleraient ensuite pour former des fibrilles de collagène beaucoup plus épaisses (BAILEY et al, 1980).

Cet assemblage des molécules de collagène en édifice fibrillaire est considérablement renforcé par l'existence de liaisons transversales intercaténares.

En effet, une enzyme la lysyl oxydase, qui agit de préférence au niveau des régions non hélicoïdales de la molécule de collagène, désamine certains résidus lysine et OH-lysine pour former des groupements aldéhydes très réactifs.

Les groupements aldéhydes de différentes molécules de collagène adjacentes interagissent et établissent des liaisons covalentes entre eux ou avec d'autres résidus de lysine ou d'OH-lysine. L'ampleur et le type de pontage transversal varie d'un tissu à l'autre et permettrait d'expliquer la résistance plus ou moins importante d'un tissu à la tension. Par exemple, au niveau des tendons, le nombre de liaisons inter-caténares est particulièrement important.

TECHNIQUES (Microscopie Electronique)

Les blastèmes de régénération sont fixés pendant une heure à la température du laboratoire au glutaraldéhyde à 2,5% dans un tampon cacodylate 0,1 M pH7,4. Après lavage dans le tampon, les pièces sont post-fixées pendant une heure à 4°C dans le tétr oxyde d'osmium à 1% dans le même tampon.

L'inclusion est réalisée dans l'araldite après déshydratation à l'acétone. Les coupes semi-fines sont colorées au Bleu Azur. Les coupes ultra-fines réalisées au couteau de diamant sont contrastées par l'acétate d'uranyle en solution alcoolique et par le citrate de plomb (REYNOLDS, 1963). Les observations sont effectuées au microscope électronique JEOL (JEM 120 CX).

RESULTATS

Nos observations en microscopie électronique ont été réalisées à partir de 6 régénérats prélevés après 4 jours de dénervation. Des régénérats ayant atteint le stade jeune cône ont également été observés et constituent les témoins.

Tous les blastèmes de régénération sont constitués d'un massif mésodermique coiffé d'un épiderme pluristratifié. Cet épiderme est constitué de cellules jointives reposant sur une lame basale caractéristique. Nous n'avons observé aucune modification significative consécutive à la dénervation au niveau de ce tissu.

Le massif mésodermique sous-jacent présente une population cellulaire hétérogène aussi bien chez les témoins que chez les dénervés. Il est en effet possible d'y distinguer différents types cellulaires, chacun d'eux ayant des caractéristiques spécifiques. Ces différentes cellules baignent dans une matrice extra-cellulaire dense et complexe.

Une population mésodermique hétérogène.

- Le type cellulaire le plus fréquemment rencontré dans les régénérats témoins et dénervés depuis 4 jours possède globalement les caractéristiques de fibroblastes (Pl. I). Ces cellules présentent un noyau volumineux renfermant de grosses mottes de chromatine dense aux électrons baignant dans un nucléoplasme qui est lui, par contre, beaucoup moins dense aux électrons (Pl. I, a). Par ailleurs, ces cellules possèdent un important réseau intracytoplasmique de saccules couverts de ribosomes correspondant au réticulum endoplasmique rugueux et renfermant un matériel flocculeux dense aux électrons. Ce réseau, particulièrement abondant dans ces cellules, rend le cytoplasme relativement contrasté. Ce dernier renferme également de nombreuses mitochondries ainsi qu'un appareil de Golgi constitué de nombreux dictyosomes. Ces dictyosomes sont disposés à un pôle de la cellule, à proximité du noyau (Pl. I, c). Les saccules empilés qui les constituent sont dilatés et renferment un matériel flocculeux. Ces mêmes saccules émettent de nombreuses vésicules golgiennes qui coalescent pour donner naissance à des granules de sécrétions dont le contenu apparaît également très dense aux électrons (Pl. I, d). Certaines de ces vésicules de sécrétion contiennent des structures ayant une longueur de l'ordre de 350 nm et une épaisseur de 80 nm. Les extrémités de ces structures sont renflées (Pl. I, e).

D'autres vésicules volumineuses, renfermant un matériel flocculeux, sont entourées de petites vésicules qui leur sont accolées et qui renferment également le même type de matériel (Pl. I, b).

Ces cellules présentent par ailleurs des pseudovésicules renfermant des fibrilles de collagène coupées longitudinalement ou transversalement. Ces pseudovésicules correspondent en fait à des invaginations de la membrane cytoplasmique de ces cellules (Pl. II, c).

Ce type cellulaire est en effet en étroite relation avec la matrice collagénique qui l'entoure presque exclusivement (Pl. II, a) . On distingue en effet très nettement dans le cytoplasme périphérique de ces cellules, un important réseau de myofilaments alignés parallèlement à la membrane cytoplasmique (PL. II, a). Ce réseau appartenant manifestement au cytosquelette de la cellule semble établir des contacts étroits avec le réseau fibrillaire de la matrice extracellulaire adjacente. Cette dernière n'est retrouvée qu'à proximité de ce premier type de cellule à allure fibroblastique (Pl. II, d, e). Enfin ces cellules peuvent établir des contacts étroits entre elles (Pl. II, b). Les zones membranaires situées au niveau de ces contacts apparaissent plus denses aux électrons que la membrane cytoplasmique limitant ces cellules.

Toutes les cellules communes ne présentent pas cet aspect. Nous avons aussi rencontré des cellules communes possédant un noyau dont la chromatine est beaucoup plus condensée que celle de la plupart d'entre elles. Le cytoplasme de ces cellules présente alors de nombreuses vacuoles et des figures myéliniques, signes évidents de dégénérescence (Pl. III, a, b). D'autres cellules présentent une condensation chromatinienne encore plus importante rappelant l'aspect de noyaux pycnotiques. Le cytoplasme de ces cellules est extrêmement rare ou totalement absent (Pl. III, c, d).

- Le deuxième type de cellules que l'on rencontre beaucoup moins fréquemment que le précédent , est caractérisé par un cytoplasme peu abondant , pauvre en réticulum endoplasmique, renfermant quelques rares dictyosomes et quelques mitochondries (Pl. IV, a). Les saccules de l'ergastoplasme apparaissent dilatés et renferment un matériel peu dense aux électrons. Les crêtes mitochondriales sont également dilatées (Pl. IV, b). Ces cellules ne renferment pas de lysosomes au sein de leurs cytoplasme et ne présentent pas l'aspect de cellules en état de dégénérescence. Beaucoup moins contrastées que les précédentes, elles possèdent un noyau volumineux garni d'une chromatine relativement diffuse. Elles sont par ailleurs rarement en contact avec la matrice extracellulaire.

Nous avons parfois rencontré au sein du massif mésodermique des cellules présentant des saccules extrêmement distendus dont les contours étaient difficiles à suivre.

- Un troisième type cellulaire beaucoup plus rare, caractérisé par de nombreux filipodes émis par la membrane cytoplasmique, existe au sein de la population cellulaire mésodermique (Pl. IV, c). Il présente toutes les caractéristiques d'une cellule phagocytaire. Le cytoplasme est riche en inclusions diverses et en vacuole de phagocytose. Ces cellules peu nombreuses aussi bien chez les témoins que chez les dénervés établissent des contacts avec les cellules voisines.

PLANCHE I.
Ultrastructure des cellules communes

Fig. a Cellule commune appartenant à un régénérat ayant atteint le stade jeune cône et fixé après 4 jours de dénervation. Le cytoplasme de la cellule renferme un abondant réticulum endoplasmique rugueux (pointes de flèches) et de très nombreuses mitochondries (m). Le noyau présente une chromatine dense aux électrons presque exclusivement disposée à sa périphérie. Ce type de cellule est entourée d'une matrice dense, formée d'un réseau de fibrilles de collagène (Coll). x 6000.

Fig. b : Le cytoplasme de ces cellules communes renferme des vésicules golgiennes volumineuses (V), contenant un matériel flocculeux, en étroite relation avec des vésicules beaucoup plus petites (v). x 72000.

Fig. c : Détail d'une cellule commune.

A proximité du noyau, apparaissent de nombreux dictyosomes (flèches) émettant des vésicules golgiennes. N : noyau x 19000.

Fig. d : Détail d'un dictyosome d'une cellule commune.

Le contenu de certaines vésicules de sécrétion (flèches) situées du côté de la face de maturation du dictyosome apparaît dense aux électrons. C : cytoplasme x 29000.

Fig. e : Vésicules de sécrétion renfermant des structures du type SLS like (flèches) ayant une longueur de l'ordre de 350 nm et une épaisseur de 80 nm. GS : grain de sécrétion x 70000



1976

PLANCHE II

Les relations des cellules communes avec la matrice collagénique.

Fig. a : Les cellules communes établissent d'étroits contacts avec la matrice collagénique (Coll) qui les entoure. Leur cytoplasme périphérique est très riche en microfilaments (flèches) parallèles au grand axe de la cellule. La membrane cytoplasmique est soulignée par un trait discontinu. N : noyau x 10000

Fig. b : Les cellules communes établissent des contacts étroits entre elles au niveau de jonctions rappelant la structure de desmosomes (flèches). RER : réticulum endoplasmique rugueux x 19000

Fig. c : La membrane cytoplasmique de ces cellules communes s'invagine énormément. On retrouve dans ces invaginations cytoplasmiques ou pseudovésicules (flèches) des fibrilles de collagène ici coupées transversalement. x 20000

Fig. d : Matrice collagénique - Observer la remarquable périodicité de ces fibrilles collagéniques x 20000

Fig. e : Fibrilles de collagène x 58000.



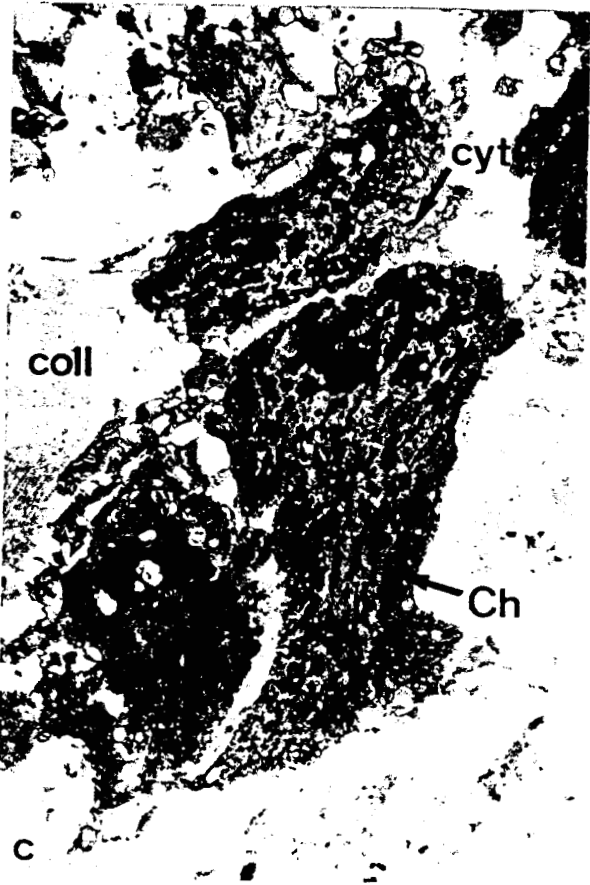
PLANCHE III
Des cellules en voie de dégénérescence

Fig. a : Cellule commune observée à l'intérieur du massif mésodermique. Le noyau volumineux (N) présente une chromatine condensée. Le cytoplasme peu important montre des signes évidents de dégénérescence. des amas de collagène (coll) apparaissent à proximité de cette cellule. x 3600

Fig. b : Détail du cytoplasme de la cellule commune de la figure a. Le cytoplasme présente de nombreuses vacuoles et des figures myéliniques (pointes de flèches), signes de dégradations des organites cellulaires. La membrane cytoplasmique (Mc) devient indistincte. x 10000

Fig. c : Cellules présentant une condensation de chromatine (Ch) importante rappelant l'aspect de noyaux pycnotiques. Le cytoplasme (Cyt) devient rare. coll : collagène x 2900

Fig. d : Noyau pycnotique. La chromatine (Ch) est extrêmement condensée. le cytoplasme ainsi que la membrane plasmique ont disparu. x 7200



BU
LILLE

PLANCHE IV

Ultrastructure des autres types cellulaires d'un régénérat.

Fig. a : Cellule pâle provenant d'un régénérat dénervé 4 jours avant la fixation. Le noyau occupe presque toute la cellule. Noter l'absence de matrice collagénique aux alentours de ce type de cellule. La membrane cytoplasmique apparaît parfois indistincte (flèche). N : noyau x 4000

Fig. b : Détail d'une cellule pâle. Le cytoplasme renferme un réticulum endoplasmique rugueux (RER) dont les citernes sont dilatées. De nombreux filaments (flèche) sont visibles dans le cytoplasme. Les crêtes mitochondriales (M) apparaissent également dilatées. x 19000

Fig. c : Cellule phagocytaire : le cytoplasme renferme des gouttelettes lipidiques (L) et de nombreuses vacuoles phagiques (Ph). La membrane cytoplasmique émet de nombreux filopodes (F) x 5000



La matrice extracellulaire

En microscopie électronique, cette matrice apparaît comme un réseau complexe de fibrilles de collagène. Cet important réseau est tout particulièrement situé à proximité des cellules appartenant au premier type cellulaire cité précédemment. Chaque fibrille de collagène présente une périodicité remarquable, à savoir la succession de bandes denses aux électrons d'environ 50 nm (Pl. II, d, e). Ces fibrilles de collagène sont également retrouvées dans les invaginations des cellules mésodermiques. Elles semblent en contact avec le cytosquelette des cellules baignant en leur sein.

DISCUSSION

Il apparaît, d'après nos observations réalisées en microscopie électronique que la population cellulaire d'un régénérat ayant été dénervé depuis 4 jours ou ayant atteint le stade jeune cône, est composée de plusieurs types cellulaires. Chez le triton adulte, *Triturus viridescens*, BRYANT et al (1971) ont montré que la population blastémale est composée de 4 types de cellules distincts, qualifiées de cellules communes, cellules pâles, cellules phagocytaires et cellules vacuolaires. Nos observations réalisées chez le Pleurodèle, *Pleurodeles waltlii*, aboutissent par contre à la conclusion que la population hétérogène composant le massif mésenchymateux du blastème de régénération est formée de 3 grands types de cellules. Un premier type cellulaire est caractérisé par des cellules à l'allure de fibroblaste (PIERAGGI et coll, 1985), baignant dans une matrice collagénique importante. Ce type cellulaire est particulièrement prédominant au sein de la population blastémale (SALPETER et SINGER, 1960 ; NORMAN et SCHMIDT, 1967). Ces cellules, qualifiées de cellules communes par BRYANT et al (1971) sont caractérisées par un réticulum endoplasmique rugueux extrêmement développé, indiquant à l'évidence une biosynthèse protéique accrue à leur niveau. Le deuxième type de cellules que nous avons rencontré, est caractérisé par des cellules beaucoup moins contrastées que les précédentes. Leur cytoplasme est en effet pauvre en ergastoplasme, ce qui leur a valu le nom de cellules pâles (BRYANT et al, 1971). Ces cellules, en nombre restreint aussi bien chez les dénervés que chez les témoins, présentent un réticulum peu abondant aux saccules distendus ainsi que des mitochondries dont les crêtes mitochondriales sont dilatées. Elles ne présentent cependant pas de signes de dégénérescence. Il n'a pas été en effet retrouvé de lysosomes au sein de leur cytoplasme. Leur allure générale rappelle celle de cellules embryonnaires. L'aspect dilaté de leurs organites cytoplasmiques pourrait

s'expliquer par une plus grande fragilité de ces cellules par rapport aux autres vis-à-vis de la fixation.

Selon BRYANT et al (1971), ces cellules pâles représenteraient des formes de dégénérescence des cellules communes, ce processus étant accéléré par la dénervation. Ces auteurs avaient en effet montré chez les dénervés une diminution du nombre des cellules communes corrélative à une augmentation du nombre des cellules pâles. Nos observations ne nous ont pas permis de retrouver ces changements dans la distribution des différentes catégories de cellules blastémales qui adviennent dans un jeune régénérat, à la suite d'une dénervation. Par ailleurs, signalons que cette réorganisation de la population cellulaire décrite par BRYANT et al (1971) n'a pas été retrouvée à la suite des observations obtenues en microscopie électronique à balayage (GERAUDIE et SINGER, 1981).

Un troisième type cellulaire caractérisé par des cellules présentant de nombreux filipodes et de nombreuses vésicules de phagocytose est présent dans les blastèmes témoins et dénervés. Le nombre de ces cellules qualifiées de phagocytaires par BRYANT et al (1971), n'augmente pas chez les dénervés, tout au moins au bout de quatre jours de dénervation.

Nous n'avons pas retrouvé de cellules appartenant au quatrième type cellulaire décrit par BRYANT et al, à savoir les cellules vacuolaires. Quelques cellules de nos explants présentent des vésicules très dilatées, mais ces vésicules sont en fait des saccules du réticulum endoplasmique puisque sur leur pourtour, on y distingue de nombreux ribosomes. Les cellules présentant des signes de détérioration au sein de nos régénérats ne peuvent en aucun cas être assimilées aux cellules vacuolaires décrites par BRYANT. Ces cellules apparaissent en fait fortement engagées dans une voie de dégénérescence.

Nos résultats ne confirment donc que partiellement ceux de BRYANT et al. Les cellules communes constituent effectivement le type cellulaire le plus abondant du blastème. Mais alors que chez le triton adulte la dénervation provoque des modifications dans la répartition des types cellulaires rencontrés au sein du régénérat, celle-ci ne provoque par l'apparition de cellules particulières chez le Pleurodèle. Nos résultats sont sur ce point en contradiction avec ceux obtenus chez *Triturus viridescens*.

Compte tenu de l'importance numérique des cellules communes et de l'important réseau de réticulum dont elles sont dotées, il apparaît comme hautement probable que ces cellules soient directement impliquées dans la synthèse de la matrice extracellulaire, en particulier dans la synthèse d'un des composants majeurs de la matrice : le collagène. Ces

cellules présentent en effet de nombreuses caractéristiques nous permettant de penser qu'elles sont engagées de façon active dans la synthèse du collagène. L'examen attentif de coupes ultrafines permet d'ailleurs de constater que les fibres de collagène entourent presque exclusivement ce type de cellules blastémales.

Il est de plus généralement admis que les précurseurs des molécules de collagène sont synthétisés au niveau des polyribosomes (REVEL et HAY, 1963), déversés dans les cavités du réticulum endoplasmique (ROSS et BENDITT, 1965, WEINSTOCK et LEBLOND, 1974) où ils subissent des modifications post-traductionnelles et qu'ils transitent par l'appareil de Golgi de la cellule via le milieu extracellulaire (HAY, 1981). Les cellules communes renferment un abondant ergastoplasme où sont probablement synthétisées les pro-chaînes α . Elles sont ensuite déversées dans le réseau de saccules constituant le réticulum endoplasmique. Le matériel flocculeux, peu dense aux électrons, observé dans nos préparations représente probablement cette phase de la formation du collagène (HAY et DODSON, 1973). Ce même type de matériel amorphe est retrouvé en très grande quantité à l'intérieur des vésicules golgiennes situées du côté de la face de maturation des dictyosomes ou encore dans le cytoplasme à proximité de la membrane cytoplasmique. Ce matériel peut également apparaître fibrillaire ou condensé (REVEL et HAY, 1963 ; WEINSTOCK et LEBLOND, 1974) comme le montrent nos observations. Certaines des vacuoles que nous avons décrites, renferment en effet un matériel extrêmement dense possédant toutes les caractéristiques des SLS like. Ces figures résultent d'un agencement particulier des molécules de procollagène. Par ailleurs, la présence d'autres vésicules, beaucoup plus volumineuses, renfermant également un matériel flocculeux dense aux électrons et entourées de petites vésicules dont il est difficile de dire si elles correspondent à des vésicules de pinocytose, suggère une condensation du contenu vacuolaire ou alors des vésicules golgiennes qui y déverseraient leur contenu (WEINSTOCK et LEBLOND, 1974).

Quoiqu'il en soit, de nombreuses vésicules golgiennes, dont on peut raisonnablement conclure qu'elles correspondent au stade final dans l'excrétion des précurseurs collagéniques, migrent vers la périphérie de la cellule. Leur contenu est déversé dans l'espace extracellulaire par exocytose. L'assemblage en fibrilles de collagène de ces précurseurs a lieu à proximité de la membrane cytoplasmique et nécessite l'intervention d'enzymes spécifiques également synthétisées par la cellule (TRELSTAD et HAYASHI, 1979). Cet assemblage fait intervenir directement la cellule et semble sous le contrôle de cette même cellule. En effet, de nombreuses invaginations cytoplasmiques des cellules

communes sont remplies de fibres de collagène (TRELSTAD et HAYASHI, 1979). Par ailleurs, le cytoplasme périphérique est en étroite relation avec la matrice par l'intermédiaire de son cytosquelette. Les cellules communes synthétisent donc les précurseurs du collagène et commandent sa mise en place au sein de la matrice.

CHAPITRE II
Dosage du collagène

INTRODUCTION

Nos observations en microscopie électronique nous ont permis d'appréhender les cellules communes comme étant le type cellulaire probablement responsable de la synthèse et de la mise en place d'un des constituants essentiels de la matrice extracellulaire : le collagène. Cet aspect qualitatif a été complété par une étude visant à quantifier ce dépôt matriciel au sein du massif mésodermique des blastèmes de régénération. A cette fin, nous avons utilisé une méthode colorimétrique basée un colorant, le rouge Sirius. Après avoir au préalable vérifié sa spécificité vis à vis du collagène présent dans les régénérats, nous avons dosé les effets de la dénervation sur le métabolisme de cette molécule dans les blastèmes de Pleurodèle. Deux techniques différentes ont été utilisées pour mener à bien cette étude quantitative : l'une a consisté en un dosage biochimique du collagène, l'autre a fait appel à l'analyse d'image.

TECHNIQUES

Les blastèmes de régénération excisés sont fixés au BOUIN HOLLANDE. Après lavage et déshydratation, ils sont inclus dans la paraffine. Ils sont ensuite débités en coupes sériées de 7 μm d'épaisseur. Les coupes sont ensuite colorées au Rouge Sirius.

Techniques histologiques

- Coloration au rouge Sirius

Après déparaffinage, les coupes sont immergées dans une solution de rouge Sirius à 0,1% dans de l'acide picrique à saturation pendant 15 minutes. Elles sont ensuite lavées pendant 15 minutes dans une solution d'HCl à 0,01N et séchées à température ambiante. Certaines coupes ont fait l'objet d'une post-coloration par la réaction de FEULGEN.

- Le rouge Sirius, colorant spécifique du collagène

Trois coupes histologiques réalisées dans un blastème de régénération et déposées sur lame sont soumises parallèlement à trois traitements différents. L'une d'entre-elles constitue la coupe témoin et baigne dans une solution de tampon Hepes 50 mM + CaCl_2 0,36 mM. La seconde est soumise à l'action d'une solution de papaïne déposée sur billes et la troisième à l'action conjuguée de la papaïne (1 mg/ml) et de la collagénase en solution à 1mg/ml dans le même tampon. Le traitement dure 4 heures à 30°C. Les coupes

sont lavées abondamment et colorées par la technique du rouge Sirius puis montées entre lame et lamelle.

Techniques biochimiques

- Dosage du collagène sur coupes

Une fois colorées au rouge Sirius et séchées à température ambiante, les coupes sont récupérées par grattage avec une lame de rasoir et déposées dans un tube à hémolyse contenant 1 ml de NaOH à 0,1N. Les tubes sont ensuite plongés dans un bain-marie à 37°C pendant 30 minutes et agités de temps en temps (JUNQUIERA et al., 1979). La lecture est réalisée à 540 nm sur un spectrophotomètre PYE UNICAM SP6-550 dans une cuve de 1 ml.

- Dosage des protéines sur coupe.

Les coupes sont récupérées sur ruban de paraffine puis disposées dans des tubes en polypropylène de 10 ml (Nalgène) dans lesquels sont ajoutés 150 µl de NaOH (4,0 M). Ces tubes sont soumis à une température de 120°C pendant 2 heures. Ils sont ensuite refroidis à température ambiante. Leur contenu est neutralisé par l'ajout de 150 µl d'acide acétique glacial et complété avec 250 µl d'une solution de ninhydrine à 5% diluée dans l'éthanol 100°. Les tubes sont finalement agités et plongés dans l'eau bouillante pendant 20 minutes.

Quant la réaction est achevée, ces tubes sont refroidis sur glace et complété avec 2,5 ml d'une solution d'éthanol à 50%.

La lecture est réalisée à 570 nm sur un spectrophotomètre PYE UNICAM SP6-550.

- Gamme étalon de collagène

Diverses quantités connues de collagène en solution (de 0 à 50 µg) sont disposées sur lame et séchées à température ambiante. Les lames sont ensuite fixées au BOUIN HOLLANDE pendant 1 heure, lavées et colorées par la technique du rouge Sirius citée ci-dessus. Le dosage du collagène est réalisé de la même manière que celle décrite pour les coupes sur paraffine.

Dosage cytophotométrique du collagène

Les effets de la dénervation sur le dépôt collagénique au sein des blastèmes de régénération ont été analysés par estimation des surfaces collagéniques colorées par le

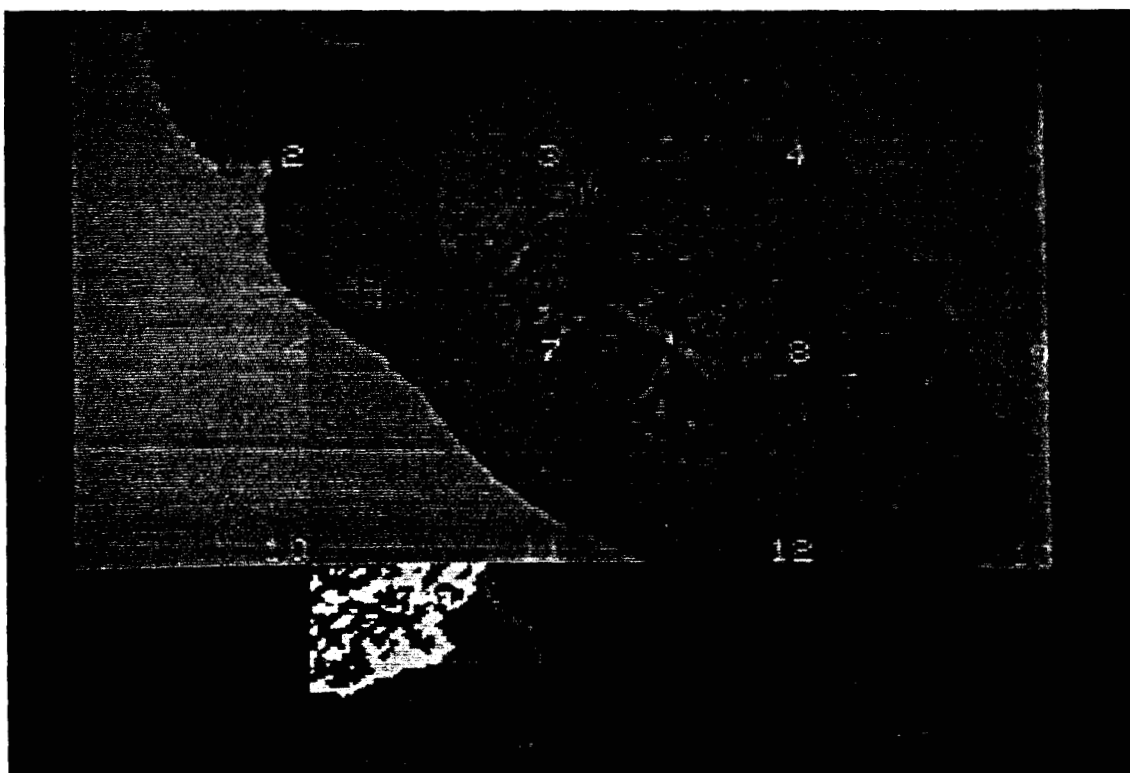


Figure 3 - Méthode de dosage cytophotométrique du collagène.

La photo représente l'écran du processeur externe de l'analyseur d'images SAMBA 200.

Programmé pour l'histologie, la platine motorisée du microscope balaie successivement la préparation et la découpe en champs de 64 sur 64 pixels de côté. L'analyse se fait à travers 3 filtres Rouge, Vert, Bleu, ce qui reconstitue les vraies couleurs de la préparation histologique. La mesure est réalisée (champ du bas de la photo) grâce à une double segmentation de l'image. Une première segmentation en fausse couleur donne la répartition du collagène, une seconde segmentation en bleu qui se superpose à la première (d'où la couleur rose réellement observée pour la segmentation collagène) et permet la mesure de la surface de la préparation. Le champ représentant la double segmentation en bas de l'image ci-dessus correspond au champ n° 13

Ep = épiderme, M = mésoderme, LB = lame basale, coll = collagène

rouge Sirius par rapport à la surface totale de l'explant grâce au système d'analyse d'images SAMBA .

Après fixation et coloration, les coupes sériées montées entre lame et lamelle sont placées sur la platine du microscope équipé d'un objectif à faible grossissement (x 10) de façon à obtenir une image bidimensionnelle complète leur correspondant.

L'ordinateur est programmé grâce à une double segmentation de l'image pour calculer automatiquement la surface totale de l'explant ainsi que la surface à attribuer au collagène (fig. 3). Le rapport surface collagénique/surface totale de l'explant est calculé pour la totalité de l'explant (1 coupe sériée sur 3 est analysée). Les résultats sont exprimés en pourcentage dans les blastèmes témoins (TeJo) et dans les blastèmes dénervés (DeJ4).

Analyse statistiques

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

RESULTATS

Gamme étalon

Nos résultats (fig. 4) montrent qu'il existe une relation proportionnelle entre la quantité de collagène et la densité optique du rouge Sirius.

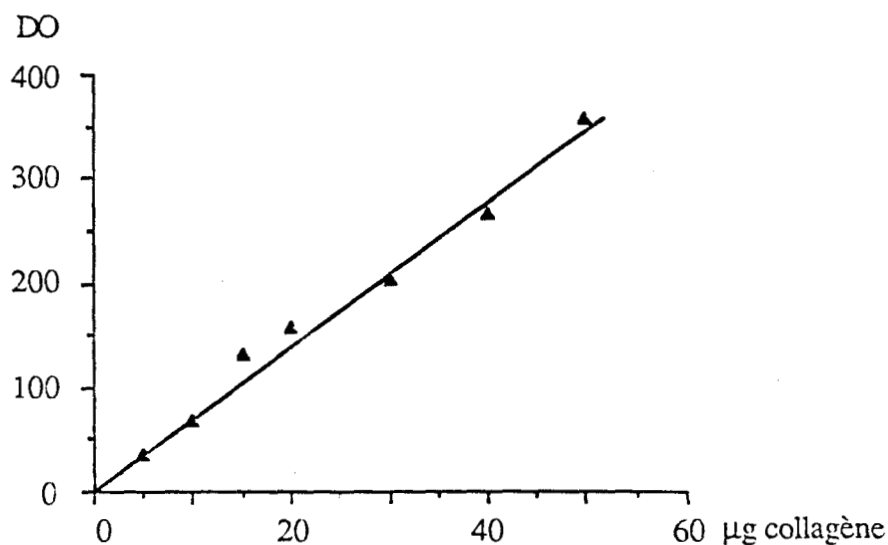


Figure 4 - Relation entre la quantité de collagène et la densité optique (DO) du rouge Sirius.

PLANCHE V
Spécificité du Rouge Sirius

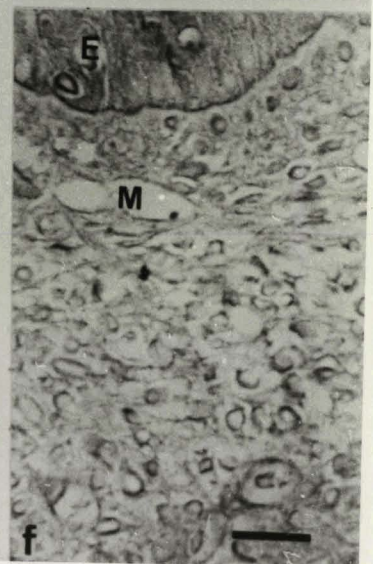
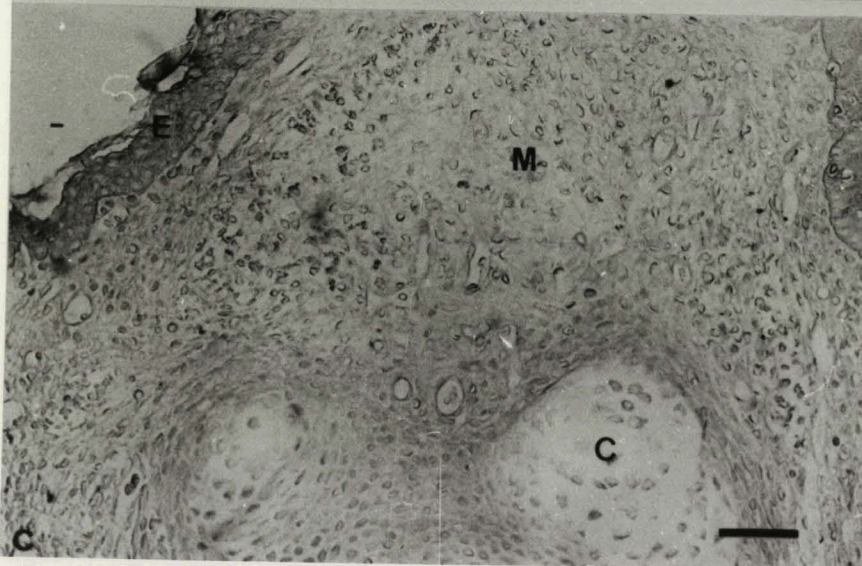
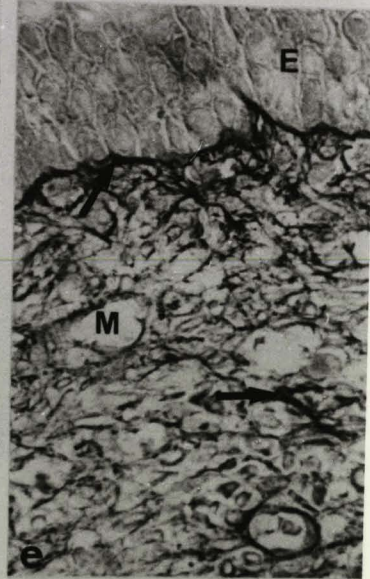
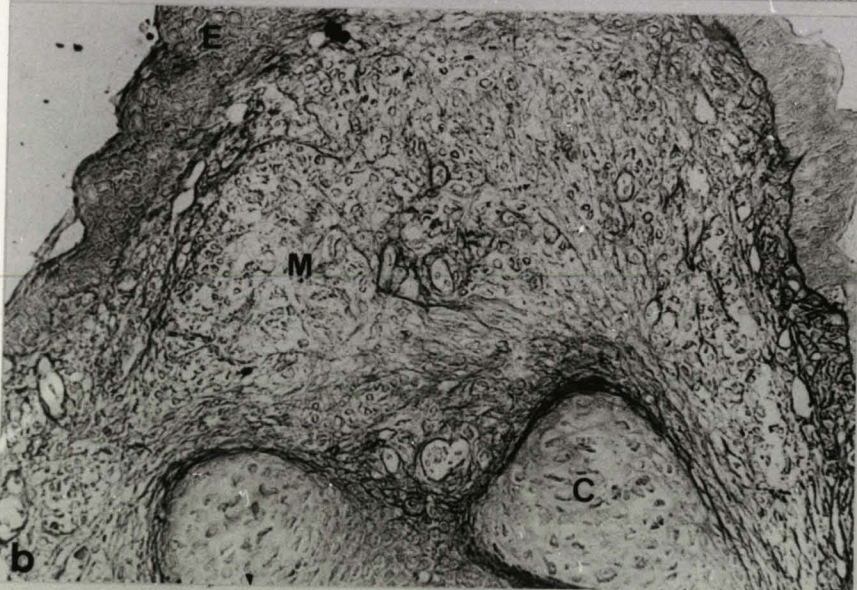
Coupes microscopiques d'un régénérat ayant atteint le stade palette démontrant la spécificité du Rouge Sirius dans la mise en évidence du collagène - a, d : coupes témoins - Noter la présence d'une matrice collagénique (flèche) au niveau de la lame basale (LB) et entre les cellules mésodermiques (M)

- b, e : coupes traitées à la papaïne. La matrice collagénique est beaucoup plus intensément colorée

- c, f : coupes traitées à la papaïne et à la collagénase. Ni la lame basale, ni la matrice collagénique intramésodermique ne sont colorées.

E : épiderme ; M : mésoderme ; C : cartilage ; a, b, c : x 50 - d, e, f : x 300

BU
LLE



Spécificité du rouge Sirius

Le régénérat utilisé a atteint le stade palette, soit environ vingt jours après l'amputation.

L'observation des coupes témoins permet de constater que, seules la matrice et la lame basale sous-jacente à l'épiderme, sont colorées en rouge (Pl. V, a, d). La matrice se présente comme un réseau dense de fibrilles disposées entre les cellules mésodermiques distales et périphériques. Il est possible de distinguer très nettement des massifs cartilagineux proximaux tout à fait concordant avec le stade du régénérat étudié. La coupe ayant été traitée par la papaïne, puis colorée au rouge Sirius présente un aspect similaire à celui de la coupe témoin (Pl. V, b, e). On y distingue toujours un réseau dense de fibrilles extracellulaires et une lame basale sous-épidermique, tous deux colorés en rouge mais de façon beaucoup plus intense que pour la coupe témoin n'ayant pas subi l'action de cet enzyme.

La coupe, ayant été traitée à la fois par la papaïne et la collagénase (Pl. V, c, f), présente par contre un aspect très différent. On ne retrouve ni la lame basale, habituellement vivement colorée, ni le réseau de fibrilles collagéniques disposées entre les cellules mésodermiques.

Ces résultats ont été confirmés par d'autres expériences du même type réalisées à des stades différents. Que ce soit sur un régénérat ayant atteint le stade jeune cône, ou sur un régénérat ayant été dénervé au même stade et fixé quatre jours après opération, les résultats obtenus après action de la papaïne sont identiques à ceux obtenus sur un régénérat plus âgé (stade palette). En effet, après coloration au rouge Sirius, dans ces deux cas, la matrice extra-cellulaire et la lame basale sont beaucoup plus vivement colorées que dans les coupes témoins.

Effet de la dénervation

Dosage biochimique

Compte tenu de la spécificité du rouge Sirius et de la stoechiométrie de la réaction, nous avons envisagé d'utiliser ce colorant pour doser la quantité de collagène dans des régénérats innervés et dénervés depuis quatre jours, à la fois chez le jeune Pleurodèle et chez des Pleurodèles adultes.

Les résultats sont consignés dans le tableau 2, et expriment la quantité de collagène par rapport à celle des protéines totales ramenées à 100.

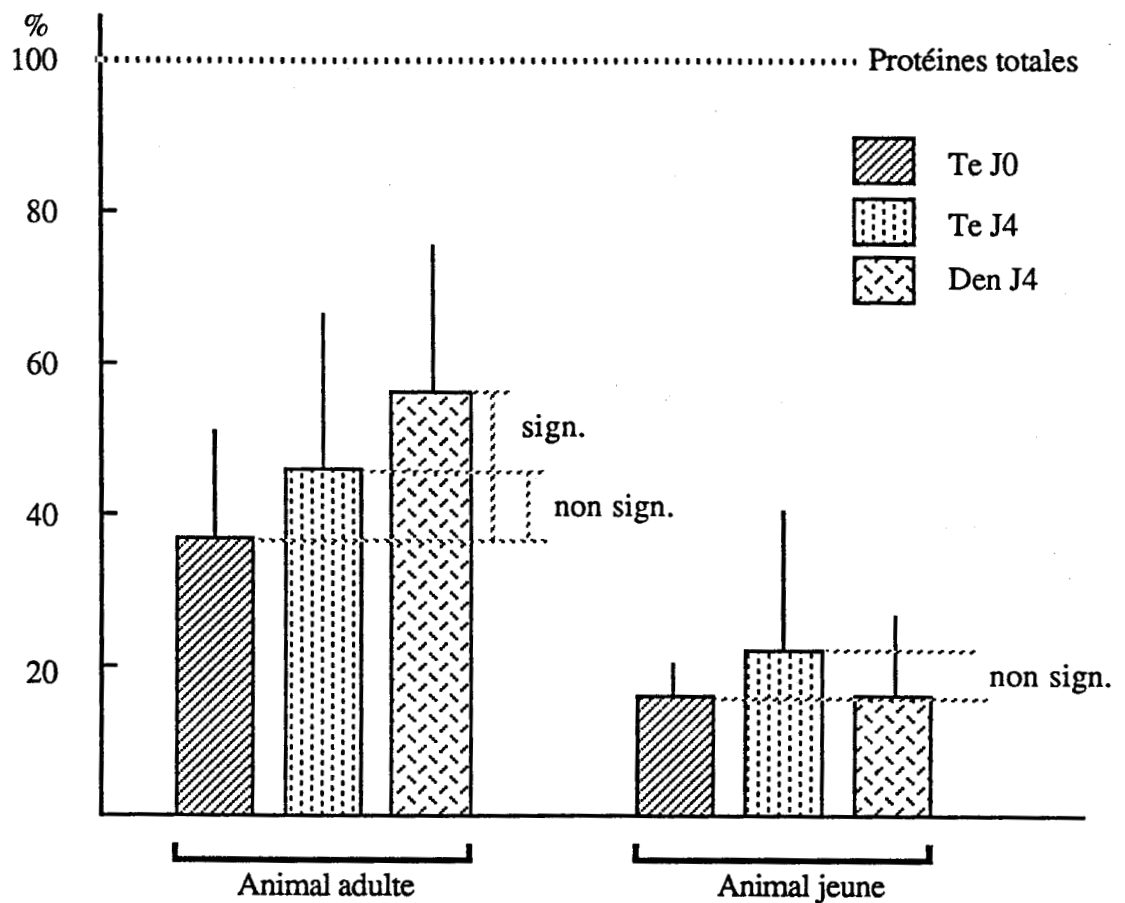


Figure 5 - Histogrammes exprimant la quantité de collagène par rapport à la quantité de protéines totales de régénérats innervés et dénervés prélevés sur des animaux adultes et sur de jeunes animaux. Les blastèmes prélevés sur des animaux adultes après 4 jours de dénerivation (Den J4) accumulent plus de collagène (+ 54%) que les blastèmes prélevés au stade jeune cône (TE J0). Sign : significatif ; non sign : non significatif ; Te J4 : blastème témoin ayant atteint le stade jeune palette.

	Pleurodèles adultes	Jeunes Pleurodèles
Te Jo	36,47 ± 14,56 (8)	15,56 ± 6,2 (3)
Te J4	44,6 ± 20,58 (6)	21,8 ± 17,8 (4)
Den J4	57,25 ± 19,58 (8)	16,55 ± 10,3 (8)

Tableau 2 - Quantité de collagène (en % par rapport aux protéines totales ramenées à 100) dans des régénérats de Pleurodèles jeunes et adultes.

TeJo : blastèmes fixés au temps t=0 de l'expérience.

TeJ4 : blastèmes fixés quatre jours après le début de l'expérience

DenJ4 : blastèmes fixés après quatre jours de dénervation par rapport à t=0 (les chiffres en parenthèses indiquent le nombre de cas pour chaque groupe).

Exprimés sous forme d'histogramme (fig. 5) nos résultats montrent que les blastèmes obtenus sur des animaux adultes et fixés après 4 jours de dénervation (Den J4) accumulent plus de collagène (57%) que ceux fixés dès le début de l'expérience (TeJo) et ayant atteint le stade jeune cône. Cette augmentation est statistiquement significative au risque de 5%. Il n'apparaît par contre aucune différence significative entre les blastèmes évoluant normalement depuis le début de l'expérience et ayant atteint le stade jeune palette (TeJ4) et les blastèmes dénervés (Den J4).

En ce qui concerne les résultats obtenus sur de jeunes Pleurodèles, il n'apparaît pas de différence significative dans les blastèmes dénervés (DenJ4) par rapport aux blastèmes innervés et fixés en début d'expérience (TeJo) ou ayant évolué pendant quatre jours (TeJ4).

Analyse d'images

Deux séries expérimentales ont été réalisées sur des explants prélevés sur des Pleurodèles adultes. Les résultats exprimés en pourcentage sont présentés sous la forme d'histogrammes (fig. 6 et fig. 7).

Dans les 2 cas, on constate que la quantité de collagène déposée dans les explants dénervés est beaucoup plus importante que celle déposée dans les explants témoins.

On enregistre une augmentation significative de 198% dans la 1ère série et une augmentation significative de 155% dans la seconde.

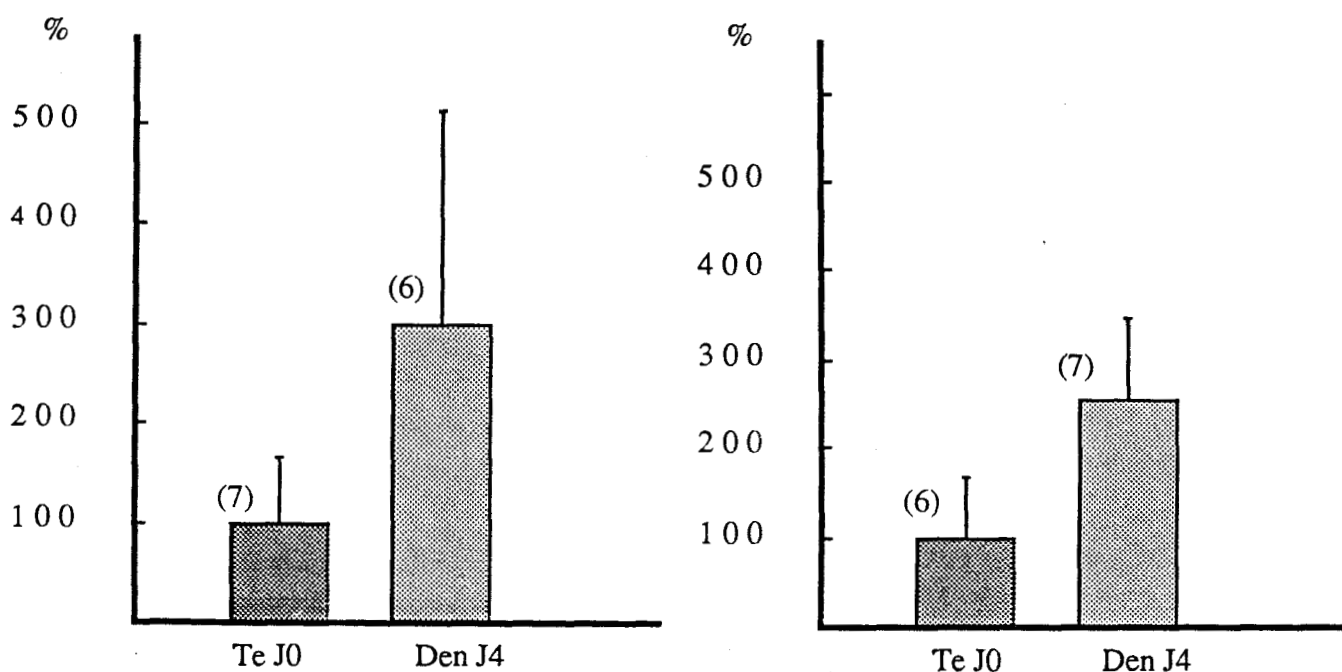


Figure 6 et 7 - Histogrammes exprimant en pourcentage la quantité de collagène déposé dans des régénérats innervés (Te J0) et dénervés (Den J4). On enregistre dans la première série expérimentale (Fig. 6, à gauche) une augmentation significative de 198% et une augmentation significative de 155% dans la seconde (Fig. 7, à droite). Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de blastèmes utilisés.

DISCUSSION

Nos résultats démontrent la spécificité du rouge Sirius dans la mise en évidence du collagène d'Amphibien et corroborent en cela ceux de JUNQUEIRA et al (1979) obtenus chez les Mammifères. En effet, la lame basale, sous-jacente à l'épiderme, connue comme étant essentiellement constituée de collagène est vivement colorée par le rouge Sirius, tout comme la matrice extracellulaire du massif mésodermique d'un régénérat, matrice composée essentiellement d'un réseau dense de fibres de collagène. La coupe traitée uniquement à la papaine est plus intensément colorée par le rouge Sirius que la coupe témoin. Ce résultat peut être expliqué par le fait que cet enzyme à large spectre digère les protéoglycannes, molécules d'emballage des fibres de collagène, permettant ainsi un plus grand accès des molécules de colorant aux sites collagéniques alors plus nombreux, puisque démasqués. Les résultats de JUNQUEIRA et al (1979) suggèrent fortement que ce sont les groupements sulfoniques du Rouge Sirius qui réagissent avec les groupements basiques des fibres de collagène. L'action combinée des 2 enzymes, la papaine et la collagénase sur une même coupe, aboutit à une digestion du réseau collagénique. La coupe n'est alors pas colorée par ce colorant spécifique. Compte-tenu de ces résultats histochimiques, nous avons utilisé ce colorant pour doser sur coupe, la quantité de collagène déposée par les cellules mésodermiques des régénérats d'Amphibiens. La seule molécule faisant exception à cette spécificité, le composant Clq du complément (JUNQUEIRA et al, 1979) n'est pas rencontrée dans notre modèle. Utilisant ce colorant, nous avons donc pu quantifier le collagène, la réaction Rouge Sirius/collagène étant stoechiométrique (JUNQUEIRA et al, 1979).

L'augmentation significative du dépôt de collagène, obtenue à partir d'animaux adultes dans des régénérats témoins et ayant atteint le stade jeune cône, suggère un contrôle du système nerveux sur le métabolisme de cette protéine. Le métabolisme accru de cette protéine, constaté en l'absence de nerfs, peut résulter soit d'une synthèse accrue de cette dernière par les cellules mésodermiques du régénérat, soit d'une activité collagénasique plus importante chez les témoins innervés que chez les régénérats dénervés ou encore soit d'un démasquage des sites collagéniques. Cette dernière hypothèse ne peut permettre d'expliquer nos résultats. En effet, l'action de la papaine sur des coupes issues d'un régénérat dénervé au stade jeune cône, fixé quatre jours plus tard et d'un régénérat témoin fixé au stade jeune cône, démasque dans les deux cas un certain nombre de sites collagéniques supplémentaires mis en évidence par le rouge Sirius. Les coupes traitées

par cet enzyme et colorées au rouge Sirius apparaissent plus intensément colorées que les coupes correspondantes n'ayant pas subi une action enzymatique.

La dénervation n'a donc pas entraîné un démasquage de sites collagéniques supplémentaires pouvant expliquer nos résultats.

Par ailleurs, la seconde hypothèse ne peut permettre de les expliquer. Il a en effet été démontré qu'aucune différence significative n'existait entre l'activité collagénasique de régénérats de membres innervés et celle de régénérats de membres dénervés, ceci jusqu'à 21 jours après l'amputation (MAILMAN et DRESDEN, 1979). L'accumulation de la masse collagénique au sein de blastèmes dénervés par rapport aux blastèmes régénérant apparaît plutôt comme le résultat d'une synthèse réalisée par les cellules mésodermiques. Les nerfs contrôlent donc le taux de synthèse de cette protéine structurale. Aussi, alors que le taux de synthèse des protéines globales est beaucoup plus bas dans les régénérats dénervés que dans les régénérats innervés (LEBOWITZ et SINGER, 1970 ; SINGER et CASTON, 1972), la synthèse de collagène semble spécifiquement et différemment affectée par l'absence d'informations nerveuses. Travaillant au stade palette, MAILMAN et DRESDEN, 1979 ont montré une chute de l'incorporation de proline beaucoup plus importante pour le collagène (réduction de 65%) que pour les protéines non collagéniques (réduction de 50%). Constatant corrélativement à ce stade, une réduction de la synthèse collagénique et néanmoins une différenciation ainsi qu'une poursuite de la morphogenèse des régénérats dénervés, ces auteurs expliquèrent leurs résultats par un turnover du collagène nouvellement synthétisé beaucoup plus bas chez les dénervés que chez les innervés.

Par ailleurs, que ce soit dans les blastèmes témoins (TeJo) ou dans les blastèmes ayant évolué pendant quatre jours ou encore dans les blastèmes dénervés, cette accumulation de collagène extracellulaire est toujours plus importante pour des animaux âgés que pour de jeunes animaux. L'aptitude des cellules mésodermiques à synthétiser du collagène varie donc avec l'âge de l'animal. En effet, la différence observée pour des régénérats fixés après quatre jours de dénervation, entre des animaux adultes et de jeunes animaux, est significative au risque de 1%. Chez les dénervés, l'indice mitotique chute et, les cellules ne se divisant plus s'engagent dans une phase de différenciation qui aboutit en partie à une synthèse collagénique. Il est possible de supposer que le pool de cellules qui synthétisent ce collagène soit moins important chez les jeunes animaux que chez les animaux adultes, ce qui expliquerait les teneurs plus élevées en collagène de ces derniers.

Il appartiendra, par une étude précise des types cellulaires rencontrés au sein de blastèmes innervés et dénervés, de déterminer celui qui s'est engagé dans cette voie.

L'accumulation significative de collagène dans les explants fixés après 4 jours de dénervation a été retrouvée par l'analyse d'images. Ces résultats confirment donc bien le dosage biochimique réalisé sur le même type d'explant. Les différences, du point de vue quantité de collagène accumulée chez les dénervés par rapport aux explants innervés, sont cependant beaucoup plus importantes quand l'étude est menée sur un analyseur d'images. Les résultats du dosage biochimique aboutissent à une augmentation de la quantité de collagène dans les explants dénervés par rapport aux témoins de 57% tandis que ceux obtenus par analyse d'images aboutissent à une augmentation respective de 198% et de 155% dans les 2 séries expérimentales. Ces résultats peuvent être interprétés de 2 manières ; la première serait que l'analyse d'image est une méthode beaucoup plus sensible que le dosage biochimique classique. La seconde serait qu'il existe une variabilité non négligeable dans la réponse des explants à la dénervation. Néanmoins, les 2 techniques prouvent que la dénervation au stade jeune cône se traduit par une accumulation du collagène au sein de la matrice extracellulaire.

CHAPITRE III
Identification et localisation
des différents types de collagène

INTRODUCTION

L'étude biochimique menée sur des blastèmes de régénération d'Amphibiens Urodèles nous a amené à la conclusion que les régénérats dénervés depuis 4 jours synthétisent de manière accrue du collagène. Par ailleurs, l'étude cytophotométrique menée sur ces mêmes régénérats a confirmé ce résultat.

Nous avons voulu compléter cette étude quantitative par une étude qualitative dans le but d'identifier et de localiser en utilisant des techniques immunocytochimiques, au sein des blastèmes témoins et dénervés, les différents types de collagène. Par ailleurs, la culture in vitro d'explants en présence ou en l'absence d'épiderme nous a permis de préciser le rôle éventuel de la couverture épidermique dans l'expression du collagène néoformé.

TECHNIQUES

Immunocytochimie

Après déparaffinage, les coupes sont plongées deux fois pendant 5 minutes sous agitation dans un tampon phosphate 10 mM, NaCl 150 mM à pH 7,2, puis séchées. Elles sont ensuite mise à incuber en présence d'anticorps de Lapin dirigés contre les types I, III et IV de collagène de Poulet (Institut Pasteur de LYON) pendant 30 minutes, ceci à 37°C et en atmosphère humide. Après plusieurs lavages dans le tampon phosphate, la fluorescéine conjuguée à des globulines de mouton anti-lapin (Institut Pasteur de LYON) est déposée sur les coupes pendant 30 minutes à température ambiante. Après quelques lavages répétés dans le tampon phosphate et coloration au Bleu Evans dilué au 1/10ème, les coupes sont montées dans de l'eau glycinée et observées sur un microscope orthoplan à fluorescence (Olympus).

Techniques de culture

La culture de blastème est réalisée selon la technique de LASSALLE (1983). Les blastèmes excisés sont stérilisés pendant 10 mn dans une solution de Ringer contenant de la pénicilline (500 U/ml), de la streptomycine (500 µg/ml) et de la mycostatine (500 U/ml). Après un passage rapide d'environ 1 mn dans une solution de chloramine T à 1% pour parfaire la stérilisation, les blastèmes sont rincés dans la solution saline stérile.

Les explants sont ensuite cultivés individuellement à l'interface air-milieu. Ils sont posés sur des filtres Millipore (diamètre des pores : 8 μm), eux-mêmes placés sur des grilles en acier en forme de trépied (fig. 8) reposant sur le fond d'une boîte de Pétri en matière plastique de 4 cm de diamètre.



Figure 8 - Schéma du dispositif de culture *in vitro*

Le milieu de culture est constitué de Leibovitz L15 (GIBCO) dilué à 70% auquel sont ajoutés 100 U/ml de pénicilline et 100 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine ainsi que 0,035 U/ml d'insuline (CHOAY). Les cultures sont maintenues à 25°C dans une atmosphère normale.

Cette technique est appliquée à 2 types d'explants : des régénérats ayant atteint le stade cône et des régénérats ayant atteint ce stade mais privés de leur couche épidermique enlevée mécaniquement à l'aide de pinces fines. Les explants sont fixés au bout de 24 heures de culture et colorés par le rouge Sirius.

RESULTATS

1 - Détection immunocytochimique des collagènes

* Mise en évidence du collagène de type I

Chez les témoins (TeJo), le marquage obtenu avec l'anticorps dirigé contre le collagène de type I, se répartit entre les cellules mésodermiques (Pl. VI, c). Il en est de même au sein des régénérats dénervés. Le marquage est alors plus accentué (Pl. VI, d).

* Mise en évidence du collagène de type III

Chez les témoins, une fluorescence uniforme observée à la périphérie des cellules mésodermiques et à la jonction épithélio-mésodermique révèle la présence de collagène de type III au sein de la matrice extracellulaire (Pl. VI, e). L'observation des coupes effectuées à partir de régénérats dénervés depuis 4 jours n'indique pas de différence sensible dans la répartition de ce type de collagène au sein de l'explant (Pl. VI, f)

* Mise en évidence du collagène de type IV

Chez les témoins, on note une fluorescence diffuse et discrète entre les cellules mésodermiques et au niveau de la lame basale (Pl. VI, g). Chez les dénervés, par contre, cette fluorescence est particulièrement abondante au niveau de la basale qui apparaît alors très épaisse (Pl. VI, h). Les espaces extracellulaires de la couche basale de l'épiderme ainsi que la matrice déposée entre les cellules mésodermiques renferment par ailleurs une quantité non négligeable de collagène de type IV.

Dans toutes les séries décrites, les contrôles effectués en substituant aux anticorps le tampon phosphate ou un sérum de Lapin non immunisé se sont révélés négatifs (Pl. VI, a, b).

2 - Culture in vitro d'explants

L'observation de coupes histologiques de régénérats témoins ayant atteint le stade jeune cône, fixé après 24 heures de culture et coloré par le micro-sirius (fig. 9) révèle la mise en place d'une matrice collagénique au sein du massif mésodermique. La lame basale est absente au niveau apical et extrêmement discrète en périphérie. Par contre, le régénérat privé de son épiderme et cultivé dans les mêmes conditions apparaît essentiellement constitué d'une matrice collagénique dense (fig. 10) au sein de laquelle on peut encore déceler les cellules mésodermiques.

DISCUSSION

Nos résultats aboutissent à la conclusion que les régénérats dénervés au stade jeune cône synthétisent en grande quantité, par rapport aux régénérats témoins, du collagène de type I et de type IV tout particulièrement. En ce qui concerne le collagène de type I, le dépôt s'effectue au sein du massif mésodermique. Le dépôt du collagène de type IV s'effectue entre les cellules mésodermiques et surtout au niveau de la lame basale. Les blastèmes dénervés, traités avec l'anticorps dirigé contre le collagène de type IV, présentent en effet

PLANCHE VI
Détection immunocytochimique des collagènes

Fig. a : Régénérat innervé traité avec du sérum non immun de lapin. Ep : Epiderme; M : Mésoderme x 150

Fig. b : Détail de la figure a. Noter l'absence de fluorescence. x 375

Fig. c : Régénérat innervé traité avec des anticorps fluorescents dirigés contre le collagène de type I. La fluorescence est uniformément distribuée entre les cellules mésodermiques (flèches) et au niveau de la lame basale (LB). M : Mésoderme ; Ep : Epiderme x 750

Fig. d : Régénérat fixé après 4 jours de dénervation et traité avec des anticorps dirigés contre le collagène de type I. La fluorescence apparaît entre les cellules mésodermiques (flèches) et au niveau de la jonction épithélio-mésodermique (double flèche) x 750

Fig. e : Régénérat innervé traité avec des anticorps dirigés contre le collagène de type III. Aucun marquage significatif n'apparaît. x 375

Fig. f : Régénérat dénervé traité avec des anticorps dirigés contre le collagène de type III. Un léger marquage est présent au niveau de la lame basale et entre les cellules mésodermiques (flèches) x 375

Fig. g : Régénérat innervé traité avec des anticorps dirigés contre le collagène de type IV. La lame basale ainsi que les espaces intercellulaires mésodermiques apparaissent très faiblement marqués. x 375

Fig. h : Régénérat dénervé traité avec des anticorps dirigés contre le collagène de type III. La lame basale (LB) très épaisse est intensément fluorescente. Elle semble émettre des projections au sein du massif mésodermique (petites flèches). La matrice est également intensément marquée. Les espaces intercellulaires de la couche basale de l'épiderme sont soulignés par une fluorescence non négligeable. x 375

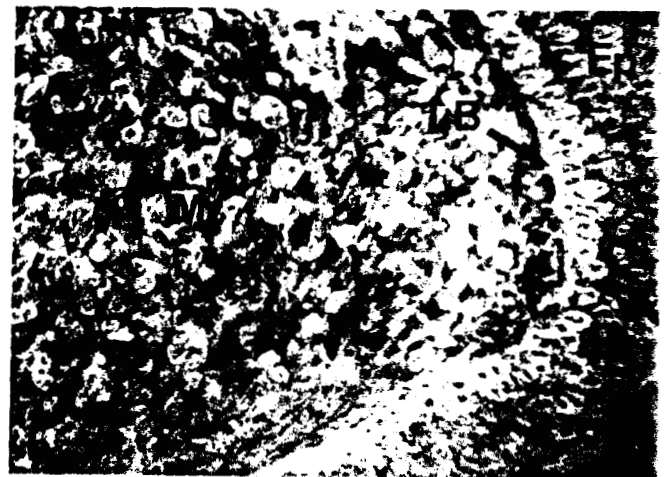
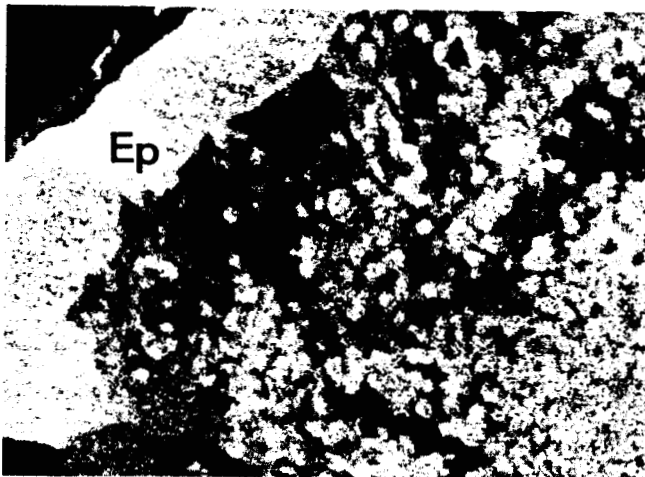
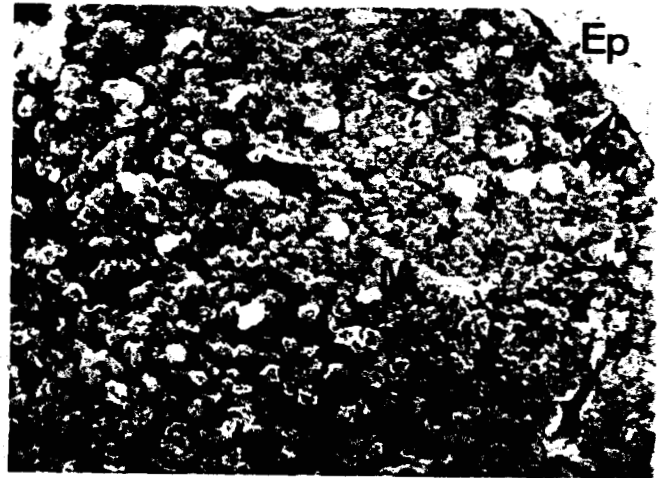
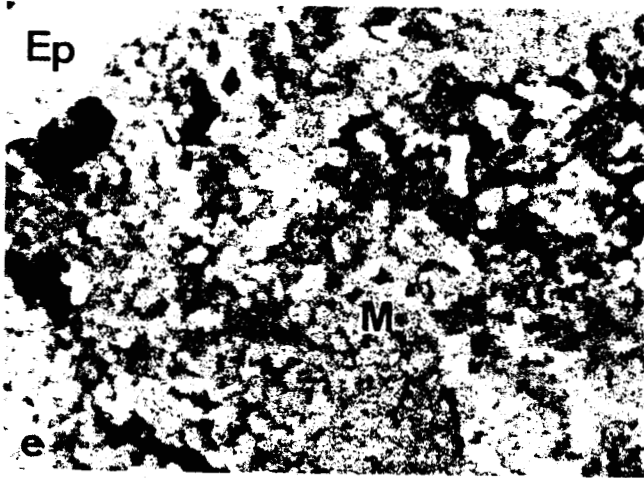
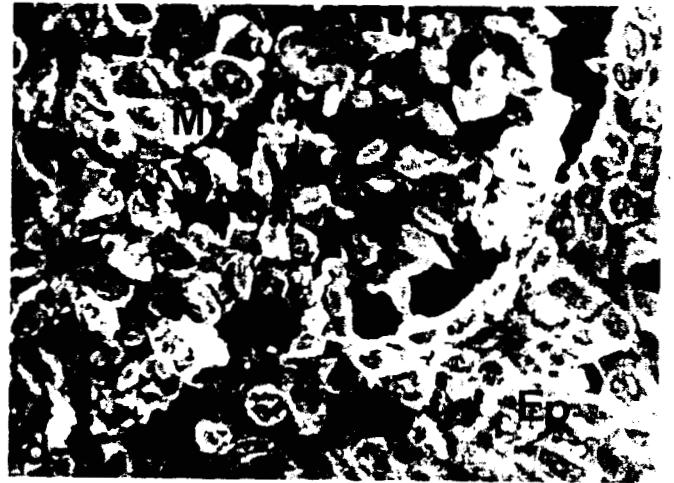
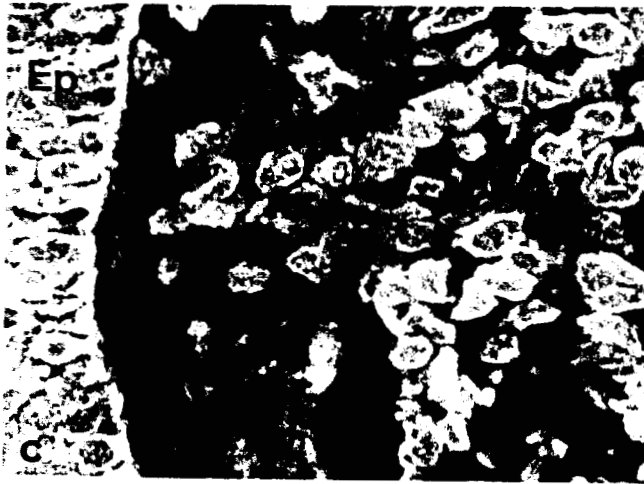
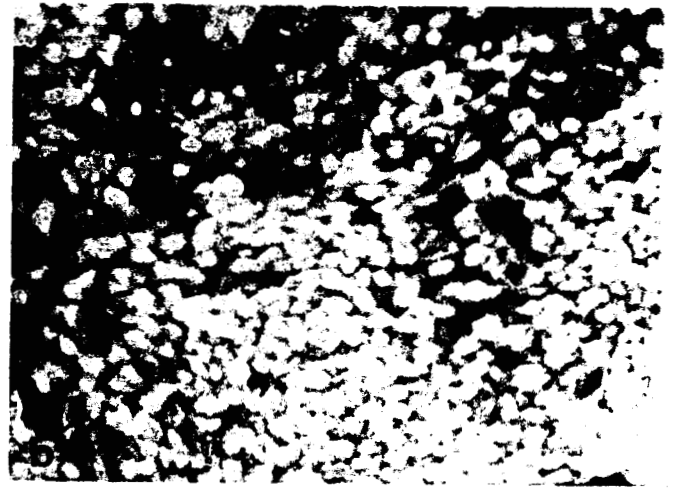
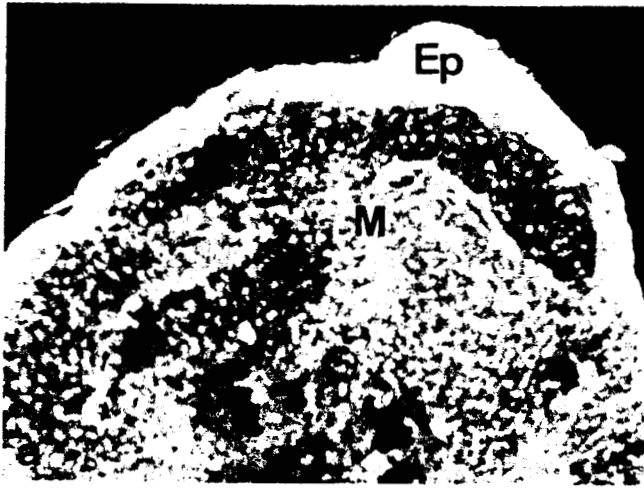




Figure 9 - Coupe histologique d'un régénérat prélevé au stade jeune cône, fixé après 24 heures de culture et coloré au rouge Sirius. L'explant constitué d'un massif mésodermique (M) et d'une cape épidermique (Ep) repose sur un filtre. La lame basale située à la jonction épidermo-mésodermique est extrêmement discrète en périphérie (flèches) et absente au niveau apical. La coloration révèle une matrice extracellulaire intra-mésodermique peu abondante. x 50.



Figure 10 - Coupe histologique d'un régénérat prélevé au stade jeune cône, privé de sa cape épidermique, fixé après 24 heures de culture et coloré au rouge Sirius. La coloration révèle une matrice extracellulaire collagénique très dense (flèches) au sein de laquelle on distingue encore quelques rares cellules mésodermiques. F: filtre. M: mésoderme. x 50.

une lame basale très épaisse. Par contre, sa mise en évidence entre les cellules mésodermiques est plus discrète. Bien que le collagène de type IV soit reconnu comme étant très spécifique des lames basales, il a cependant été mis en évidence par immunofluorescence au sein d'autres tissus tels que le tissu dermique (BARD et SENDEL, 1984) et au sein du mésenchyme périodentaire de germes dentaires (LESOT et al, 1980). La mise en place de cette lame basale épaisse dans les régénérats dénervés est corrélative d'une résorption du régénérat, d'autant plus marquée que le temps qui sépare la dénervation de la fixation du blastème est long. Nos résultats ont été obtenus après 4 jours de dénervation. La dénervation au stade jeune cône se traduit au bout de 7 jours par une résorption complète du régénérat.

Cette dénervation se traduit donc entre autre par la mise en place de la lame basale à la jonction épithélio-mésodermique.

Par ailleurs, nos résultats obtenus en culture montrent que l'absence d'épiderme se traduit au bout de 24 heures par un dépôt important de collagène au sein du massif mésodermique. L'influence déterminante de l'épiderme sur les tissus sous-jacents au début de la régénération a été bien montrée, son action se situant au niveau de la dédifférenciation et de la prolifération des cellules mésodermiques. L'épiderme cicatriciel possède une activité qui n'est pas partagée par l'épiderme banal (REVARDEL et coll, 1986). Des expériences de greffes d'épiderme cicatriciel sur des membres de Salamandre ainsi que des injections de ce même tissu dans des membres d'Anoures (REVARDEL et CHAPRON, 1984 ; REVARDEL, 1986) prouvent l'activité dédifférenciatrice de ce tissu. Ces observations pourraient expliquer les résultats que nous avons obtenus *in vitro* en l'absence d'épiderme, la suppression de l'activité dédifférenciatrice de ce tissu entraînant l'apparition massive de collagène synthétisé par les cellules mésodermiques stimulées par l'absence de système nerveux dans les blastèmes cultivés sans épiderme pendant 24 heures. Selon REVARDEL et coll (1986), l'activité du tissu cicatriciel serait de type protéolytique, probablement de type collagénasique.

Dans ces conditions et à la lumière des résultats exposés dans le chapitre II, il nous apparaît donc plausible de considérer que l'accumulation d'une matrice collagénique dans les régénérats cultivés en l'absence d'épiderme est une conséquence de l'absence d'activité protéolytique et collagénasique que ce tissu exercerait sur le massif mésodermique.

En résumé, les résultats exposés dans le chapitre II ont montré que les nerfs contrôlent le taux de synthèse de collagène des régénérats, la dénervation d'un régénérat au stade cône

entraînant une accumulation significative de cette protéine structurale au sein du massif mésodermique. Placé en culture, l'explant se trouve privé de toute information nerveuse. Les cellules mésodermiques s'engagent alors dans un processus de différenciation caractérisé par la mise en place d'une matrice extracellulaire mésodermique. En présence d'épiderme, le dépôt matriciel est tempéré par l'action dédifférenciatrice de ce tissu. Par contre, en l'absence d'épiderme, une importante matrice peut se déposer et ceci en 24 heures. *In vivo*, l'absence d'informations nerveuses se traduit par un dépôt matriciel significatif au sein du massif mésodermique et par la mise en place d'une lame basale. Celle-ci semble indiquer une action du système nerveux sur l'épiderme dont la couche basale synthétise du collagène de type IV.

L'obtention d'une matrice extracellulaire collagénique dense beaucoup moins rapidement *in vivo* qu'*in vitro* peut être interprétée par le maintien d'une activité protéolytique due à l'épiderme. Epiderme et système nerveux agiraient donc de manière synergique sur les cellules du massif mésodermique.

CHAPITRE IV
Cellules impliquées dans la synthèse du collagène

INTRODUCTION

Nos résultats, qu'ils soient ultrastructuraux, biochimiques ou encore morphométriques, montrent une accumulation significative de collagène au sein de la matrice extracellulaire mésodermique du blastème de régénération. Par ailleurs, l'analyse ultrastructurale nous ayant permis d'appréhender différents types cellulaires dans le blastème de régénération innervé ou dénervé, nous avons tenter de préciser le ou les types cellulaires responsables de la synthèse accrue de collagène.

Cette étude a été réalisée en appréciant les capacités de synthèse des cellules mésodermiques après injection d'un précurseur tritié du collagène, la proline et en suivant l'évolution des noyaux des cellules blastémales privées de leur innervation à la fois par des techniques classiques d'histologie et par analyse d'images, cette dernière technique permettant de reconnaître à l'intérieur d'une population cellulaire des sous-populations présentant des caractéristiques texturales chromatiniennes différentes. Nous avons vu en effet (chapitre I) que les cellules communes représentant la très grande majorité de cellules blastémales ont des noyaux dont la chromatine semble se modifier sous l'influence de la dénervation.

TECHNIQUES

A - Analyse d'images

L'appareil utilisé est un analyseur d'images, le SAMBA 200 (TITN-Thomson) ou Système d'Analyse Microscopique à Balayage Automatique (BRUGAL, 1985).

- Principe de l'appareil

Le SAMBA 200 (Fig. 11) est composé de :

- 1 capteur électro-optique intégrant un microscope et assurant l'exploitation des préparations à l'aide d'une platine motorisée en X, Y et Z, ainsi que l'acquisition des images.

- 1 processeur de traitement et d'analyse comportant le module de commande et de contrôle des capteurs et le module de traitement et d'analyse des images.

- 1 processeur d'applications qui constitue l'interface entre l'utilisateur et le système, analyse les données et gère les applications.

- des périphériques : imprimante, moniteur de contrôle, tablette graphique.

Pour de nombreuses applications, l'exploration de la préparation et l'acquisition des images s'effectuent en 2 temps :

- exploration monochromatique et à basse résolution d'une portion de la préparation et création en mémoire du système, d'un fichier des adresses correspondant aux positions X, Y et Z des objets détectés et sélectionnés ;

- exploration à haute résolution spatiale et photométrique d'une fenêtre dans laquelle sont centrés successivement les objets localisés au cours de la phase précédente. Cette analyse se fait soit en mode monochromatique à travers un seul filtre à bande large ou à bande étroite, soit en mode polychromatique à travers les filtres Rouge et/ou Vert et/ou Bleu. L'analyse des préparations colorées par la réaction de Feulgen s'effectue à travers un filtre vert à bande large. L'analyse des préparations colorées par le rouge Sirius s'effectue à travers

- Acquisition des images

A basse résolution, l'analyse de la préparation est réalisée par champs élémentaires disposés en lacets. Chaque champ élémentaire est balayé par pas successifs de la platine ; à chaque pas, une colonne de points d'images, perpendiculaire à la translation de la préparation, est acquise par une barrette de 256 photodiodes. Le niveau de gris de chaque point d'image est la moyenne pondérée de 4 photodiodes successives ; il est numérisé sur 8 bits (de 0 à 255) par un convertisseur analogique/numérique.

A haute résolution, le balayage d'un champ élémentaire est réalisé par déplacement de l'image à l'aide de 2 miroirs vibrants orthogonaux (scanners). Le détecteur est constitué par un photomultiplicateur.

L'autofocalisation précède l'acquisition de l'image de chaque champ élémentaire à basse et à haute résolution.

- Traitement et analyse de l'image

L'analyse des images à basse résolution permet de localiser les objets intéressants contenus dans la préparation. Ces objets sont détectés par segmentation de l'image à l'aide d'un seuil bas et d'un seuil haut de densité optique. Les objets dont la surface et la forme correspondent aux critères fixés par l'opérateur sont sélectionnés et leur adresse mémorisée en vue de leur analyse à haute résolution densitométrique, morphométrique et spectrale. Au terme de cette analyse où l'image initiale a été segmentée et isolée par un seuil, 17 paramètres sont calculés (fig. 12).

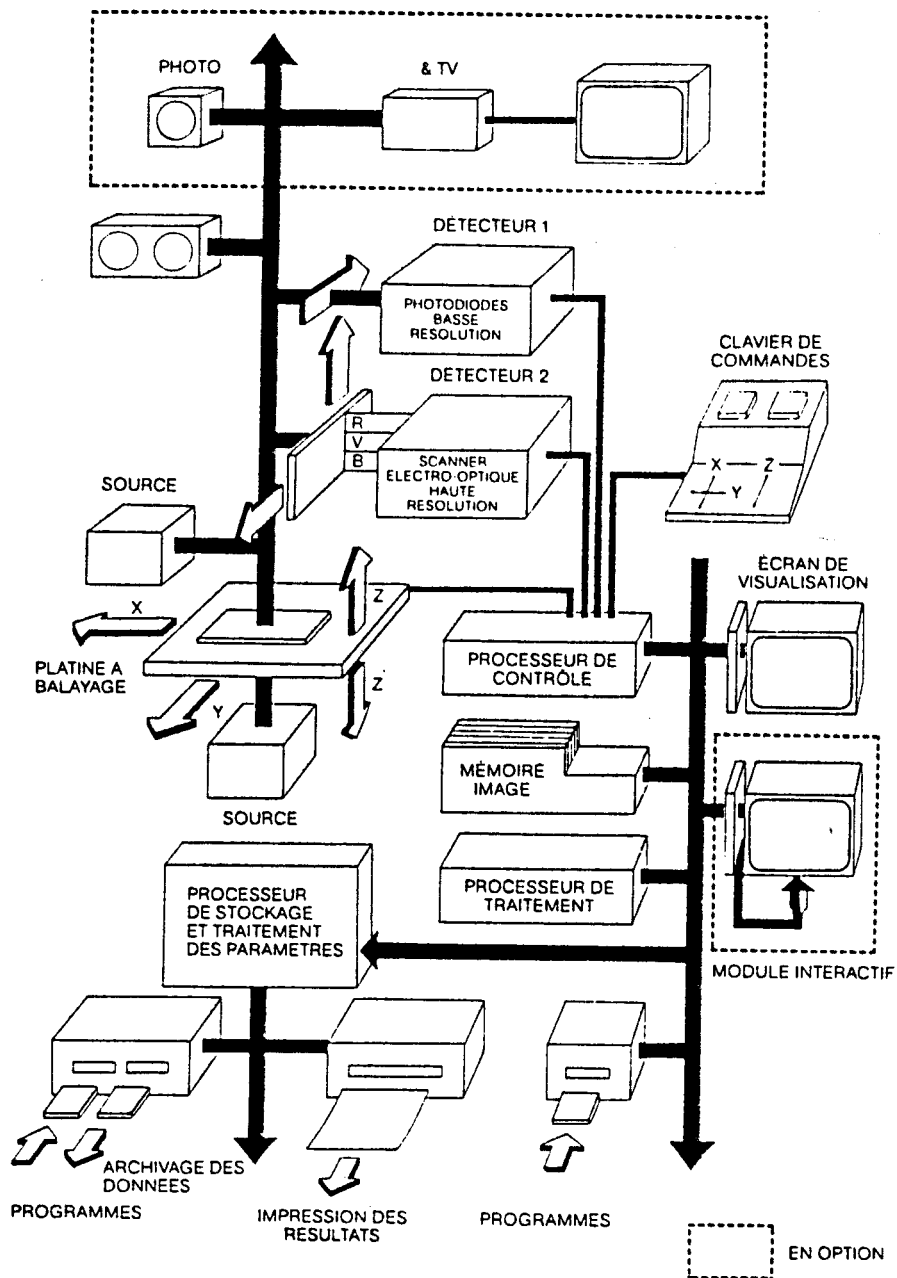


Figure 11 – Organisation fonctionnelle du SAMBA 200 (d'après BRUGAL, 1985)

- 1 Surface
- 2 Périmètre
- 3 Facteur de forme
- 4 Surface
- 5 Densité optique intégrée
- 6 Densité optique moyenne
- 7 Dissymétrie
- 8 Ecart-type
- 9 Aplatissement
- 10 Moyenne locale
- 11 Moment d'ordre 2
- 12 Variance des coefficients
- 13 Contraste
- 14 Importance des courtes sections
- 15 Importance des longues sections
- 16 Distribution des niveaux de gris
- 17 Distribution des longueurs de section
- 18 Proportion du nombre de sections

Figure 12 - Liste des paramètres enregistrées lors de l'analyse.

La surface étant mesurée 2 fois (n° 1 et 4), le nombre de paramètres réellement mesurés est de 17.

- Paramètres

- paramètres densitométriques :

La densité optique intégrée (DOI) mesure la quantité d'ADN nucléaire exprimée en unités arbitraires.

La densité optique moyenne (DOM) mesure le rapport entre la DOI et la surface du noyau ; la DOM exprime la concentration en ADN.

La variance de la densité optique (DOV) mesure l'hétérogénéité densitométrique du noyau.

- paramètres de texture :

Ces paramètres mesurent la distribution des niveaux de gris dans l'objet par référence au degré d'hétérogénéité et au caractère de la répartition de la chromatine.

* Le contraste mesure le nombre de points de jonction entre les régions nucléaires de valeurs d'extinction différentes, il augmente avec le nombre d'îlots de chromatine denses et bien séparés.

* La moyenne locale mesure le degré global de condensation de chromatine puisqu'il est en corrélation avec la DOM.

* La distribution des niveaux de gris mesure l'uniformité de la distribution de la densité optique.

* La distribution des courtes et longues sections mesure la fréquence des faibles et fortes condensations de chromatine.

- paramètres morphométriques :

* Surface (S)

* Périmètre (P)

* Facteur de forme (P^2/S)

- Analyse de données

L'analyse de données peut être appliquée aux paramètres recueillis sur chaque objet, sur chaque noyau repéré grâce aux programmes implantés dans le processeur d'applications. Ils concernent l'analyse discriminante et l'analyse taxonomique.

* Analyse taxonomique :

Ce mode d'analyse multifactorielle n'est pas supervisée par l'utilisateur. Elle permet de rechercher parmi une population d'objets représentés par leurs paramètres, quels sont les groupes significativement différents par référence aux seules particularités de la distribution de ces paramètres (EMPTOZ et coll., 1978 ; TERRENOIRE et TOUNISSOUX, 1979).

L'analyse taxonomique procède

- en recherchant le paramètre dont la distribution est la plus hétérogène,
- en découpant alors la population en sous-groupes sur la base d'un test de Fisher-Snedecor,
- en fusionnant les sous-groupes dont la séparation n'est pas significative à l'égard de l'ensemble des paramètres.

En itérant ce processus avec tous les paramètres, une séparation finale en sous-groupes est proposée.

* Analyse discriminante factorielle :

Ce mode d'analyse permet de comparer des groupes d'objets en tenant compte de tous les paramètres qui ont été calculés. Cette analyse affiche, sous forme de vecteurs, les paramètres qui différencient les groupes. La dimension du vecteur représente le pouvoir discriminant du paramètre qu'il spécifie.

* Analyse discriminante décisionnelle :

Ce mode d'analyse, supervisée par l'opérateur, permet l'identification automatique d'objets par référence à une base de données. Il implique (1) au moins deux groupes d'objets servant à l'apprentissage et sélectionnés par l'utilisateur ou par le résultat d'une analyse précédente, et (2) un (ou plusieurs) groupe d'objets à classer par référence aux premiers. Sur la base des paramètres représentant les objets en apprentissage, l'analyse discriminante décisionnelle sélectionne les paramètres les plus discriminants entre les groupes d'apprentissage puis utilise ces paramètres pour identifier les objets à classer aux objets de référence en tenant compte des variances intra et inter-groupes. Au terme de l'analyse une matrice de confusion est fournie ; elle représente l'ambiguïté éventuelle entre les groupes d'apprentissage et la classification des objets à identifier. Cette analyse que GIROUD (1982) a adapté au problème de l'étude de la

cinétique cellulaire par le SAMBA 200 correspond à un programme d'analyse discriminante (BMD 07M) de l'Université de Californie.

B - Méthode des écrasements tissulaires (squashes)

Les régénérats destinés à l'analyse du contenu nucléaire sont traités par la méthode des "squashes" selon le protocole suivant :

Après séparation du mésoderme de l'épiderme, les 2 tissus sont traités pendant 20 minutes dans une solution de trypsine à 3 p. 100 additionnée de collagénase dans le liquide physiologique de STEINBERG dépourvu de calcium et magnésium à la température de 37°C, puis fixés par le liquide de CARNOY pendant 15 mn. Les échantillons sont ensuite stockés dans l'alcool à 70°C. Au moment de la coloration, les échantillons sont plongés dans de l'acide acétique à 45% pendant quelques minutes pour favoriser la dissociation cellulaire. Ils sont ensuite écrasés entre 2 lames dans une goutte d'acide acétique à 45%. L'ensemble des 2 lames est refroidi à -40°C sur une galette de carboglace.

Après séparation mécanique, les 2 lames sont collodionnées et hydratées ; les préparations sont hydrolysées dans l'acide chlorhydrique 5N à 26°C pendant 1 heure. Toutes les préparations sont ensuite colorées par la "réaction nucléale" de FEULGEN et ROSSENBECK (1924).

C - Techniques autoradiographiques

La synthèse de collagène a été suivie par l'incorporation de proline ^3H , acide aminé le plus spécifique de la molécule de collagène. Ce précurseur a été injecté intrapéritonéalement 6 heures avant la fixation du régénérat, à raison de 50 $\mu\text{Ci}/\text{animal}$ (activité spécifique, 32 Ci/m mole, CEA). L'étude est réalisée chez des animaux adultes dont les régénérats sont innervés et chez des animaux dont les régénérats ont été dénervés 4 jours avant la fixation. Le temps optimal d'incorporation de proline tritiée dans les protéines a été établi à partir d'une étude cinétique antérieurement réalisée (EL MARAGHI, 1983) montrant que la relation liant le taux d'incorporation de la proline ^3H en fonction du temps est linéaire jusqu'à 6 heures (fig. 12). Compte tenu de ces résultats, nous avons choisi un temps de présence du précurseur radioactif de 6 heures pour mener à bien cette étude autoradiographique. Une fois fixés, les blastèmes sont écrasés entre 2 lames de verre puis colorées par la réaction de FEULGEN. Après rinçage, les lames sont

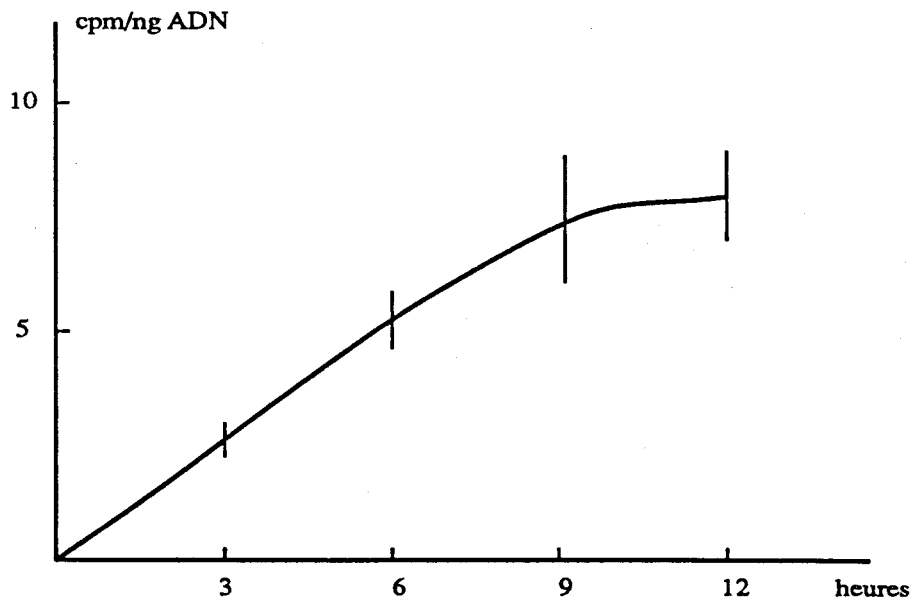


Figure 13 - Incorporation de ^3H -Proline en fonction du temps dans les régénérats de Pleurodèle (d'après El Maraghi, 1983)

séchées et recouvertes d'une émulsion ILFORD L4 (1 volume pour 4 volumes d'eau distillée, à 40°C), puis conservées à l'obscurité en atmosphère sèche pendant 3 semaines. Après révélation, les préparations sont montées entre lames et lamelles.

RESULTATS

Incorporation de ^3H -proline

L'observation d'écrasements tissulaires de blastèmes innervés montre que la plupart des cellules incorpore la proline radioactive (Pl. VII, a, b). Les noyaux de ces cellules sont de grande taille et leur chromatine dispersée. Chez les blastèmes dénervés pendant 4 jours, le nombre de cellules n'incorporant pas la proline augmente fortement. Les noyaux de ces cellules sont petits et présentent une chromatine dense (Pl. VII, c,d).

Observations histologiques

Des coupes colorées successivement par le rouge Sirius, pour mettre en évidence le collagène, et par la réaction de Feulgen révèlent la présence de noyaux de petite taille à chromatine condensée dans les blastèmes dénervés, la dénervation étant rendue visible

PLANCHE VII

Morphologie et métabolisme des cellules après dénervation

Figures a-d : autoradiographies réalisées sur des écrasements préparés à partir de régénérats prélevés sur des animaux adultes après injection intrapéritonéale de proline- ^3H
x 500

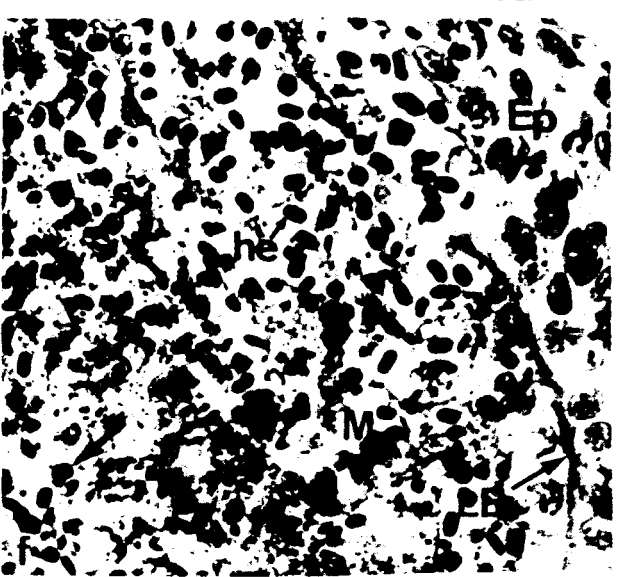
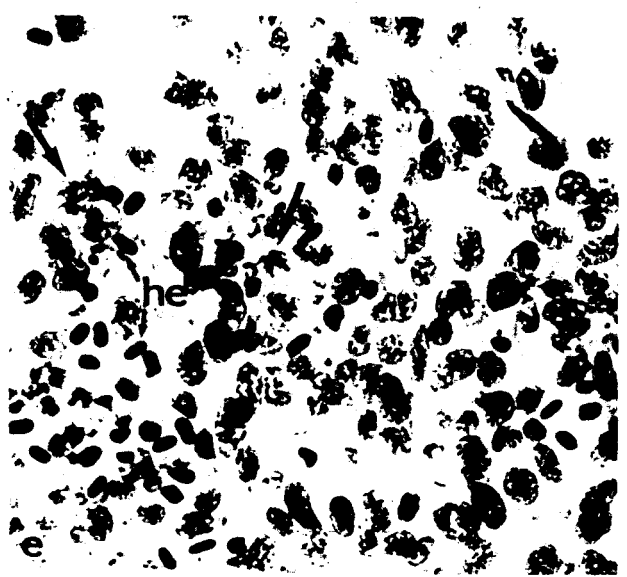
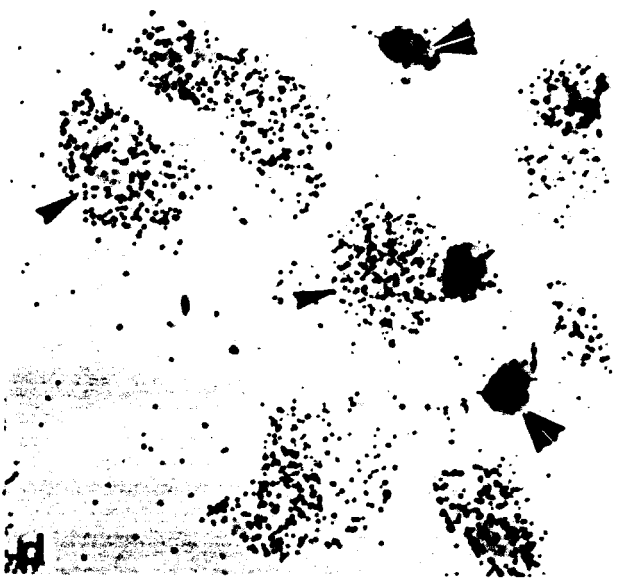
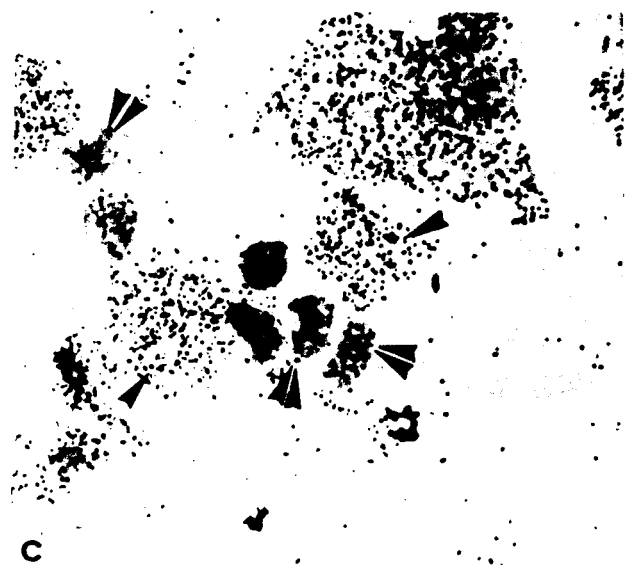
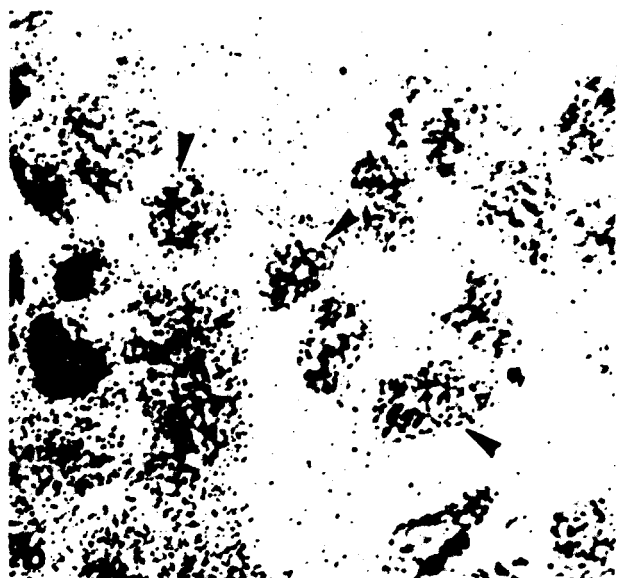
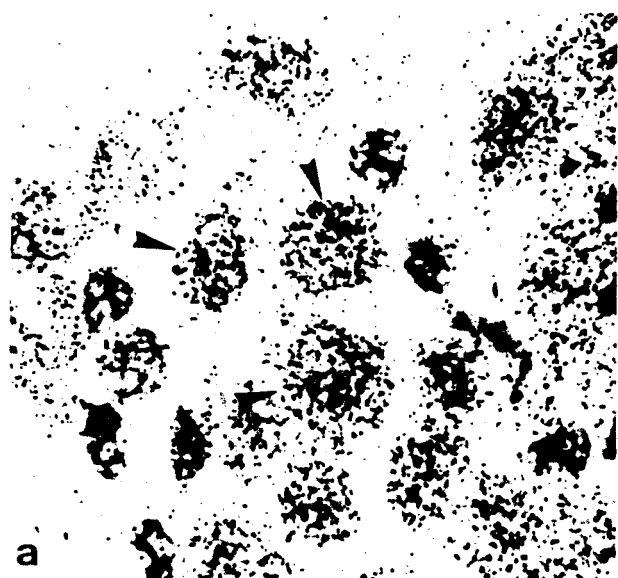
Fig. a et b : Ecrasements réalisés sur des régénérats témoins (Te J0). Le marquage intéresse la majorité des cellules. Le noyau est volumineux et la chromatine peu condensée

Fig. c et d : Ecrasements réalisés sur des régénérats dénervés (Den J4). Les cellules marquées ont un noyau de grande taille et peu condensé (1 flèche) alors que les cellules non marquées ont un noyau de petite taille et fortement condensé (2 flèches).

Figures e et f : Coupes histologiques de blastèmes colorés par le rouge Sirius et par la réaction de Feulgen. x 315

Fig. e : Blastème témoin. Les noyaux sont volumineux et présentent une chromatine peu condensée. Remarquer les nombreuses figures mitotiques (flèches). he = hématies

Fig f : Blastème dénervé. De nombreux noyaux ont une petite taille et leur chromatine est fortement condensée (flèches). La matrice et la lame basale (LB) sont bien visibles. he = hématies; Ep = épiderme ; M = mésoderme



par la présence d'un réseau fibrillaire extracellulaire accentué et d'une lame basale épaissie (Pl. VII, f).

Analyse d'images

- Cinétique cellulaire

Les mesures effectuées sur cellules mésodermiques dissociées par écrasement tissulaire, colorées par le Feulgen et analysées au SAMBA 200, ont été réalisées à partir de blastèmes ayant évolué en l'absence de nerf pendant 4 jours (DeJ4) et de blastèmes innervés fixés en début d'expérience (TeJo).

Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme de fréquence (fig. 14), le paramètre étudié étant la densité optique intégrée, reflétant la quantité d'ADN par noyau. Sur ceux-ci, nous avons estimé la valeur moyenne (2C) de la quantité d'ADN des cellules mésodermiques, puis calculé le pourcentage de cellules indubitablement engagées dans la synthèse d'ADN (DOI \geq 3C). Nous avons présenté 4 histogrammes, un correspondant à un blastème témoin et 3 correspondant à des blastèmes fixés après 4 jours de dénervation. Chez le blastème innervé témoin (TeJo) (fig. 14, a), les résultats montrent que les valeurs du contenu en ADN des cellules mésodermiques se répartissent entre 2C et 4C. L'histogramme présente deux pics, un premier pic correspondant aux cellules mésodermiques dont les noyaux renferment une quantité d'ADN égale à 2C et un second pic correspondant aux cellules mésodermiques dont les noyaux renferment une quantité d'ADN égale ou supérieure à 3C. Comme il est difficile de déterminer avec précision le début de la synthèse de DNA, nous avons considéré que les cellules sont en synthèse à partir du moment où leur contenu en DNA est au moins égal à 3C. Pour ces blastèmes témoins, 18,2% des noyaux traités ont un contenu en ADN supérieur à 3C.

Trois histogrammes correspondant à l'étude de 3 blastèmes fixés après 4 jours de dénervation sont présentés (fig.14 b, c, d). Dans les 3 cas, les histogrammes ont une allure différente. L'examen des 3 histogrammes permet de constater en effet une augmentation du nombre de noyaux en 2C et corrélativement une diminution du nombre des noyaux en 3C et 4C.

Chez ces dénervés, le pourcentage de noyau possédant un contenu en ADN supérieur à 3C est de 7% (fig.14 b) ; 4,1% (fig.14 c), et de 9% (fig.14 d) ;

La dénervation affecte donc bien la distribution des cellules mésodermiques, ceci au bout de 4 jours. On observe une accumulation des cellules en G₀₋₁ (2C) corrélative d'une diminution des cellules en S et G₂ (3C et 4C).

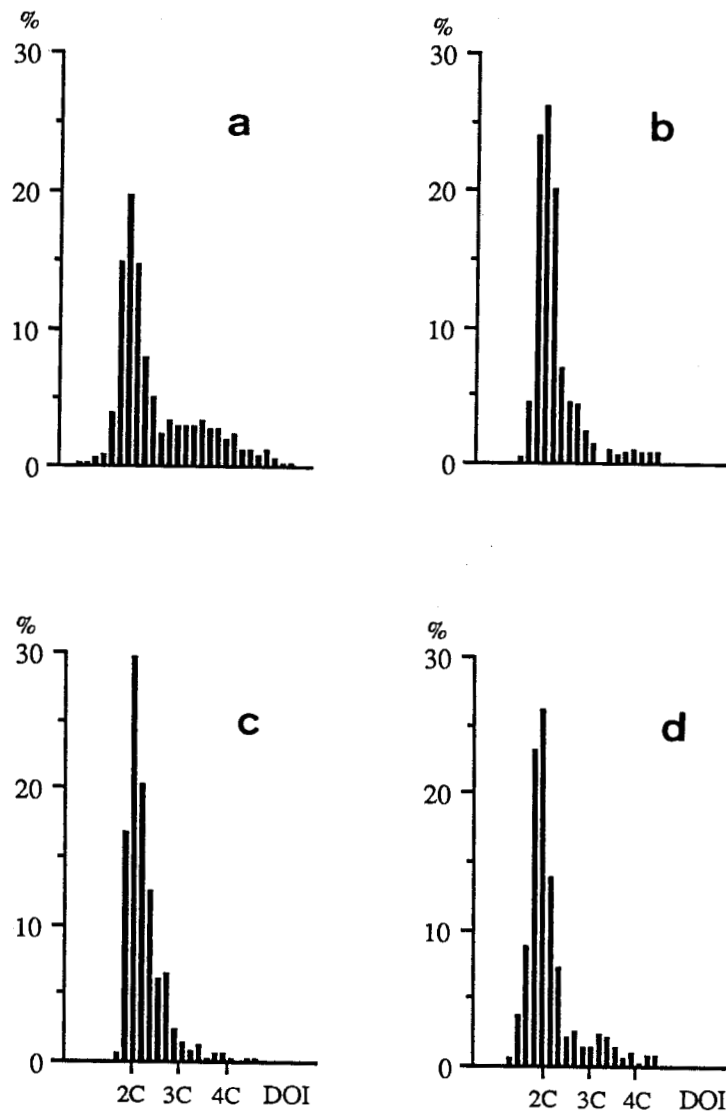


Figure 14 - Histogrammes de fréquence reflétant la quantité d'ADN nucléaire des cellules mésodermiques de blastèmes témoins fixés au stade jeune cône (TeJ0) et fixés après 4 jours de dénervation (DeJ4). Fig. a : TeJ0, Fig. b, c, d : DeJ4. En ordonnée est exprimé le pourcentage de noyaux dans chaque classe. En abscisse : densité optique intégrée exprimant la teneur en ADN donnée en unités arbitraires. La valeur 4C correspond à des cellules ayant répliqué leur ADN.

- Analyse des cellules hors cycle

Les cellules s'accumulant en G₀₋₁ au sein des blastèmes dénervés, nous avons cherché à distinguer, au sein de cette population hétérogène, plusieurs groupes. Pour cela nous avons sélectionné le régénérat présentant le maximum de cellules en phase G₀₋₁ et supprimé manuellement les quelques cellules encore engagées dans la phase S (fig. 15). C'est sur cette population (fig. 16) que nous avons tenté d'apprécier à l'aide de critères basés sur l'hétérogénéité chromatinienne, des filiations cellulaires. Il est en effet possible de reconnaître sur les squashes des cellules dont l'intensité de coloration est variable. La réaction de Feulgen étant stoechiométrique, la variation de coloration ne peut traduire, pour ces cellules qui possèdent toutes la même quantité d'ADN (2C) qu'une variation de la concentration de cet acide nucléique. Ce facteur est apprécié par l'un des 17 paramètres de l'analyse d'images, la densité optique moyenne (DOM), cette variation de la concentration d'ADN semblant liée aux variations du volume cellulaire, les noyaux les plus clairs apparaissant les plus grands. La DOM étant une variable continue susceptible de différencier différents types cellulaires en G₀₋₁, nous avons introduit ce paramètre comme variable à expliquer dans une analyse taxonomique non supervisée. A l'issue de cette analyse, le programme divise la population cellulaire initiale en 3 groupes.

La projection sur un repère à 2 dimensions des 17 paramètres n'est possible qu'après transformation par l'analyse canonique. Le but de cette analyse est de représenter au mieux dans un plan, le nuage initial des points répartis dans 17 dimensions de l'espace (en fonction des 17 paramètres). Le nuage est alors représenté dans un nouveau repère appelé système d'axes factoriels, élaboré de telle sorte que le premier axe (F₁) soit parmi toutes les droites possibles, celle sur laquelle se projette le nuage avec la plus grande dispersion et que le deuxième axe (F₂) rende compte de la plus grande dispersion résiduelle tout en étant orthogonal.

Après analyse canonique, les 3 groupes précédemment définis se répartissent sur une ligne en forme de cloche (fig. 17), les groupes extrêmes étant nettement éloignés l'un de l'autre. La représentation de ces 3 groupes par leur moyenne (au risque 5%) et leur dispersion (ellipse de tolérance à 95% de la population) permet de mieux appréhender la répartition des cellules sur la ligne en cloche (fig. 18). Les moyennes de chaque groupe sont bien séparées ; les zones de recouvrement des ellipses de tolérance à 95% révèlent que les cellules situées aux frontières d'un nuage ont des caractéristiques voisines de celles du nuage adjacent.

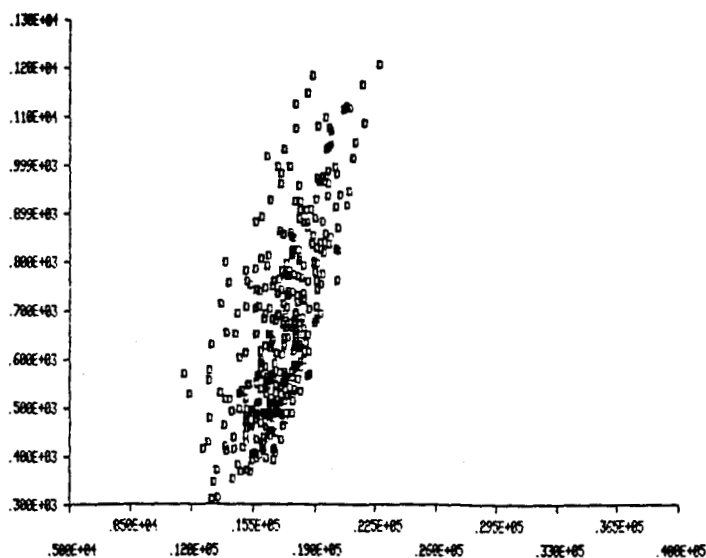


Figure 15 - Nuage de points représentant pour un blastème fixé après 4 jours de dénervation, la densité optique intégrée en fonction de la surface nucléaire. Ne figurent dans ce nuage que les noyaux en G0-1. La surface est exprimée en nombre de pixels (1 pixel correspond à un point élémentaire de l'image soit $0,16 \mu\text{m}^2$). La densité optique intégrée est exprimée en unités arbitraires.

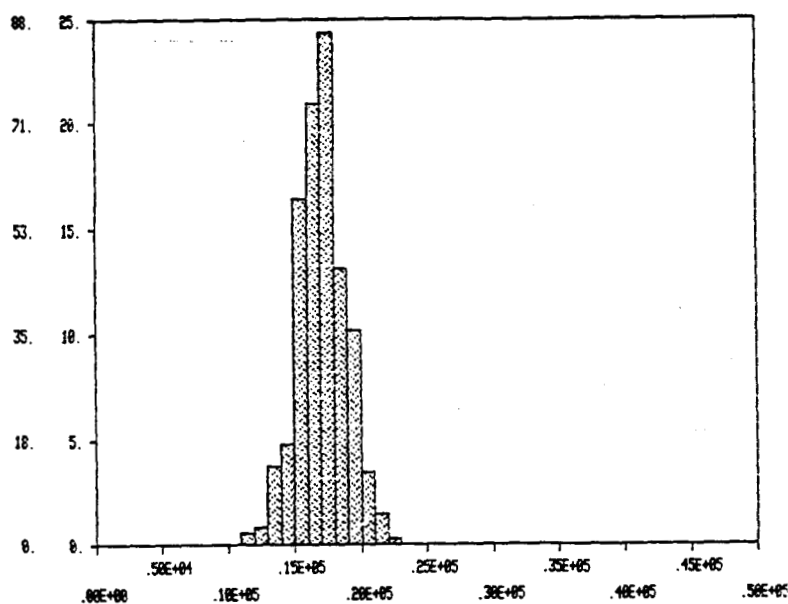


Figure 16 - Histogrammes de fréquences exprimant la teneur en ADN nucléaire des cellules mésodermiques d'un blastème fixé après 4 jours de dénervation se trouvant en phase G0-1. En ordonnée est exprimé le pourcentage de noyaux dans chaque classe. En abscisse est exprimée la densité optique intégrée exprimant la teneur en ADN nucléaire.

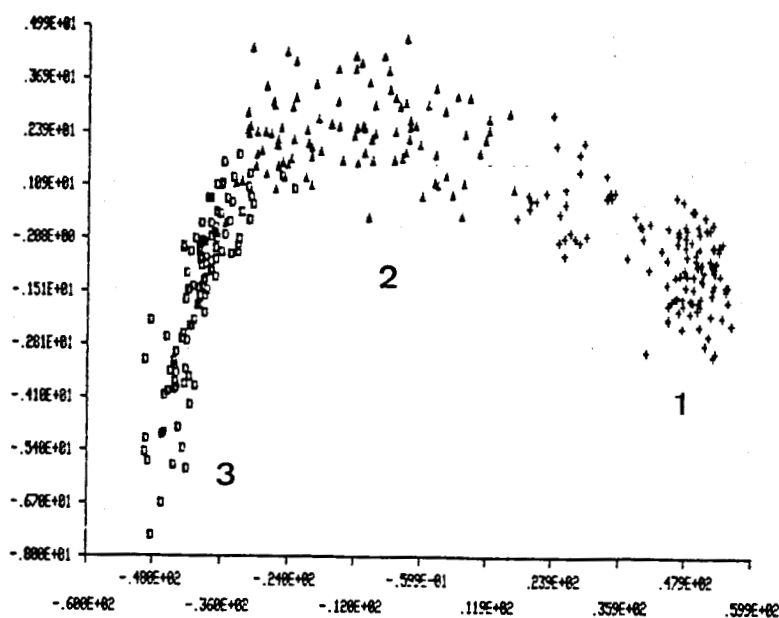


Figure 17 - Représentation sur le plan factoriel de 3 classes définies par l'analyse taxonomique non supervisée à partir des noyaux recensés en G0-1 sur un blastème fixé après 4 jours de dénervation. F1 et F2 représentent respectivement le premier et le second axes factoriels.

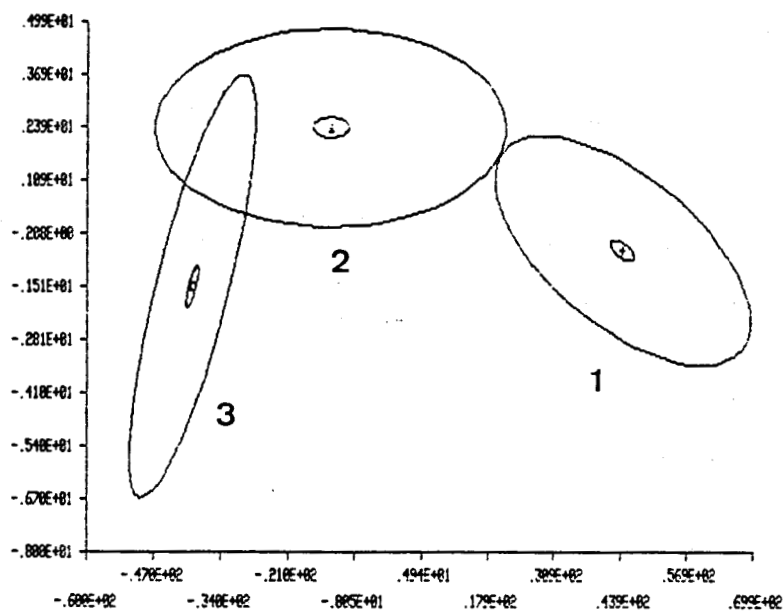


Figure 18 - Représentation sur le plan factoriel de la moyenne (petite ellipse) au risque de 5% et de l'intervalle de tolérance à 95% (grande ellipse) des 3 groupes définis par l'analyse taxonomique non supervisée. F1 et F2 : 1^{er} et 2^{ème} axes factoriels.

La projection des vecteurs représentant les 17 paramètres sur le plan factoriel (fig. 19) montre que le premier axe factoriel est corrélé positivement (de la gauche vers la droite de l'axe) avec la surface, le périmètre et négativement avec la DOM et l'importance des courtes sections. L'observation microscopique des noyaux appartenant à chaque groupe montre que le groupe 3 est caractérisé par des cellules dont les noyaux petits, possèdent une chromatine fortement condensée et une texture grossière, alors que dans le groupe 1 qui s'isole d'ailleurs assez nettement des 2 autres, les noyaux ont des caractéristiques opposées, grand noyau et chromatine fortement décondensée et à texture fine. Le groupe 2 est constitué de cellules dont les noyaux présentent des caractéristiques intermédiaires.

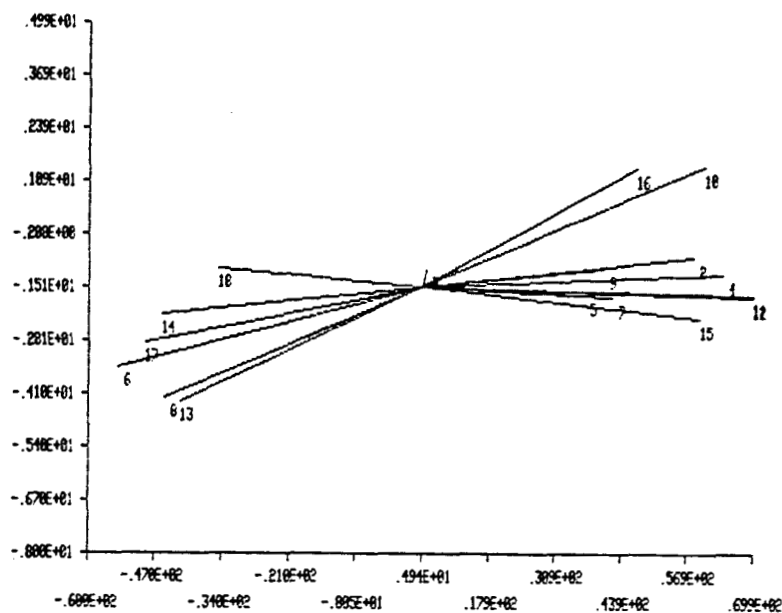


Figure 19 - Projection dans le plan factoriel des 18 paramètres recueillis sur chaque noyau de la population cellulaire. F1 et F2 : 1^{er} et 2^{ème} axes factoriels.

Les 3 classes cellulaires détectées par l'analyse taxonomique non supervisée ont été ensuite soumises à l'analyse discriminante afin d'obtenir la liste des paramètres les plus discriminants ainsi que leur pouvoir de discrimination. Les résultats obtenus sont donnés dans les tableaux 3 et 4. Le tableau 3 représente une matrice de confusion. Les nombres de cellules classées de la même façon par la méthode non supervisée et l'analyse discriminante se trouvent sur la diagonale de la matrice (en gras), alors que ceux répartis ailleurs dans la matrice de confusion représentent les nombres de cellules pour lesquelles les 2 méthodes ne sont pas cohérentes dans les résultats de leur classification. Le pourcentage des cellules bien classées par les 2 méthodes varie entre 95 et 99%. Le faible pourcentage de confusion concerne des cellules appartenant à des classes adjacentes. Il résulte que les 3 classes détectées par la procédure de classification non supervisée sont réelles et homogènes en regard de leurs caractéristiques nucléaires.

	MNS	1	2	3	Nb de cell
AD					
1		121	0	0	121
2		1	96	1	98
3		0	5	100	105
Nb de cell		122	101	101	324

Tableau 3 - Matrice de confusion obtenue en confrontant la méthode d'analyse non supervisée (MNS) et l'analyse discriminante AD

Le tableau 4 présente la liste des paramètres les plus discriminants parmi les 17 mesures effectuées sur chaque noyau.

Ordre	N° paramètre	Pouvoir discriminant
1	11	1846
2	10	126
3	15	8

Tableau 4 - Liste des paramètres les plus discriminants obtenus par l'analyse factorielle discriminante

Les 3 paramètres ayant le pouvoir discriminant le plus élevé sont relatifs à la texture de la chromatine. Ces paramètres mesurent le degré global de condensation de la chromatine et l'uniformité de sa répartition au sein du noyau.

Une analyse discriminante décisionnelle a été effectuée sur des fichiers paramètres provenant de l'analyse de blastèmes témoins (innervés). Les résultats de cette analyse sont reportés dans le tableau 5.

	MNS	1	2	3	Nb de cell
AD					
1		121	0	0	121
2		1	96	1	98
3		0	5	100	105
Te 1	4	433	0	0	433
Te 2	5	431	0	0	431

Tableau 5 - Résultats de l'analyse discriminante décisionnelle réalisés sur les témoins (groupes 4 et 5). Les groupes 1, 2 et 3 ont servi de lots d'apprentissage.

DISCUSSION

La dénervation des membres d'Amphibiens provoque l'arrêt de la régénération lorsque la section des nerfs brachiaux est pratiquée pendant la phase dite de dépendance nerveuse (SINGER et CRAVEN, 1948). Ce blocage de la régénération est dû à une très forte diminution de la prolifération des cellules mésodermique blastémales, de l'ordre de 70 à 75%, 4 jours après la dénervation chez le Pleurodèle (BOILLY et coll, 1985 a). Cet arrêt de la prolifération se traduit par la mise hors cycle de cellules précédemment engagées dans le cycle mitotique. Les résultats que nous avons obtenus par analyse d'images montrent que dans les blastèmes innervés, la proportion de cellules en S + G₂, donc en cycle, est de l'ordre de 18% alors que dans les blastèmes dénervés, cette proportion est de 6% en moyenne. Ces résultats diffèrent quelque peu de ceux antérieurement publiés et obtenus chez le même animal par analyse cytophotométrique classique (OUDKHIR et coll, 1985) notamment en ce qui concerne la population de cellules en S + G₂ des blastèmes innervés (30% contre 18% dans cette présente étude). Par contre, la proportion de cellules en S + G₂ des régénérats dénervés est tout à fait similaire dans ces deux types de travaux (6 contre 5%). Cette différence de résultat peut s'expliquer, non par la différence de technologie mise en oeuvre, mais par le fait que nous avons travaillé sur des animaux adultes alors que les résultats antérieurs avaient été obtenus sur de jeunes animaux âgés de 6 mois à un an. Or, il est bien connu que la vitesse de régénération des animaux adultes est bien plus faible que celle des jeunes animaux. La plus faible proportion de cellules en cycle chez les animaux adultes expliquerait leur plus faible vitesse de régénération. Récemment, GOLDHAMER et TASSAVA (1987) chez le triton, *Notophthalmus viridescens* et TOMLINSON et BARGER (1987) chez *Ambystoma mexicanum* et *maculatum* ont abouti aux mêmes conclusions.

La sortie de cycle des cellules mésodermiques blastémales entraîne donc une accumulation des cellules en G₁-G₀. Le dépôt de collagène dans les blastèmes doit être effectué par des cellules qui ne sont pas engagées de manière active dans le cycle cellulaire. Dans les blastèmes innervés, toutes les cellules ne traversent pas continuellement le cycle cellulaire (GOLDHAMER et TASSAVA, 1987) et les cellules transitoirement quiescentes en phase G₁ (TOMLINSON et coll, 1985, TASSAVA et coll, 1985) pourraient déposer du collagène dans les espaces extracellulaires. Chez les dénervés, l'augmentation importante de cellules quiescentes expliquerait l'important dépôt de collagène observé dans des conditions où la remise en cycle des cellules devient impossible par suite de l'absence de facteur trophique apporté par le système nerveux

(SINGER, 1974, 1978). Le nombre de cellules dans un blastème dénervé au stade jeune cône est insuffisant pour constituer une masse critique à partir de laquelle puisse s'opérer une différenciation comme on peut l'observer dans des blastèmes dénervés à un stade plus tardif (palette) et qui sont alors capables de former un membre normalement constitué mais de petite taille (SINGER et CRAVEN, 1948).

Le devenir des cellules de jeunes blastèmes dénervés est donc de sortir du cycle puis de s'engager dans la phase G₀.

Cette phase particulière est caractéristique des cellules quiescentes à potentialités alternatives, ou ces cellules retournent dans le cycle (cas des cellules souches), ou ces cellules s'engagent dans un processus de différenciation ou de sénescence (G₀ profond). Selon que ces noyaux en G₀ profond appartiennent à des cellules métaboliquement actives ou inactives, la structure de la chromatine sera fondamentalement différente. Des cellules fortement différenciées et incapables à jamais de se diviser mais métaboliquement actives comme les neurones par exemple, possèdent un noyau (G₀ profond) dont la chromatine fine et dispersée, à caractère euchromatinien, révèle une intense activité de synthèse d'ARN. Par contre, des cellules (G₀) métaboliquement inactive comme les chondrocytes âgés par exemple (JEANNY, 1980 ; JEANNY et GONTCHAROFF, 1978 a, b) présentent un noyau à chromatine fortement condensée, très hétérochromatinien, signes d'une cessation d'activité métabolique.

L'analyseur d'images SAMBA nous a permis de distinguer, au sein de la population de cellules issues de blastèmes dénervés, des cellules ayant une quantité d'ADN égale à 2C (G₁ + G₀), 3 populations sur des critères de texture chromatinienne. L'analyse cytologique des noyaux appartenant à ces 3 groupes au moment de leur création par l'analyseur, nous a permis de constater que les noyaux appartenant au groupe 1 possèdent une grande taille et une chromatine peu condensée et dispersée, alors que les noyaux appartenant au groupe 3 ont des caractéristiques diamétralement opposées.

La projection sur le plan factoriel des vecteurs correspondant aux différents paramètres utilisés lors de l'analyse confirme tout à fait ces observations microscopiques puisque l'axe des abscisses est corrélé positivement avec la surface et négativement avec la densité optique moyenne qui traduit la concentration d'ADN nucléaire, et l'importance des courtes sections qui traduit la fréquence des faibles condensations de chromatine. Autrement dit, les noyaux du groupe 1 situé à droite de l'axe des X doivent avoir, selon la projection vectorielle des paramètres sur l'axe des X, une grande surface et une faible

condensation de chromatine, ce qui est vérifié par l'observation cytologique en temps réel lors de la création des groupes.

Compte-tenu de ces observations, nous pouvons avancer l'hypothèse que le groupe 1 est constitué de noyaux en phase G₁ (rappelons que le blastème que nous avons utilisé pour cette analyse possédait encore 4,1% de noyaux en phase S + G₂, il est donc logique de retrouver des phases G₁). Ce groupe est constitué (fig. 17) d'un premier ensemble très fortement regroupé sur le plan factoriel, possédant donc des caractéristiques très voisines, et d'un second ensemble beaucoup plus lâche faisant la transition avec le groupe 2. Ce groupe 2 serait constitué des cellules sorties du cycle en phase G₀. Enfin le groupe 3 correspondrait aux cellules en voie de dégénérescence puisque, nous l'avons déjà expliqué, incapables de se différencier compte-tenu du nombre trop faible de cellules présentes dans un jeune blastème. Ces noyaux, petits et denses correspondent à des phases G₀ profond engagé dans le processus de la mort cellulaire. Ces noyaux ont été rencontrés dans les observations ultrastructurales (Pl. III), histologiques (Pl. VII, fig. f) et autoradiographiques (Pl. VII, fig. c et d). Selon l'analyse discriminante, les noyaux appartenant aux blastèmes témoins se classent dans le groupe 1 ce qui semble conforter l'hypothèse que nous avons émise à savoir que le groupe 1 rassemble essentiellement les noyaux en phase G₁.

Les cellules du groupe 2 correspondent probablement à celles qui synthétisent le collagène. Nous avons vu que, ultrastructuralement, les cellules qui sécrètent le collagène ont toutes les caractéristiques des cellules communes, noyau à mottes de chromatine bien différencié, ergastoplasme bien développé. En aucun cas ces cellules ne correspondent aux cellules "pâles" décrites pour la première fois par BRYANT et coll (1971). Ces cellules que nous avons rencontrées en faible proportion ne possèdent aucune des caractéristiques permettant de leur attribuer un rôle dans la synthèse de collagène. Leur origine et leur rôle restent énigmatiques. Il avait été avancé que ces cellules pouvaient représenter les cellules sortant du cycle après la dénervation (BOILLY et coll, 1985 b). Cependant, le fait qu'après 4 jours en présence de thymidine ³H, ces cellules puissent encore incorporer ce précurseur dans leur ADN, ne plaide pas en faveur de cette hypothèse.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'ensemble de nos résultats nous a permis d'appréhender une population cellulaire au sein des régénérats du triton *Pleurodeles waltlii* comme étant responsable de la synthèse du collagène, molécule essentielle de la matrice extracellulaire. Ce pool de cellules correspond à des cellules qui quittent le cycle cellulaire et entrent en G₀ dans les régénérats dénervés et probablement à des cellules en phase G₁ très allongée dans les régénérats innervés (GOLDHAMER, 1987). Cette sortie de cycle se traduit par une augmentation de la quantité de collagène déposée au sein des blastèmes de régénération. On peut par ailleurs, compte-tenu de nos résultats ultrastructuraux, raisonnablement considérer que les cellules communes sont celles qui parmi la population mésodermique blastémale synthétisent de manière accrue le collagène. Dans ces conditions, reste posé le rôle des cellules pâles que BRYANT considérait comme des formes de dégénérescence des cellules communes.

Une étude cytochimique permettant de détecter d'éventuelles activités enzymatiques cellulaires (phosphatases...) pourrait peut-être permettre de résoudre ce problème.

Quoiqu'il en soit, en l'absence d'informations nerveuses, le massif mésodermique des blastèmes de régénération s'engage dans un processus de différenciation se traduisant par un dépôt important de collagène. Nous avons obtenu des résultats similaires mais beaucoup plus rapidement *in vitro*, ceci lorsque l'on prive le massif mésodermique à la fois d'informations nerveuses et de sa cape épidermique. En effet, des explants privés de leur cape épidermique différencient *in vitro* des nodules cartilagineux (GLOBUS et coll 1980) dont on sait qu'ils correspondent à un dépôt de cartilage autour des chondrocytes, donc de collagène de type II. La matrice obtenue dans nos cultures n'est en aucun cas du cartilage. Des études immunocytochimiques devraient nous permettre de préciser le type de collagène qui se dépose dans ces conditions. Il serait de plus intéressant de reprendre cette étude *in vitro* en présence de système nerveux (ganglion) afin de préciser le rôle dévolu à l'épiderme et/ou au système nerveux sur le dépôt de collagène.

RESUME

RESUME

Les processus régénératifs qui se mettent en place à la suite de l'amputation d'un membre du triton *Pleurodeles waltlii* sont sous l'étroite dépendance du système nerveux. La dénervation d'un membre dont le régénérat a atteint le stade jeune cône se traduit entre autres par la mise en place d'une matrice extracellulaire collagénique dense. Nous avons analysé quantitativement et qualitativement la formation de collagène en présence ou en l'absence du système nerveux, et d'autre part tenté de préciser l'évolution des cellules blastémales dans les mêmes conditions après caractérisation morphologique et cytophotométrique.

L'étude ultrastructurale des régénérats innervés ou fixés après 4 jours de dénervation a révélé l'existence d'une population mésodermique hétérogène composée de 3 grands types de cellules. Un premier type cellulaire caractérisé par des cellules à l'allure de fibroblaste, en relation étroite avec la matrice collagénique, appelée cellules communes, et dont le cytoplasme renferme un abondant ergastoplasme. Un second type cellulaire caractérisé par des cellules dont le cytoplasme est beaucoup moins contrasté, puisque pauvre en ergastoplasme ce qui leur a valu le nom de cellules pâles. Un troisième type cellulaire de type phagocytaire caractérisé par des cellules présentant de nombreux filopodes et de nombreuses vacuoles de phagocytose. Nos observations ne nous ont pas permis de retrouver des changements dans la distribution de ces différentes catégories de cellules blastémales après la dénervation. Cependant les régénérats dénervés renferment une population non négligeable de cellules apparaissant comme engagés dans une voie de dégénérescence.

Ces résultats ont été complétés par une étude visant à quantifier le dépôt matriciel au sein du massif mésodermique des blastèmes de régénération. Nous avons à cette fin, utiliser une méthode colorimétrique basée sur un colorant, le rouge Sirius dont nous avons au préalable vérifié la spécificité vis à vis du collagène. Nous avons pu ainsi doser les effets de la dénervation sur le métabolisme de cette molécule. Deux techniques différentes ont été utilisées : l'une consistant en un dosage biochimique, l'autre faisant appel à l'analyse d'image. Les résultats biochimiques montrent que les blastèmes obtenus sur des animaux adultes et fixés après 4 jours de dénervation accumulent de manière significative plus de collagène (+57%) que ceux fixés dès le début de l'expérience et ayant atteint le stade jeune cône. Il n'apparaît par contre aucune différence significative entre les blastèmes évoluant normalement depuis le début de

l'expérience et ayant atteint le stade jeune palette et les blastèmes dénervés. Les résultats d'analyse d'image ont également permis de constater que la quantité de collagène déposée dans les explants dénervés est beaucoup plus importante que celle déposée dans les explants témoins. On enregistre respectivement une augmentation de 198% et de 155% dans les deux séries d'expériences. Cette étude quantitative a été complétée par une étude qualitative dont le but était d'identifier et de localiser en utilisant des techniques immunocytochimiques, les différents types de collagène. Nos résultats montrent que les régénérats dénervés synthétisent en grande quantité par rapport aux témoins, du collagène de type I et de type IV. Le collagène I est retrouvé dans les espaces intercellulaires du massif mésodermique. Le dépôt de collagène IV se traduit par la mise en place chez les dénervés d'une épaisse lame basale à la jonction épidermo-mésodermique.

La dernière partie de ce travail a consisté à préciser le ou les types cellulaires responsables de la synthèse accrue de collagène chez les dénervés. Cette synthèse a été suivie par incorporation de proline ^3H . Une étude autoradiographique menée sur des écrasements tissulaires a révélé une catégorie de cellules n'incorporant pas ce précurseur du collagène. Ces cellules ont un noyau beaucoup plus petit que les autres à chromatine fortement condensée. Par ailleurs, l'étude menée par analyse d'images sur les cellules engagées en G_0-1 du cycle a permis de répartir les noyaux en 3 groupes. Le premier de ces groupes correspondrait à des cellules en phase G_1 , le deuxième à des cellules engagées dans la synthèse du collagène, le troisième à des cellules en voie de dégénérescence.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- BAILEY AJ, LIGHT ND, ATKINS EDT (1980). Chemical cross-linking restrictions on models for the molecular organization of the collagen fibre. *Nature*, **288**, 408-410
- BARD S, SENDEL P (1984). Reconstitution of the epidermal basement membrane after enzymatic dermal-epidermal separation of embryonic mouse skin. *Arch Anat Microsc*, **53**, 239-257
- BOILLY B, OUDKHIR M, LASSALLE B (1985 a). Rôle du système nerveux sur la prolifération cellulaire des blastèmes de régénération du membre de triton (*Pleurodeles waltlii* Michah.). *Develop Growth and Differ*, **27**, 129-139
- BOILLY B, OUDKHIR M, LASSALLE B (1985 b). Control of the blastemal cell cycle by the peripheral nervous system during newt limb regeneration ; continuous labeling analysis. *Biol Cell*, **55**, 107-112
- BRUGAL G (1985). SAMBA 200 : Système d'analyse microphotométrique à balayage automatique. *Tech Sci Inform*, **4**, 289-295
- BRYANT SV, FYFE D, SINGER M (1971). The effects of denervation on the ultrastructure of young limb regenerates in the newt, *Triturus*. *Dev Biol*, **24**, 577-595
- DRESDEN MH (1969). Denervation effects on newt limb regeneration. DNA, RNA and protein synthesis. *Dev Biol*, **19**, 311-320
- EL MARAGHI H (1983). Evolution de la matrice intercellulaire des blastèmes de régénération de triton après dénervation. DEA Lille
- EMPTOZ H, TERRENOIRE M, TOUNISSOUX D (1978). Indetermination measure for a sequential identification process. *Proc 4th Inter Conf Pattern Recogn*, 262-264
- FEULGEN R, ROSSENBECK H (1924). Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleisäure von Types der Thymonucleinsäure und die Daraus Beruhende elective Färbung von Zellkernen in Mikroskopischen Präparaten. *Z Physiol Chem*, **135**, 203-248
- GERAUDIE J, SINGER M (1978). Nerve dependent macromolecular synthesis in the epidermis and blastema of the adult newt regenerate. *J Exp Zool*, **203**, 455-460
- GIROUD F (1982). Cell nucleus pattern analysis : geometric and densitometric featuring. Automatic cell phase identification. *Biol Cell*, **44**, 177-188

- GLOBUS M, VETHAMANY-GLOBUS S, LEE YCJ (1980). Effect of apical epidermal cap on mitotic cycle and cartilage differentiation in regeneration blastemata in the newt, *Nothophthalmus viridescens*. *Dev Biol*, **75**, 358-372
- GOLDHAMER DJ, TASSAVA RA (1987). An analysis of proliferative activity in innervated and denervated forelimb regenerates of the newt, *Notophthalmus viridescens*. *Development*, **100**, 619-628
- GRANT ME, PROCKOP JD (1972). The biosynthesis of collagen. *New England J Med*, **286**, 291-300
- GROSS J, HIGHBERGER JH, SCHMITT FO (1954). d'après HAY (1981)
- HAY ED (1981). Extracellular matrix. *J Cell Biol*, **91**, 205s-223s
- HAY ED, DODSON JW (1973). Secretion of collagen by corneal epithelium. I. Morphology of the collagenous products produced by isolated epithelia grown on frozen-killed lens. *J Cell Biol*, **57**, 190-213
- JEANNY JC (1980). Utilisation des caractéristiques morphométriques et densitométriques des noyaux en vue de l'identification et du dénombrement des cellules cartilagineuses en G₀ et G₁ au cours du vieillissement et de la régénération chez *Triturus cristatus*. *Biol Cell*, **39**, 305-315
- JEANNY JC, GONTCHAROFF M (1978 a). Etude en microscopie électronique et par cytophotométrie à balayage de la structure et de la distribution de la chromatine dans les noyaux des cellules cartilagineuses de *Triturus cristatus* au cours de sénescence. *Biol Cell*, **32**, 233-243
- JEANNY JC, GONTCHAROFF M (1978 b). Etude en microscopie électronique et par cytophotométrie à balayage de la structure et de la distribution de la chromatine dans les noyaux des cellules cartilagineuses de *Triturus cristatus* âgés au de la régénération. *Roux's Arch Dev Biol*, **184**, 195-211
- JUNQUEIRA LCU, BIGNOLAS G, BRENTANI RR (1979 a). A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen. *Anal Biochem*, **94**, 96-99
- JUNQUEIRA LCU, BIGNOLAS G, BRENTANI RR (1979 b). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*, **11**, 447-455
- LASSALLE B (1983) DNA synthesis and cellular proliferation in cultured newt blastemas. *Limb Development and Regeneration*. Part A, 547-555
- LEBOWITZ P, SINGER M (1970). Neurotrophic control of protein synthesis in the regenerating limb of the newt. *Nature*, **225**, 824-827

- LESOT H, OSMAN M, RUCH JV (1981). Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. *Dev Biol*, **82**, 371-381
- MAILMAN ML, DRESDEN MH (1979). Denervation effects on net limb regeneration: collagen and collagenase. *Dev Biol*, **71**, 60-70
- NORMAN WP, SCHMIDT AJ (1967). The fine structure of tissues in the amputated-regenerating limb of the adult newt, *Diemictylus viridescens*. *J Morphol*, **123**, 271-312
- OLSEN BR (1981). Cell Biology of Extracellular Matrix. Hay ED Ed, Plenum Press pp 97-116
- OUDKHIR M, BOILLY B, LHEUREUX E, LASSALLE B (1985). Influence of denervation on the regeneration of Pleurodele limbs. Cytophotometric study of nuclear DNA from blastemal cells. *Differentiation*, **29**, 116-120
- PIERAGGI MTH, BOUISSOU H, ANGELIER C, UHART D, MAGNOL JP, KOKOLO J (1985). Le fibroblaste. *Ann Pathol*, **5**, 65-76
- PIEZ KA, LIKINS RC (1960). The nature of collagen . II. Vertebrate collagens in "Calcification in Biological Systems". American Association for the Advancement of Sciences, Washington, pp 411-420
- REYNOLDS ES (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*, **17**, 208-212
- REVARDEL JL (1986). Influence de l'épithélium cicatriciel, de la collagénase et de l'hormone de croissance sur la croissance des régénérats de doigts chez *Rana ridibunda* adulte. *Can J Zool*, **64**, 2690-2695
- REVARDEL JL, CHAPRON C (1984). Mise en évidence au cours de la régénération des Urodèles d'une influence différenciatrice de l'épithélium cicatriciel (étude chez la larve de *Salamandra salamandra*). *C R Acad Sci*, **299**, 671-676
- REVARDEL JL, AOUSSI S, CHAPRON C (1986). Action d'extraits d'épithélium cicatriciel sur la régénération des doigts chez *Rana ridibunda* adulte : étude histologique et biométrique. *Can J Zool*, **64**, 2683-2689
- REVEL JP, HAY ED (1963). An autoradiographic and electron microscopic study of collagen synthesis in differentiating cartilage. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, **61**, 110-144
- RISTELLI L, MYLLILA R, KIVIRIKKO KI (1976). Partial purification and characterization of collagen galactosyltransferase from chick embryos. *Biochem J*, **155**, 145-153

- ROSS R, BENDITT EP (1965). Wound healing and collagen formation. V. Quantitative electron microscope radioautographic observations. Proline-³H utilization by fibroblasts. *J Cell Biol*, **27**, 83-106
- SALPETER MM, SINGER M (1960). The fine structure of mesenchymatous cells in the regenerating forelimb of the adult newt *Triturus*. *Dev Biol*, **2**, 516-534
- SINGER M (1974). Neurotrophic control of limb regeneration in the newt. *Ann NY Acad Sci*, **228**, 308-322
- SINGER (1978). On the nature of the neurotrophic phenomenon in Urodele limb regeneration. *Amer Zool*, **18**, 829-841
- SINGER M, CASTON JD (1972). Neurotrophic dependence of macromolecule synthesis in the early limb regenerate of the newt, *Triturus*. *J Embryol Exp Morphol*, **28**, 1-11
- SINGER M, CRAVEN L (1948). The growth and morphogenesis of the regeneration forelimb of adult *Triturus* following denervation at various stages of development. *J Exp Zool*, **108**, 279-308
- TASSAVA RA, LAUX DL, TREECE DP (1985). The effects of partial and complete denervation on adult newt forelimb blastema cell cycle parameters. *Differentiation*, **29**, 121-126
- TERRENOIRE, TOUNISSOUX D (1979). Processus non arborescent pour la reconnaissance d'une variable continue. 2^{ème} Congrès AFCET-IRIA. Reconnaissance des formes et intelligence artificielle. Toulouse, T2, 410-417
- TOMLINSON BL, BARGER PM (1987). A test of the punctuated-cycling hypothesis in *Ambystoma* forelimb regenerates : the roles of animal size, limb innervation, and the aneurogenic condition. *Differentiation*, **35**, 6-15
- TOMLINSON BL, GOLDHAMER DJ, BARGER PM, TASSAVA RA (1985). Punctuated cell cycling in the regeneration blastema of urodele amphibians: An hypothesis. *Differentiation*, **28**, 195-199
- TRELSTAD RL (1981). Le collagène. *La recherche*, **120**, 312-321
- TRELSTAD RL, HAYASHI K (1979). Tendon collagen fibrillogenesis: intracellular subassemblies and cell surface changes associated with fibril growth. *Dev Biol*, **71**, 228-242
- WALLACE H (1981). Vertebrate limb regeneration. Ed John Wiley and Sons



WEINSTOCK M, LEBLOND CP (1974). Synthesis, migration and release of precursor collagen by odontoblasts as visualized by radioautography after 3H-proline administration. *J Cell Biol*, 60, 92-127

RESUME

Les processus régénératifs qui se mettent en place à la suite de l'amputation d'un membre de triton *Pleurodeles waltlii* sont sous l'étroite dépendance du système nerveux. La dénervation d'un membre dont le régénérat atteint le stade jeune cône se traduit par la mise en place d'une matrice dense au sein du massif mésodermique blastémal. Nous avons donc étudié l'effet de la dénervation sur le dépôt collagénique au sein de cette matrice en utilisant un colorant spécifique du collagène, le rouge Sirius. Des régénérats prélevés sur des animaux adultes 4 jours après la dénervation accumulent plus de collagène (+54%) que des régénérats prélevés avant la dénervation. Une étude morphométrique parallèle menée sur un analyseur d'image aboutit à des résultats similaires. Les blastèmes prélevés sur des membres dénervés accumulent beaucoup plus de collagène que les blastèmes prélevés sur des membres innervés (+198% ; +155%). La distribution des collagènes de type I, III et IV a été étudiée avant et après dénervation à l'aide de techniques immunocytochimiques. Les résultats montrent que l'accumulation de collagène dans les régénérats dénervés concerne les types I et IV. La membrane basale est beaucoup plus épaisse dans les régénérats dénervés. L'étude ultrastructurale, menée sur les régénérats innervés et dénervés révèle 3 types cellulaires : les cellules communes, les cellules pâles et les cellules phagocytaires. Par ailleurs, une étude cytophotométrique par l'analyse d'image réalisée sur les cellules issues de blastèmes dénervés et ayant une quantité d'ADN égale à $2C$ (G_1+G_0) nous a permis de distinguer 3 populations sur des critères de texture chromatinienne. La première correspondrait à des cellules en G_1 . La seconde serait constituée de cellules sorties du cycle en phase G_0 et synthétisant activement le collagène. La troisième correspondrait aux cellules en G_0 profond engagé dans le processus de la mort cellulaire. Ces noyaux ont été rencontrés dans les observations ultrastructurales, histologiques et autoradiographiques.