

50376  
1989  
205

50376  
1989  
205

N° d'Ordre : 446

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE  
FLANDRES-ARTOIS

THESE  
DE  
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE

présentée par :

**Ignace MAFOUMBI-NZENGUI**

en vue de l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**



**ROLE DU SYSTEME NERVEUX DANS LA CROISSANCE,  
L'ORGANOGENESE ET LA REGENERATION DU MEMBRE DE  
PLEURODELES WALTL. (AMPHIBIEN URODELE).**

Soutenue le 8 décembre 1989 devant le jury :

Président et Rapporteur	: M. B. BOILLY
Rapporteur	: M. A. COLLENOT
Directeur de Thèse	: M. A. CAPURON
Examineurs	: Mme J. GERAUDIE
	: M. E. LHEUREUX



UNIVERSITE DES SCIENCES  
ET TECHNIQUES DE LILLE  
FLANDRES ARTOIS

---

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

M. H. LEFEBVRE, M. PARKEAU.

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. FOUKET René	Physique du solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNELLE Jean Pierre	Chimie-Physique
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie-Physique
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DHAINAUT André	Biologie animale
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GRANELLE Jean jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LEROY Jean Marie	Spectrochimie
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBAKD 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. SEQUIER 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 Kadyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. ALLAMANDO Etienne	Composants électroniques
M. ANDRIES Jean Claude	Biologie des organismes
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BAKI André	Biologie animale
M. BASSERY Louis	Géne 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. BOVIN 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. CATTÉAU 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	Psychophysiology
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. DORNARD Serge	Sciences Economiques
M. DUFOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRILLE 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 Rami	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GOURIEROUX Christian	Probabilités et statistiques
M. GREGORY Pierre	I.A.E.
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrice	Sciences Economiques
M. GRIMBLOT Jean	Chimie organique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.A.E.)
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEBVRE Jacques	Physique
M. LEFEBVRE Christian	Pétrologie
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. NESMACQUE Gérard	Génie Mécanique
M. NESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MORCELLET Michel	Chimie organique
M. NORTREUX 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

Je tiens à remercier vivement le Professeur A. CAPURON de l'Université de LILLE I qui m'a accueilli dans son laboratoire et n'a cessé, au cours de toutes ces années, non seulement de m'encourager, de me faciliter le travail, mais surtout de m'enrichir par son expérience personnelle et ses conseils précieux. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur B. BOILLY m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse, qu'il trouve ici l'expression de ma considération.

Mes sincères remerciements à Monsieur A. COLLENOT, Professeur à l'Université de PARIS VI, qui, malgré ses multiples occupations, a bien voulu juger ce travail.

Madame J. GERAUDIE, Maître de Conférence à l'Université de PARIS VII a accepté d'examiner ma thèse. Je suis heureux de pouvoir profiter de ses compétences et je la remercie respectueusement.

Que Monsieur E. LHEUREUX, Maître de Conférence à l'Université de LILLE I, me voit particulièrement touché par sa grande disponibilité et l'intérêt qu'il a porté à mon travail. Je lui exprime ma sincère gratitude.

Je tiens également à remercier Madame LALOUX pour la qualité de la dactylographie et sa disponibilité, Madame ANDRIES pour l'aide technique, Madame LYOEN et Monsieur CHUIN pour l'élevage des animaux ; Madame AUGER et Monsieur LAZARECKI pour les reproductions photographiques ainsi que tous ceux qui, par leurs conseils, aides et encouragements, ont permis la réalisation de ce travail.

Que ce travail soit aussi le témoignage de ma reconnaissance à ma mère, à ma femme, et dédié à la mémoire de mon père.

INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODES	6
I - MATERIEL BIOLOGIQUE	7
II - METHODES	8
A - Cultures	
1. Bourgeons des membres antérieurs	
a) Prélèvement	
b) Conditions de culture	
2. Secteurs du champ de membre	9
a) Prélèvement des secteurs dorsaux	
b) Conditions de culture	10
3. Co-culture bourgeons-tissus nerveux	10
a) Prélèvement des explants	
b) Conditions de co-culture	
B - Réalisation et élevage des animaux aneurogéniques	11
1. Technique de fabrication et mise en parabiose	
2. Prélèvement des bourgeons	12
C - Techniques histologiques	12
1. Traitements et colorations des bourgeons issus des cultures et des co-cultures	
2. Traitements et colorations des membres d'animaux en parabiose	
D - Technique immunohistochimique	13
1. Principe de la réaction	
2. Sérums utilisés	
3. Protocole expérimental	13
a) Incubation avec les sérums	
b) Révélation et observation	14
E - Technique biochimique	14
1. Mesure de l'incorporation de la radioactivité	
2. Dosage des protéines	15
F - Expression des résultats	
1. Mesure de l'activité prolifératrice	
a) Mesure de la synthèse d'ADN	
b) Mesure de l'indice mitotique	



2. Analyses quantitatives des structures différenciées des membres d'animaux en parabiose	16
3. Test statistique	

**CHAPITRE I : EFFET D'UN FACTEUR DE CROISSANCE D'ORIGINE  
NERVEUSE, LE B.D.G.F. I, SUR LA CROISSANCE DES BOURGEONS  
DE MEMBRES EN CULTURE** 17

<b>I - INTRODUCTION</b>	18
<b>II - METHODOLOGIE</b>	19
<b>III - RESULTATS</b>	20
A - Synthèse d'ADN	
B - Indice mitotique	22
<b>IV - DISCUSSION</b>	25
A - Comparaison de l'effet du BDGF I à différentes concentrations sur les bourgeons cultivés	25
B - Comparaison de l'effet du BDGF I par rapport aux bourgeons restés <i>in vivo</i>	27
<b>V - CONCLUSION</b>	27

**CHAPITRE II - ROLE DU SYSTEME NERVEUX SUR LE DEVELOPPEMENT  
ET LA CROISSANCE DES BOURGEONS EN CULTURE.** 28

<b>I - INTRODUCTION</b>	29
<b>II - CULTURE DES SECTEURS DORSAUX RENFERMANT LE CHAMP DU MEMBRE</b>	30
A - Méthodologie	
B - Résultats et discussion	32
<b>III - CO-CULTURE BOURGEON DE MEMBRE-TISSUS NERVEUX</b>	33
A - Méthodologie	33
B - Résultats	34
1. Co-culture bourgeon-moelle épinière	34
a) Evolution de la synthèse d'ADN	
b) Evolution de l'indice mitotique	36
2. Co-culture bourgeon-cerveau de larve	39
C - Discussion	40

<b>IV - CONCLUSION</b>	41
<b>CHAPITRE III - EFFET DE L'ENVIRONNEMENT ANEUROGENIQUE SUR LA CROISSANCE ET LA REGENERATION DU MEMBRE</b>	42
<b>I - INTRODUCTION</b>	43
<b>II - METHODOLOGIE : Mise au point du protocole opératoire</b>	44
<b>III - RESULTATS</b>	47
A - Evolution morphologique des parabioses	47
B - Observations histologiques	48
C - Indice mitotique des jeunes bourgeons de membres	50
D - Croissance comparée des muscles brachiaux et de l'humérus d'animaux innervés et aneurogéniques	51
1. Etude d'un seul échantillon par stade	51
2. Etude d'un ensemble d'échantillons par stade	59
E - Régénération	68
<b>IV - DISCUSSION ET CONCLUSION</b>	74
A - Obtention des véritables aneurogéniques	74
B - Croissance des membres	75
C - Régénération	76
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES</b>	78
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	

## **INTRODUCTION GENERALE**

## INTRODUCTION GENERALE

Les premiers travaux sur les mécanismes du développement de membres d'Urodèles, qui furent d'ailleurs les premiers travaux sur la morphogénèse des membres des Vertébrés Tétrapodes, ont été effectués dans la première moitié de ce siècle sur *Ambystoma punctatum*, *A. mexicanum*, *A. Tigrirum*, *Triturus taeniatus*, *T. cristatus*, *T. pyrrhogaster* et *Hyrobilus sp.* par FILATOW (1928), STEINER (1928), ROTMAN (1931 ; 1933), BALINSKY (1931 ; 1935) et revus par BRYANT et ITEN (1976).

Après la démonstration par SAUNDERS (1948) du rôle de l'épiderme apical du bourgeon d'aile de poulet dans l'établissement de la séquence proximo-distale des différents segments, l'étude de la morphogénèse des membres des Urodèles fut pratiquement abandonnée au profit de celle du poulet et des autres Tétrapodes.

Il est généralement admis, à la suite de ces travaux chez le poulet, que le développement des membres des Tétrapodes résulte d'interactions complexes et réciproques entre le mésenchyme et l'épiderme (revue par AMPRINO, 1984). Ce terme de développement recouvre tout un ensemble de processus où il n'est pas fait de distinction nette entre croissance et différenciation. En fait, le bourgeon s'accroît rapidement par multiplication cellulaire à son extrémité distale tandis que les premiers signes de différenciation apparaissent à l'extrémité proximale sous la forme de cartilage.

Dans le cas des Urodèles, qui feront l'objet de nos recherches, ce n'est qu'après une dizaine d'années et à la lumière des résultats apportés par les travaux faits chez le poulet et le xénope que les investigations concernant la morphogénèse de membres ont été reprises par quelques auteurs. LAUTHIER (1970, 1980), BOURGEOIS et HOUBEN (1975), BOURGEOIS (1977), chez le Pleurodèle ; STURDEE et CONNOCK (1975) chez *Triturus vulgaris* et *T. cristatus* ; TANK et coll. (1977) chez *Ambystoma mexicanum* et SLACK (1976, 1980) chez le Pleurodèle et chez *Ambystoma mexicanum*. Dès son apparition, au stade 33 de la table de développement de GALLIEN et DUROCHER (1957), le bourgeon de membre de Pleurodèle, matériel utilisé dans ce travail, a deux composantes : un massif de cellules mésenchymateuses enveloppé d'un épithélium épidermique ; les trois jours suivants, du stade 33 au stade 36, le bourgeon croît sans qu'apparaissent des signes de différenciation. On dispose ainsi d'un système embryonnaire favorable à l'étude de la croissance.

Cependant, LAUTHIER (1982) a démontré l'absence de certaines particularités morphologiques telles que la crête apicale ectodermique, le sinus marginal dans le mésoderme apical de bourgeons des Urodèles par rapport à ceux des amniotes. Les arguments expérimentaux en

faveur de l'existence d'interactions entre le mésoderme des bourgeons et leur revêtement épithélial apical semblent être en défaut dans le cas des Urodèles ; ce qui impliquerait, toujours selon LAUTHIER (1982), que l'épiderme nécessaire au développement du membre n'exercerait que le rôle d'une couche enveloppante s'adaptant aux transformations du mésoderme ; ce dernier posséderait à lui seul toutes les potentialités pour former un membre harmonieux et complet. Nous ne discuterons pas, dans ce présent travail, de l'existence ou non de la crête apicale épidermique chez les Urodèles, ni de son rôle dans la morphogenèse, plusieurs auteurs en ont déjà fait état (TARIN et STURDEE, 1971 ; LAUTHIER, 1982).

Même si l'ectoderme apical des membres des Urodèles n'a pas de rôle morphogénétique évident, il semble intervenir dans la croissance. C'est pourquoi, nous avons pris comme outil de travail le bourgeon de membre de Pleurodèle en conservant ses deux constituants principaux.

Outre ces éléments, on peut s'interroger sur la participation du système nerveux au développement du bourgeon de membre, comme l'ont fait de nombreux biologistes. Leurs travaux ont essentiellement porté sur l'importance des nerfs dans la différenciation du membre normal (HAMBURGER, 1928 ; HAMBURGER et WAUCH, 1940 ; HARRISON, 1907 ; STRECKER et STEPHENS, 1983 ; revue par DIETZ, 1987). Cependant, le rôle du système nerveux sur la croissance a surtout été montré sur la régénération du membre d'Amphibien. Depuis la publication du mémoire de TODD (1823), le rôle du système nerveux dans les processus de régénération de membre a été reconnu. Plusieurs ouvrages ont été consacrés à ce problème (SINGER, 1952 ; revue par WALLACE, 1981 ; revue par SICARD, 1985). A la suite d'une série d'expériences, SINGER (1952) a établi une relation quantitative étroite entre la présence des fibres nerveuses périphériques dans un membre d'Amphibien et la capacité de ce membre à régénérer après amputation. Entre un tiers et la moitié des nerfs du membre normal est nécessaire pour que la régénération se fasse. Dès lors, le rôle trophique du système nerveux sur la régénération du membre adulte est devenu un fait bien établi ; cependant, le ou les agents neurotrophiques sont toujours mal connus. Des substances aux propriétés trophiques ont été isolées à partir des broyats de nerfs périphériques, de moelle épinière ou de broyats d'encéphale (revue par GERAUDIE et SINGER, 1984 ; BOILLY et ALBERT, 1988a,b). Ces substances ont en commun la propriété de promouvoir *in vitro* la prolifération des cellules nerveuses ou non nerveuses. Cette propriété n'est d'ailleurs pas propre aux tissus nerveux (JABAILY et SINGER, 1978 ; MESCHER et LOH, 1981).

Bien que l'agent neurotrophique soit encore mal connu, on suppose que c'est une protéine synthétisée au niveau du corps cellulaire des neurones, véhiculée vers l'extrémité des axones par le flux axoplasmique rapide où elle est déversée sur les tissus cibles (SINGER et CASTON, 1972). En outre, ce facteur agirait d'abord sur le neurone lui-même afin qu'il assure son intégrité fonctionnelle, sa croissance et les remaniements éventuels dont il est le siège dans le cadre du processus de plasticité neuronale. L'excédent de cette substance trophique pourrait exercer son action sur les cellules de blastèmes et diriger ainsi leur métabolisme dans les premières phases de régénération (revue par GERAUDIE et SINGER, 1984). Selon SINGER (1978), elle interviendrait

dans le contrôle du niveau des synthèses macromoléculaires plutôt que dans celui de la qualité de ces synthèses. Secondairement, cette conception neurotrophique de la régénération a dû être modifiée pour rendre compte des constatations faites en premier lieu par YNTEMA (1959a). Celui-ci avait en effet obtenu chez l'Axolotl le développement et la régénération dans les conditions habituelles à partir de membres dépourvus de nerfs. Cette situation dite "aneurogénique" résultait de l'ablation d'une grande partie du système nerveux à l'état embryonnaire et de la mise en parabiose de l'animal ainsi opéré. Des résultats que THORNTON et STEEN (1962) ont confirmés ainsi que THORNTON et THORNTON (1970), POPIELA (1976), FEKETE et BROCKES (1987a, b ; 1988). Ainsi, SINGER (1965) a modifié la théorie neurotrophique pour y incorporer ces éléments nouveaux et a proposé l'hypothèse suivante : la substance trophique qui contribue au processus de croissance n'est pas uniquement d'origine nerveuse mais elle est également synthétisée par les autres cellules de l'embryon. La croissance des nerfs suivie par une production massive de leur substance trophique inhiberait les synthèses de substance trophique non neurale.

Parmi les travaux qui ont confirmé le rôle du système nerveux sur la croissance du blastème de régénération, bon nombre a été réalisé dans notre laboratoire. Ainsi, BOILLY et coll. (1985) ont démontré l'influence du système nerveux en mesurant la prolifération cellulaire des blastèmes de régénération 48 et 96 heures après dénervation ; BAUDUIN (1983), LASSALLE et coll. (1985) ont utilisé des co-cultures du système nerveux avec le blastème de régénération. Ils ont pu constater que des interactions entre ces deux systèmes provoquent au niveau blastémal une intense prolifération cellulaire . En dehors des co-cultures, on a également utilisé, dans notre laboratoire, des facteurs de croissance d'origine nerveuse comme le BDGF I et II, l'EDGF I et II et des extraits de tissus nerveux sur les cultures des cellules isolées de blastème de régénération. ALBERT et coll. (1987); BOILLY et ALBERT (1988a, b) ont ainsi obtenu des stimulations très importantes de l'indice mitotique de ces cellules par rapport aux témoins.

Le rôle bien établi du système nerveux sur la régénération du membre adulte des Urodèles, l'effet stimulant des facteurs de croissance d'origine nerveuse sur la prolifération des cellules blastémales, complétés par le fait que, selon ZENJARI (1987) la colonisation des bourgeons de membres de Pleurodèle par les nerfs du plexus brachial s'effectue à partir du stade 36, tout ceci nous a incité à envisager le rôle des nerfs sur le développement des bourgeons de membres. Autrement dit, le système nerveux intervient-il sur la croissance et l'organogenèse du membre, et si oui, de quelle manière ?

Trois voies d'approche sont utilisées pour tester le rôle du système nerveux :

1) nous nous sommes demandés si les facteurs de croissance ou les tissus nerveux adultes, qui se sont révélés efficaces sur les blastèmes et leurs cellules, auraient les mêmes effets sur le bourgeon en voie de développement. Ceci a été testé par l'isolement et la culture de bourgeon de membre au stade 35-36 pendant 24 ou 48 heures en présence soit des facteurs de croissance nerveux : le BDGF I ; soit en présence de divers éléments nerveux : la moelle épinière et le cerveau ;

dans ce dernier cas, il s'agit de co-cultures.

2) nous avons tenté de vérifier si le bourgeon de membre était capable de croître et de s'organiser en absence totale du système nerveux. Pour ce faire, nous avons isolé très précocement, au stade bourgeon caudal, les futurs bourgeons des membres antérieurs à l'état de champ et nous les avons cultivés une quinzaine de jours en présence ou en absence d'éléments nerveux.

3) le même objectif a été poursuivi en réalisant des animaux véritablement aneurogéniques, en procédant de manière assez différente de celle utilisée jusqu'alors par les autres auteurs cités précédemment. Les membres obtenus de cette manière ont fait l'objet d'amputation et leur capacité à régénérer a été étudiée.

L'ensemble des expériences décrites dans le présent travail montre que si un membre d'Urodèle peut croître, se développer et régénérer en l'absence de nerfs, la présence de ces derniers a un effet favorisant.

## **MATERIEL ET METHODES**



## MATERIEL ET METHODES

### I - MATERIEL BIOLOGIQUE

Les Amphibiens Urodèles *Pleurodeles waltl.* sont élevés au laboratoire à la température ambiante. Les oeufs issus de leur accouplement sont maintenus dans de l'eau du robinet soit à température ambiante, soit gardés à 12°C en vue de ralentir leur développement jusqu'à leur utilisation.

Après l'éclosion, les jeunes larves sont nourries d'*Artemia salina* et les plus âgées de larves de chironomes. L'eau d'élevage est renouvelée 3 fois par semaine après chaque repas.

Nous avons utilisé, dans le cadre de nos recherches, les bourgeons de membres antérieurs de jeunes larves de Pleurodèle. Ces bourgeons apparaissent au stade 33 de la table de développement de GALLIEN et DUROCHER (1957), alors que la larve est âgée de 10 j dans le cas d'élevage à 18°C. (PL. 1 - A)

Au stade 34 et au stade 36, les bourgeons ont respectivement les formes de cône et de cylindre ; stades où les bourgeons ont une forte activité mitotique, ce qui constitue un système embryonnaire favorable à l'étude de la croissance. (PL. 1 - B)

Au stade 37 et au stade 39, les bourgeons se présentent respectivement sous la forme de palette et de palette échancrée. On note ici un début de formation du cartilage, surtout dans la partie proximale du membre. Du stade 40 jusqu'au stade 44 l'activité mitotique est fortement ralentie, il y a différenciation des muscles et le cartilage est très bien formé. Ainsi, pendant cette période, on peut étudier le développement des muscles de membres.

D'après les observations faites en microscopie électronique par ZENJARI (1987), ce n'est qu'à partir du stade 36 qu'apparaissent les premières fibres nerveuses, au niveau proximal du bourgeon de membre antérieur. Au stade 38, les nerfs, dont le nombre des fibres est peu élevé, envahissent la moitié distale du bourgeon de membre. Ces nerfs arriveront à la base des doigts au stade 40 avec déjà plusieurs ramifications qui se dirigent vers les muscles proximaux plus ou moins différenciés.

Nous avons utilisé les bourgeons de membres aux stades où ils ne sont pas encore colonisés par les nerfs (stade 35-36) afin d'apprécier l'effet du système nerveux sur leur croissance.

## II - METHODES

### A) CULTURES

Outre les bourgeons de membres, nous avons utilisé divers explants (tissus nerveux, secteurs dorsaux) prélevés sur des embryons au stade bourgeon caudal, des larves ou des adultes de Pleurodèle anesthésiés au MS 222 dilué au 1‰ (Tricaine méthane sulfonate SANDOZ).

#### 1) Bourgeons des membres antérieurs

##### a) Prélèvement

Les bourgeons sont prélevés aux stades 35 et 36, ce qui correspond respectivement aux formes d'un cône et d'un cylindre. Ils sont stérilisés dans deux bains d'une solution saline (Ringer) stérile

contenant des antibiotiques :

- 500 µl/ml de pénicilline (EUROBIO) } (10 min)
- 500 µg/ml de streptomycine (EUROBIO) } pour le premier bain
- 500 U/ml de mycostatine (EUROBIO) (10 min) pour le deuxième bain

Ensuite un rinçage est effectué dans un troisième bain de Ringer stérile.

##### b) Conditions de culture

Le milieu de base est constitué de Leibowitz L15 (GIBCO) dilué. Ce milieu chimiquement défini est destiné à la culture des cellules de Mammifère. A ce milieu dilué à 70%, afin d'ajuster la pression osmotique à  $260 \pm 10$  m Osm, on a ajouté :

- 100U/ml de pénicilline
- 100 µg/ml de streptomycine
- 0,035 U/ml d'insuline (CHOAY)

Ce milieu de base avec ses constituants avait été défini par LASSALLE (1983). Son pH est ajusté à 7,5.

Les cultures organotypiques sont faites dans des conditions entièrement stériles sous une hotte. Nous avons utilisé une culture à immersion, où les bourgeons cultivés individuellement sont posés sur des filtres Millipores stériles dont les pores ont un diamètre de 8 µm, ces derniers sont eux-mêmes disposés au fond d'une boîte de Pétri en matière plastique de 35 mm de diamètre (FALCON, Primaria ou Conning). (Fig. 1.).

Les cultures sont maintenues à  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  dans une étuve pendant 24 ou 48 heures.

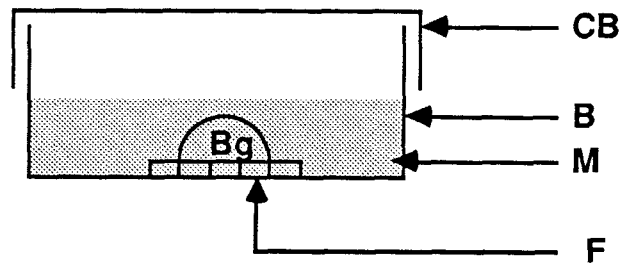


Figure 1 : Schéma de culture des bourgeons de membres.

B : boîte de culture ; Bg : bourgeon explanté ; CB : couvercle de la boîte ;  
F : filtre Millipore ; M : milieu de culture

## 2) Secteurs du champ de membre

### a) Prélèvement des secteurs dorsaux

Deux incisions transversales pratiquées de part et d'autre du champ du membre antérieur chez des jeunes embryons au stade bourgeon caudal (stade 21-22) ont permis d'isoler une tranche du reste du corps. Ces tranches d'embryons sont constituées de somites, du tube nerveux au-dessous duquel se trouve la corde, et de champs des membres (Fig. 2). La présence de cellules endodermiques, riches en vitellus, constituant un obstacle à la cicatrisation ; nous avons le plus souvent procédé à l'ablation de la moitié ventrale de ces tranches troncales, d'où leur appellation de "secteurs dorsaux".

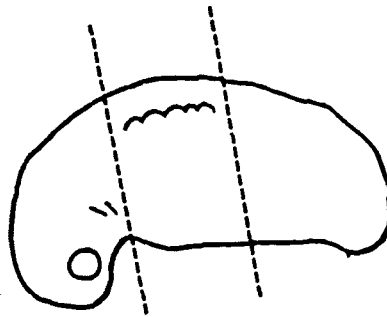


Figure 2 : Représentation schématique du secteur dorsal prélevé sur un embryon au stade bourgeon caudal (stade 21-22). Les limites de la coupure des tranches sont en pointillé.

Le principe de l'expérience consiste à faire varier la composition de ces explants. Ainsi, nous avons éliminé sélectivement le tube nerveux, la corde, les somites ou les trois à la fois.

### b) Conditions de culture

Tous les animaux ont été opérés dans la solution de Holtfreter opératoire. Elle est constituée de :

- 3,5 g de NaCl
- 0,1 g de CaCl<sub>2</sub>
- 0,05 g de KCl
- 1 litre de q.s.p.

on y ajoute :

- 0,560 g de Tris
- 3,5 ml d'HCl normal pour obtenir un pH de 7,4.

Le milieu de culture comprend donc :

- de l'Holtfreter opératoire dilué à 10% (Holtfreter d'élevage)
- 100 U/ml de pénicilline
- 100 µg/ml de streptomycine

avec ou non 10% de sérum de veau foetal.

Toutes les cultures sont faites dans des conditions aseptiques. Les secteurs dorsaux entiers ou non sont cultivés pendant une quinzaine de jours environ (12 à 17 jours) dans des salières. Les bourgeons de membres obtenus sont traités par histologie.

## 3) Co-culture bourgeons-tissus nerveux

### a) Prélèvement des explants

La technique de prélèvement des bourgeons des membres antérieurs est rigoureusement comparable à celle décrite précédemment pour les cultures organotypiques des bourgeons entiers. La moelle épinière est prélevée sur toute la longueur des animaux, soit sur des larves (2 à 6 cm) à différents stades de développement, soit sur des animaux adultes métamorphosés. Il en est de même pour le cerveau.

Tous ces explants sont stérilisés comme précédemment décrit.

### b) Conditions de co-culture

Le milieu de culture est à base de Leibowitz L15 dilué, additionné de 1% de glucose.

- 1 µg de glucose
- 300 ng/ml de glutamine (FLUKA)
- 100 U/ml de pénicilline
- 100 µg/ml de streptomycine
- 0,14 U/ml d'insuline

- 6,3 ng/ml de progestérone (FLUKA)
- 4 ng/ml d'acide sélénieux (FLUKA)
- 8,8 µg/ml de putrésine (FLUKA)
- 5 µg/ml de transferrine (Collaborativ, Research. Inc.)

C'est un milieu chimiquement défini, les cinq derniers éléments remplacent l'utilisation du sérum. Le pH de ce milieu est ramené à 7,5 par une addition de soude.

Ce milieu permet la survie des explants des tissus nerveux en culture. Le milieu de culture de Leibowitz décrit précédemment a également été utilisé à titre de comparaison.

Les tissus nerveux (moelle épinière, cerveau) stérilisés sont débarassés de leurs méninges puis coupés à l'aide d'un scalpel en tranches épaisses d'environ 1 mm. Chaque fragment est cultivé individuellement dans le fond d'une boîte de Pétri pendant 8 heures dans une fine pellicule de milieu. Après quoi, les bourgeons de membres sont placés soit directement sur le fond soit sur un filtre Millipore qui repose sur le fond de la boîte ; ils sont disposés à 5 mm environ du tissu nerveux (Fig. 3). Ensuite, on y ajoute le milieu de culture jusqu'à environ 1 mm d'épaisseur. Ces co-cultures sont maintenues dans une atmosphère saturée d'humidité pendant 24 à 48 heures à 25°C.

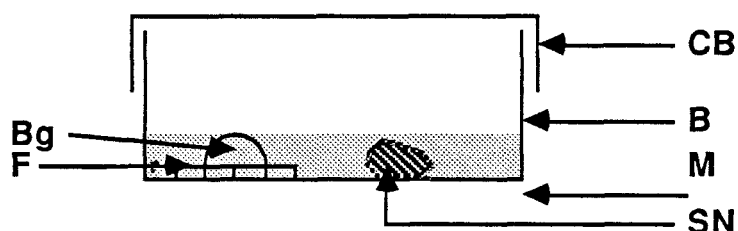


Figure 3 : Schéma de co-culture des bourgeons de membres et des tissus du système nerveux.  
SN : système nerveux (moelle épinière ou cerveau) ; les autres conventions sont identiques à celles de la Figure 1.

## B) REALISATION ET ELEVAGE DES ANIMAUX ANEUROGENIQUES

### 1) Technique de fabrication et mise en parabiose.

Les germes issus d'une même ponte sont utilisés au stade bourgeon caudal (stade 20 à 22) (PL. 1 - C). Ces embryons sont lavés dans deux bains de solution de Holtfreter opératoire de 10 minutes chacun. On extirpe le tube neural sur presque toute la longueur de l'animal, on laisse cicatriser pendant 24 heures dans la solution de Holtfreter opératoire. 24 heures plus tard, pour permettre sa survie, cet animal est mis en parabiose avec un animal porteur normal. Pour cela, on enlève un lambeau d'ectoderme sur le flanc droit de l'animal témoin et sur le flanc gauche de

l'animal dit aneurogénique ; à l'aide de la pâte à modeler, on maintient les deux animaux l'un contre l'autre pendant environ une heure. Les soudures ont été réalisées à différents niveaux par rapport à l'axe céphalo-caudal selon les circonstances. (PL. I - D)

Ces animaux sont élevés pendant 48 heures dans la solution de Holtfreter d'élevage contenant 100 µl/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine ; puis ils sont maintenus dans de l'eau du robinet ou dans les différentes eaux minérales vendues dans le commerce

## **2) Prélèvement des bourgeons**

Les bourgeons de membres de ces animaux sont prélevés à différents stades de développement et toujours au niveau du tiers proximal. Ces explants sont fixés immédiatement afin de vérifier, soit l'existence éventuelle d'innervation, soit l'état de croissance s'il s'agit de jeunes bourgeons, soit l'état de différenciation des muscles et du cartilage s'il s'agit des bourgeons plus âgés.

## **C) TECHNIQUES HISTOLOGIQUES**

### **1) Traitements et colorations des bourgeons issus des cultures et des co-cultures**

Après être cultivés, les explants sont fixés pendant 24 heures dans du Bouin Hollande sans acide acétique. En raison de leur petite taille, les bourgeons sont inclus dans de la gélose afin de faciliter leur manipulation. Après lavage dans de l'eau (24 heures), les explants sont déshydratés, inclus dans de la paraffine et débités en coupes sériées de 7 µm d'épaisseur. Les coupes sont colorées au rouge nucléaire-picro indigo carmin ; d'autres le sont à l'hématoxyline de Groat afin d'examiner la fréquence et la localisation des mitoses.

### **2) Traitements et colorations des membres d'animaux en parabiose**

Les membres excisés sont immergés dans du Bouin aqueux sans acide acétique pendant 24 h. Les plus jeunes subissent le même traitement que précédemment et sont ensuite colorés au rouge nucléaire-picro indigo carmin. Quant aux membres plus âgés, c'est-à-dire ayant de 2 à 4 doigts (st. 40 à 44), ils subissent d'abord une décalcification dans de l'acide nitrique à 5% avec 10% de Formol avant d'être déshydratés, inclus et coupés à 7 µm. Ces coupes sont colorées à l'urée-nitrate d'argent selon la technique d'UNGEWITTER (1951). Cette technique permet en effet la coloration des fibres nerveuses de brun à noir et celle des cellules nerveuses de jaune à brun. Dans certains cas, des parabiose entières sont traitées par cette méthode, afin d'apprécier les éventuelles

interconnexions nerveuses entre les deux animaux.

## D) TECHNIQUE IMMUNOHISTOCHEMIE

### 1) Principe de la réaction

Il consiste à mettre en évidence les neurofilaments présents dans les fibres nerveuses des membres. La réaction utilisée est de type indirect, elle se déroule en deux temps :

Tout d'abord, l'immunisation spécifique contre l'antigène est produite chez le lapin ; puis le sérum utilisé comme révélateur est produit par immunisation d'un mouton ou d'une chèvre contre les immunoglobulines de lapin. Ce deuxième sérum est couplé soit à la peroxydase du raifort soit à la fluorescéine. Cette méthode présente deux avantages :

1°) les marqueurs (peroxydase du raifort et la fluorescéine) ne sont pas couplés directement à l'anticorps spécifique ce qui évite une dénaturation plus ou moins importante de ceux-ci.

2°) l'emploi d'un deuxième anticorps permet d'augmenter le nombre des unités de marqueurs par site antigénique et donc la sensibilité de la réaction.

### 2) Sérums utilisés

On sait que les neurofilaments sont des protéines constituées de trois sous - unités de poids moléculaire 90, 160 et 210 KD. Au cours de nos expériences, nous avons utilisé l'anti 210 KD et l'anti 160 KD qui nous ont été fournis gracieusement par A. DELACOURTE (U. 16, INSERM). Le sérum anti immunoglobuline de lapin marqué à la peroxydase ou à la fluorescéine est commercialisé par l'Institut Pasteur.

### 3) Protocole expérimental

#### a) Incubation avec les sérums

Après déparaffinage et hydratation, les coupes sont placées dans du tampon P.B.S. 0,15 M pendant 10 minutes. L'incubation des coupes en présence de l'anticorps spécifique (anti 210 ou anti 160 KD) est réalisée dans une chambre humide afin d'éviter tout risque d'assèchement, à 4°C pendant 24 h si l'anticorps est dilué au 1/1000° ou à température ambiante pendant 1 heure si l'anticorps est dilué au 1/200°. L'anticorps est dilué dans du tampon P.B.S.

Les coupes qui seront incubées dans le deuxième anticorps marqué à la peroxydase du raifort sont plongées dans de l'eau distillée contenant 1% d'eau oxygénée pour éliminer l'activité endoperoxydasique.

Après la première incubation, les lames sont rincées dans du tampon P.B.S. pendant 20 min puis incubées pendant 1 heure à température ambiante toujours dans une chambre humide avec le sérum marqué soit à la peroxydase du raifort, soit à la fluorescéine et dilué au 1/100<sup>e</sup> dans du tampon P.B.S.

#### b) Révélation et observation

La révélation ne concerne que les coupes marquées à la peroxydase où l'activité est révélée par une réaction enzymatique colorée. Le chromogène utilisé est soit le 4-chloro-1-naphtol avec comme substrat l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, soit le diaminobenzidine (DAB). Ceci fait apparaître respectivement un précipité bleu-violet et brun.

Le montage se fait dans de la glycérine diluée (glycérine 9 vol/tampon P.B.S. 1 vol). Les lames ainsi montées sont examinées au microscope photonique ; celles marquées à la fluorescéine sont examinées au microscope à fluorescence (OLYMPUS BH2-RFL).

### E) TECHNIQUE BIOCHIMIQUE

#### 1) Mesure de l'incorporation de la radioactivité

Après les cultures, la prolifération des cellules des bourgeons a été estimée par l'incorporation du précurseur radioactif spécifique, la thymidine tritiée (activité spécifique 1 U/mM), dans de l'ADN.

Après 24 heures d'incorporation, les explants de petite taille sont homogénéisés par deux à l'appareil de Potter dans 1 ml de tampon composé de

0,1 µm/ml de NaCl

0,01 µm/ml d'éthyl diamino tétra acétique (EDTA)

0,01 µm/ml de Tris.

Chaque homogénat est ensuite transféré dans un tube à hémolyse maintenu à 0°C par de la glace fondante. 1 ml de tampon ayant servi au rinçage du broyeur est ajouté dans chaque tube. Un échantillon de 0,8 ml prélevé sur les 2 ml précédents sert au dosage de la quantité des protéines. Les macromolécules des 1,2 ml restants sont précipitées dans 0,2 ml d'acide trichloroacétique (ATCH) pendant 15 min. à 0°C. Le précipité est recueilli, après filtration sous vide partiel, sur un filtre en fibre de verre (WHATMAN GF/C) séché à l'étuve à 37°C dans l'obscurité puis dissout dans 6 ml de liquide scintillant (Lipoluma). La radioactivité est ensuite mesurée en coups par minute (cpm) dans un compteur à scintillation liquide (LKB, Wallac 1215).



## **2) Dosage des protéines**

Le dosage est effectué sur les 0,8 ml de l'homogénat prélevé précédemment. Les protéines sont dosées selon la technique de LOWRY et coll. (1951) modifiée par MARKWELL et coll. (1978). Les protéines sont colorées par le réactif de Biorad. La coloration proportionnelle à la quantité de protéines est mesurée au spectrophotomètre (SP6-50°, PYE UNICAM) à la longueur d'onde de 595 nm.

La courbe étalon est établie à partir d'une solution de gamma-globuline.

## **F) EXPRESSION DES RESULTATS**

### **1) Mesure de l'activité prolifératrice au sein des bourgeons**

Cette mesure a été évaluée selon deux méthodes : la mesure de la synthèse d'ADN et la mesure de l'indice mitotique sur coupes histologiques.

#### **a) Mesure de la synthèse d'ADN**

Nous avons apprécié la synthèse d'ADN en ramenant la quantité de la radioactivité exprimée en coups par minute (cpm) par rapport à la quantité de protéines qu'on obtient à partir de la courbe étalon.

#### **b) Mesure de l'indice mitotique**

Toutes les cellules présentant une phase de la mitose allant de la prophase à la télophase sont dénombrées toutes les 2 coupes du bourgeon complet grâce à un oculaire réticulé placé sur un microscope (LEITZ), tandis que le nombre total des cellules du bourgeon est dénombré toutes les 4 coupes de ce même bourgeon. Cette méthode, utilisée pour des raisons d'ordre pratique, n'introduit qu'une erreur négligeable dans le décompte du nombre des cellules totales ; en effet, dans un travail préalable, le décompte du nombre des cellules effectué sur toutes les coupes du bourgeon n'avait montré aucune différence.

L'indice mitotique est évalué en faisant le rapport du nombre de cellules en mitoses sur le nombre des cellules contenues dans le bourgeon.

## **2) Analyses quantitatives des structures différenciées des membres d'animaux en parabiose**

Pour analyser quantitativement les effets d'un environnement aneurogénique sur la croissance des muscles et du cartilage, la surface de certains muscles et du cartilage de membres d'animaux normaux et aneurogéniques a été déterminée. Les dimensions de ces structures sont mesurées à l'aide d'un planimètre à partir des dessins de coupes transversales de membres réalisés au microscope (LEITZ) en utilisant le système de la chambre claire. Les mesures sont faites toutes les quatre coupes d'un même membre, nous avons ensuite fait la somme intégrée de toutes les mesures que nous avons ramenée au nombre total des coupes. On compare ainsi les surfaces des muscles (biceps et l'ensemble anconeus) et de l'humérus dans le membre aneurogénique avec celles du membre normal.

## **3) Test statistique**

Quel que soit le type d'expérience, nous avons comparé les témoins aux échantillons en utilisant le test t de Student sur la comparaison des valeurs moyennes et écart-type. La signification des résultats est donnée au risque de 5%.

## **CHAPITRE I**

**EFFET D'UN FACTEUR DE CROISSANCE D'ORIGINE NERVEUSE,  
LE B.D.G.F. I, SUR LA CROISSANCE DES BOURGEONS DE  
MEMBRES EN CULTURE.**

## CHAPITRE I

### EFFET D'UN FACTEUR DE CROISSANCE D'ORIGINE NERVEUSE, LE B.D.G.F. I, SUR LA CROISSANCE DES BOURGEONS DE MEMBRES EN CULTURE.

#### I - INTRODUCTION

Depuis de nombreuses années, l'étude de l'organogenèse des membres en cours de développement et de régénération chez les Amphibiens Urodèles a conduit à faire certaines assimilations entre les mécanismes intervenant au cours de ces deux processus. Grâce aux observations de TODD (1823), SINGER (1952), nous savons que la régénération du membre d'Amphibien Urodèle amputé est contrôlée par le système nerveux périphérique. Depuis, les blastèmes de régénération ont servi de modèles à des recherches variées en vue d'évaluer les qualités trophiques du système nerveux. Ainsi, il a été possible de mettre en évidence, au sein du système nerveux, diverses substances protéiques dont les effets ont été essentiellement étudiés sur le processus de l'homéostasie tissulaire et sur la régénération des tissus lésés adultes. Ces substances protéiques issues de différents tissus du système nerveux sont appelées communément facteurs de croissance d'origine nerveuse. Il en existe un grand groupe principal dont la particularité des composants est de se lier à l'héparine lors de leur purification : c'est le groupe des facteurs de croissance se liant à l'héparine (H.B.G.F. - Heparin Binding Growth Factors). On distingue dans ce groupe deux classes : (revue par DEUEL, 1987)

1) HBGF acide (point isoélectrique compris entre 4,0 et 6) : dans cette classe, on trouve le FGF acide (Fibroblast Growth Factor) de GOSPODAROWICZ (1975), l'EDGF II (Eye-Derived Growth Factor), l'AGF I (Astroglial Growth Factor) et le BDGF II (Brain-Derived Growth Factor) extrait du cerveau de boeuf par BARRITAUULT et coll. (1982).

2) HBGF basique dont le point isoélectrique est compris entre 8 et 10 : on trouve le FGF

basique, l'EDGF I, le CDGF (Cartilage Derived Growth Factor), l'AGF II, le BDGF I et d'autres facteurs connus ou inconnus à l'heure actuelle.

Les séquences d'acides aminés de ces deux classes montrent une analogie d'environ 50% (GIMENEZ-GALLEGO et coll., 1985 ; ESCH et coll., 1985a, b ; STRYDOM et coll., 1986). D'ailleurs, ces deux classes de facteurs de croissance se lient aux mêmes récepteurs.

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé un seul facteur de croissance, le BDGF I, qui nous a été fourni gracieusement par D. BARRITault (Université PARIS XII). Ce facteur de croissance a la capacité de stimuler les cellules épithéliales et les kératocytes de la cornée, d'accélérer la vitesse de cicatrisation des ulcères de cornée induits expérimentalement et de stimuler la prolifération de plusieurs types de cellules *in vitro*. Il joue également un rôle très important dans la prolifération des cellules isolées de blastème de régénération (ALBERT et coll., 1987). Il nous a paru intéressant d'étudier son rôle éventuel sur la croissance des organes embryonnaires, notamment le bourgeon de membre. Nous l'avons testé sur les cultures des bourgeons de membres des larves de Pleurodèle pris à un stade précoce du développement où ils ne sont pas encore colonisés par les nerfs.

## II - METHODOLOGIE

Quand on isole les bourgeons du reste de l'animal, on les prive de l'influence nerveuse et de celle de divers facteurs circulant dans le sang. Les travaux de ZENJARI (1987) ont montré chez le Pleurodèle un début de colonisation du bourgeon de membre par les nerfs au stade 36 sous la forme d'un petit filet nerveux se trouvant tout juste à la base du membre. Nous avons utilisé au cours de nos travaux les bourgeons aux stades 34, 35, 36 et dans tous les cas, la section du bourgeon de membre s'est faite non pas à la base mais un peu plus distalement. Ainsi l'amputation peut être considérée, entre autre, comme une "dénervation".

Certains bourgeons amputés ont été mis en culture en présence ou non du facteur de croissance : le BDGF I à différentes concentrations. L'effet de ce facteur a été mesuré par l'évaluation de la synthèse d'ADN et de l'indice mitotique des bourgeons.

### \*Synthèse d'ADN

Deux lots de bourgeons de membres ont été utilisés.

- Lot A : les bourgeons sont cultivés pendant 48 heures dans du L15: c'est le lot témoin.
- Lot B : les bourgeons sont cultivés pendant 48 heures dans du L15 additionné de BDGF I à deux concentrations différentes

- B<sub>2</sub> à une concentration de 0,1 U/ml
- B<sub>3</sub> à une concentration de 1 U/ml

Dans tous les cas, la thymidine tritiée a été ajoutée au milieu de culture pendant les dernières 24 heures.

#### \*Indice mitotique

Différents lots de bourgeons ont été utilisés à partir de larves provenant d'une même ponte :

- Lot A : les bourgeons sont cultivés pendant 24 heures dans du L15 (lot témoin). Ces témoins nous donnent une indication de l'effet de la "dénervation" sur la croissance des bourgeons.
- Lot B : les bourgeons sont cultivés pendant 24 heures dans du L15 avec le BDGF I à différentes concentrations. Les subdivisions B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> et B<sub>4</sub> correspondent respectivement à des concentrations de 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10 U/ml de facteur de croissance. Ce lot nous permet de constater l'effet compensateur *in vitro* des facteurs de croissance.
- Lot C : les bourgeons amputés sont fixés instantanément. Ils nous permettront d'apprécier leur état de croissance à un stade de développement donné.
- Lot D : les bourgeons sont amputés 24 heures après ceux des lots précédents et fixés immédiatement. Ils doivent nous permettre d'apprécier l'effet du système nerveux et de l'environnement *in vivo* sur la croissance des bourgeons.

### III - RESULTATS

#### A)SYNTHESE D'ADN

Les résultats reportés sur le tableau 1 et la figure 4 expriment la variation de la synthèse d'ADN des bourgeons cultivés en présence de BDGF I par rapport à la synthèse des même tissus cultivés sans facteur de croissance pendant 48 heures.

Nous avons des valeurs de l'ordre de 107% pour une concentration de 0,1 U/ml de BDGF I et de 158% pour une concentration de 1 U/ml de BDGF I ; soit une augmentation de la synthèse d'ADN de 7 et de 58% par rapport aux bourgeons témoins.

Tableau 1 : Effet du BDGF sur la synthèse d'ADN du bourgeon amputé.

La moyenne correspond au nombre de cpm par rapport à la quantité de protéines en mg x 4.

Chaque cas correspond à 2 bourgeons.

S : significatif statistiquement. NS : non significatif statistiquement.

	Moyenne	Ecart Type	Nombre de cas (2 bourgeons par cas)
Témoins Lot A	7,03	1,49	3
0,1 U/ml BDGF I Lot B2	7,59	2,04	3 ↗ 7% (NS)
1 U/ml BDGF I Lot B3	11,13	2,46	5 ↗ 58% (S)

## Synthèse d'ADN

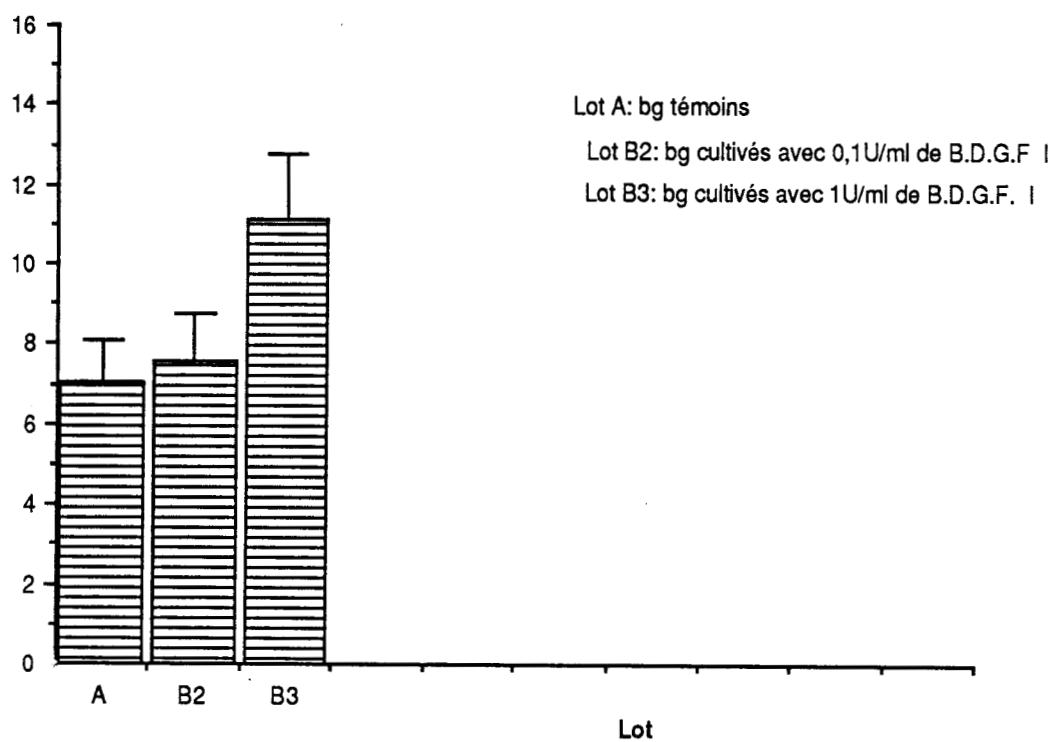


Figure 4 : Effet du BDGF I sur la synthèse d'ADN du bourgeon amputé.

La moyenne est indiquée par la hauteur de chaque rectangle et l'écart type par les barres verticales.

Ces résultats mettent en évidence les effets stimulateurs de ce facteur de croissance sur la synthèse d'ADN des bourgeons de membres en culture dans les conditions définies.

### B) INDICE MITOTIQUE

D'après les résultats rassemblés dans le tableau 2 et la figure 5, les bourgeons témoins (lot A) présentent un indice mitotique de 0,16 après 24 heures de culture alors que ceux cultivés en association avec 0,1, 1 et 10 U/ml de BDGF I ont respectivement des indices mitotiques de 0,17, 0,28 et 0,22, ce qui représente une augmentation de 6% pour le lot B<sub>2</sub>, de 75% pour le lot B<sub>3</sub> et de 37% pour le lot B<sub>4</sub>. La faible augmentation observée quand on utilise le BDGF I à une concentration de 10 U/ml est probablement due à un début de l'effet toxique du facteur de croissance. L'histogramme dose-réponse de cette figure nous montre également une baisse non significative statistiquement de 37% de l'indice mitotique par rapport aux témoins lorsqu'on utilise le facteur de croissance à une concentration de 0,01U (indice mitotique = 0,1). Cette baisse est restée inexplicable.

Tableau 2 : Indice mitotique des bourgeons cultivés exprimé en % pendant 24 heures en l'absence ou en présence de facteur de croissance (BDGF I).

Chaque cas correspond à 2 bourgeons.

S : significatif statistiquement. NS : non significatif statistiquement.

	Moyenne en %	Ecart type	Nombre de cas
Témoins Lot A	0,16	0,0007	2
0,01 U/ml Lot B 1	0,10	0,0003	↘ 4 37% (NS)
0,1 U/ml Lot B 2	0,17	0,0002	↗ 4 6% (NS)
1 U/ml Lot B 3	0,28	0,0007	↗ 5 75% (S)
10 U/ml Lot B 4	0,22	0,0007	↗ 2 37% (S)



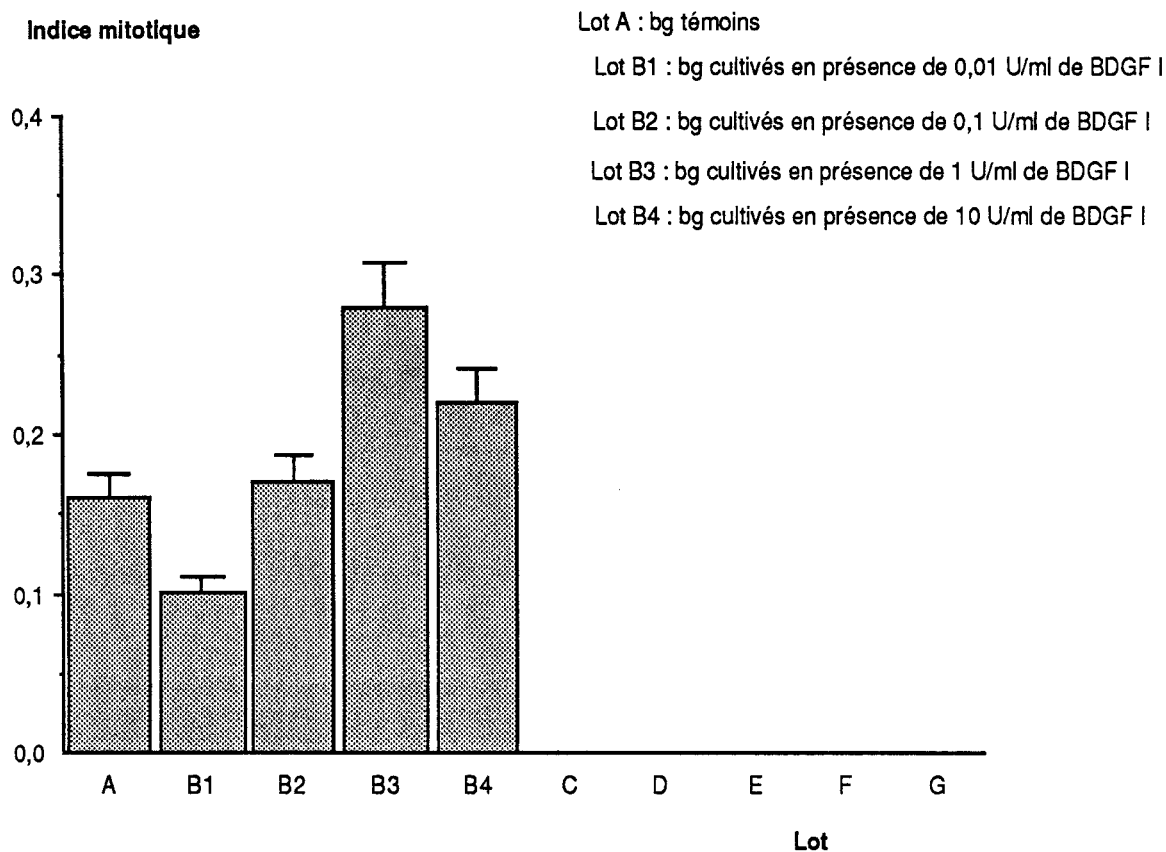


Figure 5 : Indice mitotique des bourgeons cultivés pendant 24 heures .  
Les conventions graphiques sont identiques à celle de la Figure 4.

L'analyse synchrone de l'effet de l'"amputation" et de l'effet du facteur de croissance est résumée dans le tableau 3 et la figure 6.

Tableau 3 : Effet de la dénervation et du facteur de croissance sur l'indice mitotique.  
 Chaque cas correspond à 2 bourgeons.  
 S : significatif statistiquement. NS : non significatif statistiquement.

	Moyenne en %	Ecart type	Nombre de cas
Lot C	0,82	0,0017	5
Témoins Lot A	0,16	0,0007	2 ↘ 80% (NS)
1 U/ml Lot B3	0,28	0,0007	5 ↘ 60% (S)
10 U/ml Lot B4	0,22	0,0007	2 ↘ 70% (S)
Lot D	1,24	0,0024	4 ↗ 51% (S)

Indice mitotique

Lot A : bg témoins

Lot B3 : bg cultivés en présence de 1 U/ml de BDGF I

Lot B4 : bg cultivés en présence de 10 U/ml de BDGF I

Lot C : bg amputés et fixés instantanément

Lot D : bg amputés 24 h. plus tard et fixés de suite

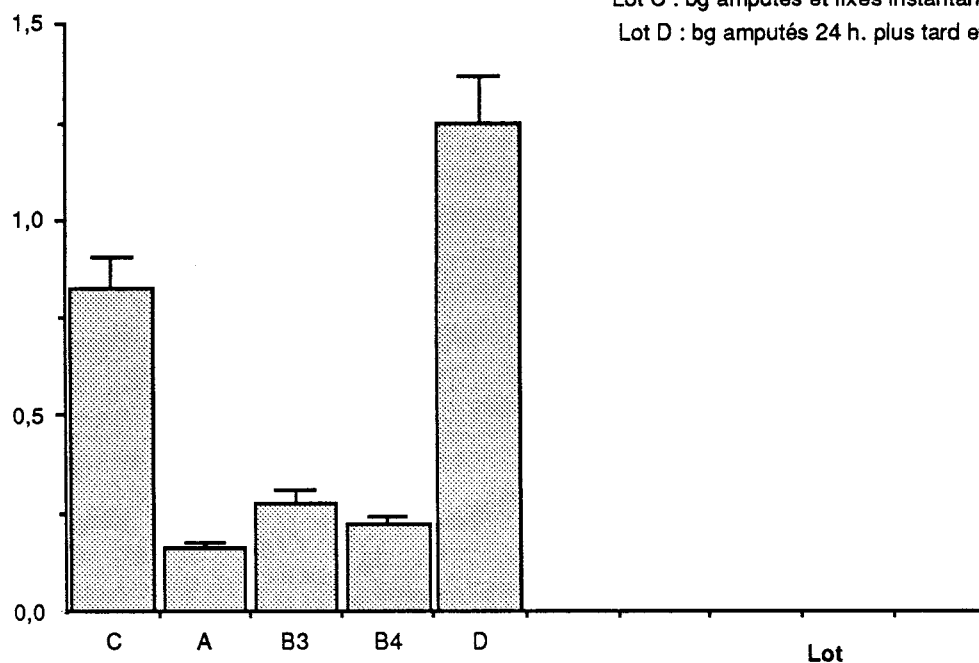


Figure 6 : Effet de la "dénervation" et du facteur de croissance sur l'indice mitotique.  
 Les conventions graphiques sont identiques à celles de la figure 4.

On constate que :

a) à l'issue des 24 heures de culture sans facteur de croissance, l'indice mitotique est nettement inférieur à celui existant dans les bourgeons lors de leur mise en culture, il passe de 0,82 (lot C) à 0,16 (lot A) soit une baisse de 80%. L'écart se creuse encore davantage si l'on compare ce même indice au sein des bourgeons cultivés 24 h sans facteur de croissance (0,16) avec celui des bourgeons restés en place (1,24) : il baisse à 87%.

b) par contre, cet écart de 80% est ramené à 60% si l'on ajoute dans le milieu de culture du BDGF I à une concentration de 1 U/ml.

c) on notera également une augmentation de l'indice mitotique statistiquement significative de 51% du lot D où l'amputation a été faite 24 heures plus tard avec fixation immédiate, par rapport au lot C.

#### IV - DISCUSSION

##### A) COMPARAISON DE L'EFFET DU BDGF I A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR LES BOURGEONS CULTIVES

###### \*Synthèse d'ADN.

Le BDGF I provoque une augmentation non significative statistiquement de 7% de la synthèse d'ADN par rapport aux témoins après 48 heures de culture, ceci à la concentration de 0,1 U/ml. Par contre, à 1 U/ml, on a une augmentation de 58%, cette dernière étant statistiquement significative à un risque inférieur à 5%. Il faut tout de même noter que nous avons été à la limite de la technique d'appréciation de l'incorporation de la radioactivité, nos bourgeons étant minuscules la quantité disponible de macromolécules est faible. Néanmoins nos résultats montrent, outre l'effet stimulateur du BDGF I sur la synthèse d'ADN des bourgeons en développement *in vitro*, l'existence d'une relation entre les concentrations du BDGF I présentes dans le milieu de culture et la synthèse d'ADN.

A notre connaissance, nos travaux sont les premiers à pouvoir montrer l'effet des facteurs de croissance d'origine nerveuse en général et du BDGF I en particulier sur l'incorporation des éléments radioactifs dans l'ADN des bourgeons de membres en développement et donc de montrer l'effet de ce facteur de croissance sur la croissance du bourgeon. Plusieurs travaux effectués en ce sens ont toujours mis en présence les facteurs de croissance d'origine nerveuse ou les extraits bruts du système nerveux avec les blastèmes de régénération des membres adultes ou larvaires.

C'est ainsi que CHOO et coll., (1978) ont obtenu une augmentation de 70% de l'incorporation des acides aminés  $^{14}\text{C}$  dans les protéines des blastèmes de régénération de *Notophthalmus viridescens* cultivés en présence de 0,7 mg de protéines/ml d'extraits de cerveau de poulet adulte pendant 20 heures ; MESCHER et LOH (1981) ont utilisé du FGF et de l'EGF ; ils ont obtenu un maximum de stimulation de la synthèse d'ADN dans les blastèmes de régénération du même animal d'environ 70 à 150%, à des concentrations de 1 ng/ml ou plus de FGF et 0,1 ng/ml ou plus d'EGF.

#### \* Indice mitotique

L'indice mitotique des bourgeons de membres cultivés dans le milieu de Leibowitz est de 0,16. L'adjonction de BDGF I dans le milieu de culture entraîne une augmentation plus ou moins importante de 6% pour 0,1 U/ml, 75% pour 1 U/ml et de 37% pour 10 U/ml de BDGF I de cet indice de prolifération. Ces résultats, les premiers du genre, concernant la croissance des bourgeons en développement en culture *in vitro*, montrent un maximum de stimulation statistiquement significative pour une dose de 1 U/ml de BDGF I (Indice mitotique x 1,75). Cette valeur est très inférieure à celle signalée par ALBERT P. et coll (1987) (Indice mitotique x 5) qui ont utilisé le même facteur de croissance, mais sur des cultures séparées de blastèmes de régénération d'Axolotl (*Ambystoma mexicanum*), et en plus dans un milieu de culture différent (MEM).

De même, CARLONE et FORET (1979) ont constaté qu'un extrait nerveux utilisé à la concentration de 0,3 mg/ml de milieu multiplie par 4 l'indice mitotique du blastème de régénération de *Notophthalmus viridescens* après 24 heures de culture. Un extrait nerveux de Pleurodèle utilisé à la concentration de 15 et de 30  $\mu\text{g/ml}$  par ALBERT et BOILLY (1986) a multiplié respectivement par 2 et par 6 l'indice mitotique des cellules séparées du mésenchyme blastémal d'Axolotl après 6 jours de culture. Ces différences des valeurs par rapport à nos travaux peuvent en partie être attribuées aux différences de technique et de matériel d'étude ; en effet, dans les cultures des cellules séparées, ces auteurs ajoutaient dans le milieu de culture une dose non négligeable d'insuline (0,20 U/ml), hormone dont on sait qu'elle stimule l'activité prolifératrice des blastèmes *in vitro* (GLOBUS et LIVERSAGE, 1975 ; MESCHER et LOH, 1981 ; LASSALLE, 1983) ; en plus, ce système de culture présente l'avantage de mettre plus ou moins toutes les cellules directement en contact avec le facteur de croissance ou l'extrait nerveux alors que dans une culture organotypique, comme la nôtre, les cellules sont enfermées dans l'épiderme et le facteur de croissance doit passer par le plan d'amputation, ce qui limite forcément son action.

## B) COMPARAISON DE L'EFFET DU BDGF I PAR RAPPORT AUX BOURGEONS RESTES *IN VIVO*

Dès l'amputation, les bourgeons de membres au stade 35-36 ont un indice mitotique de 0,82 (lot C). Si on les cultive *in vitro* pendant 24 heures (lot A), l'indice mitotique chute à 0,16 soit une baisse de 80%. L'adjonction de 1U/ml de BDGF I ramène cette chute à 60%. Par contre, les bourgeons qui sont restés sur les larves présentent un indice mitotique de 1,24, soit une augmentation de 51% statistiquement significative par rapport au lot C et de 131% par rapport au lot A (indice mitotique x 7,75).

Ainsi, ces bourgeons restant 24 h. de plus dans leur environnement et sous l'influence des différents facteurs circulant dans le sang ont une croissance plus importante que les autres.

## V - CONCLUSION

Cet ensemble de résultats montre qu'il est possible de modifier le métabolisme des cellules de blastèmes de régénération et, au vu de nos résultats, celui des bourgeons en développement sous l'influence d'un facteur externe à ces explants et provenant du système nerveux. Mais sur le bourgeon de membre en développement la stimulation est nettement inférieure à celle des blastèmes de régénération de membres adultes. Cette différence peut trouver plusieurs explications :

- la diversité des techniques et des matériels utilisés,
- les différences dans la nature, le degré de purification et la concentration des facteurs ou extraits nerveux testés,
- enfin, les cellules du bourgeon de membre en développement seraient moins sensibles au BDGF I que celles des blastèmes de régénération.

Néanmoins, l'association *in vitro* d'un facteur de croissance d'origine nerveuse et d'un bourgeon de membres de Pleurodèle provoque au niveau de celui-ci une augmentation de la prolifération cellulaire, qu'elle soit mesurée par la synthèse d'ADN ou par l'indice mitotique.

Le ou les facteurs neurotrophiques nécessaires à la régénération des blastèmes de membres adultes, interviennent-ils sur les cellules indifférenciées du bourgeon de membre ? Pour tenter de répondre à cette question, il était nécessaire de réaliser des co-cultures des tissus nerveux avec les bourgeons de membres en développement afin de compléter cette étude du rôle des facteurs de croissance mimant l'effet du système nerveux sur la croissance des bourgeons, comme cela a déjà été fait sur les blastèmes de régénération des membres adultes de Pleurodèle (GLOBUS et LIVERSAGE, 1975 ; GLOBUS et VETHAMANY-GLOBUS, 1977 ; BAUDUIN, 1983 ; LASSALLE et coll., 1985).

## **CHAPITRE II**

### **ROLE DES TISSUS NERVEUX SUR LE DEVELOPPEMENT ET LA CROISSANCE DES BOURGEONS EN CULTURE**

## CHAPITRE II

### ROLE DES TISSUS NERVEUX SUR LE DEVELOPPEMENT ET LA CROISSANCE DES BOURGEONS EN CULTURE

#### I - INTRODUCTION

Dans le premier chapitre, nous avons constaté une baisse considérable de l'indice mitotique et de la synthèse d'ADN des bourgeons cultivés en absence de facteur de croissance dérivé du cerveau : le B.D.G.F. I. L'addition de ce facteur de croissance a permis de relancer la division cellulaire des bourgeons en développement, et donc de relancer leur croissance. Mais cette relance est demeurée faible par rapport au niveau de l'indice mitotique des bourgeons de membres du même stade restés sur les larves pendant la durée de culture. A partir de ces résultats, nous avons eu l'idée de tester, non plus un facteur de croissance qui mime l'effet du système nerveux, mais les tissus nerveux eux-mêmes en présence des bourgeons de membres en développement.

Des augmentations de la synthèse des macromolécules ou de l'indice mitotique dans les blastèmes de régénération de membre d'Amphibien en présence des ganglions de la racine dorsale (GLOBUS et VETHAMANY-GLOBUS, 1977 ; VETHAMANY-GLOBUS et coll., 1978 ; VETHAMANY-GLOBUS et coll., 1984 ; TOMLINSON et coll., 1981 ; LASSALLE et coll., 1985; TOMLINSON et TASSAVA, 1987) et de la moelle épinière (BAUDUIN, 1983) ont déjà été rapportées. Mais des résultats complémentaires valables restent à trouver quant au rôle de ces facteurs de croissance et/ou du facteur neurotrophique *in vivo* et le contrôle qu'ils exercent sur la division des cellules au cours du développement et même de la régénération.

Ainsi, dans ce chapitre, nous avons réalisé :

- des cultures de tranches d'embryons aux stades 21-22. Ces tranches comportent les membres antérieurs à l'état de champ, les somites, le tube nerveux et la corde. En fait, ce sont des cultures d'embryons au stade bourgeon caudal (stade 21-22) dépourvus de leurs parties antérieure et postérieure. Notre intention étant toujours d'étudier le rôle du système nerveux dans le développement et la croissance du membre, ces secteurs dorsaux ont été cultivés avec ou sans tube nerveux.

- des co-cultures des bourgeons de membres avec les tissus nerveux, notamment la moelle épinière et le cerveau de Pleurodèle.

## II - CULTURE DES SECTEURS DORSAUX RENFERMANT LE CHAMP DU MEMBRE.

### A) METHODOLOGIE

Quatre types d'explants ont été mis en culture selon les modalités décrites dans la partie Matériel et Méthodes.

- Type A : Il constitue les témoins, il s'agit de secteurs dorsaux d'environ 5 à 6 somites d'épaisseur renfermant la moelle épinière, la corde, les somites et les champs de membres antérieurs (Fig.7-A).
- Type B : Il s'agit de secteurs dorsaux identiques aux précédents dont on a enlevé la moelle épinière (Fig.7-B).
- Les secteurs dorsaux cultivés sans système nerveux ni corde constituent le Type C (Fig.7-C).
- Enfin, nous avons également enlevé le système nerveux et les somites : c'est le Type D (Fig.7-D).

Ces cultures sont laissées à température ambiante pendant près d'une quinzaine de jours, ensuite, les bourgeons sont amputés et l'indice de prolifération calculé comme précédemment.



COUPES TRANSVERSALES D'EMBRYONS  
AU STADE BOURGEON CAUDAL

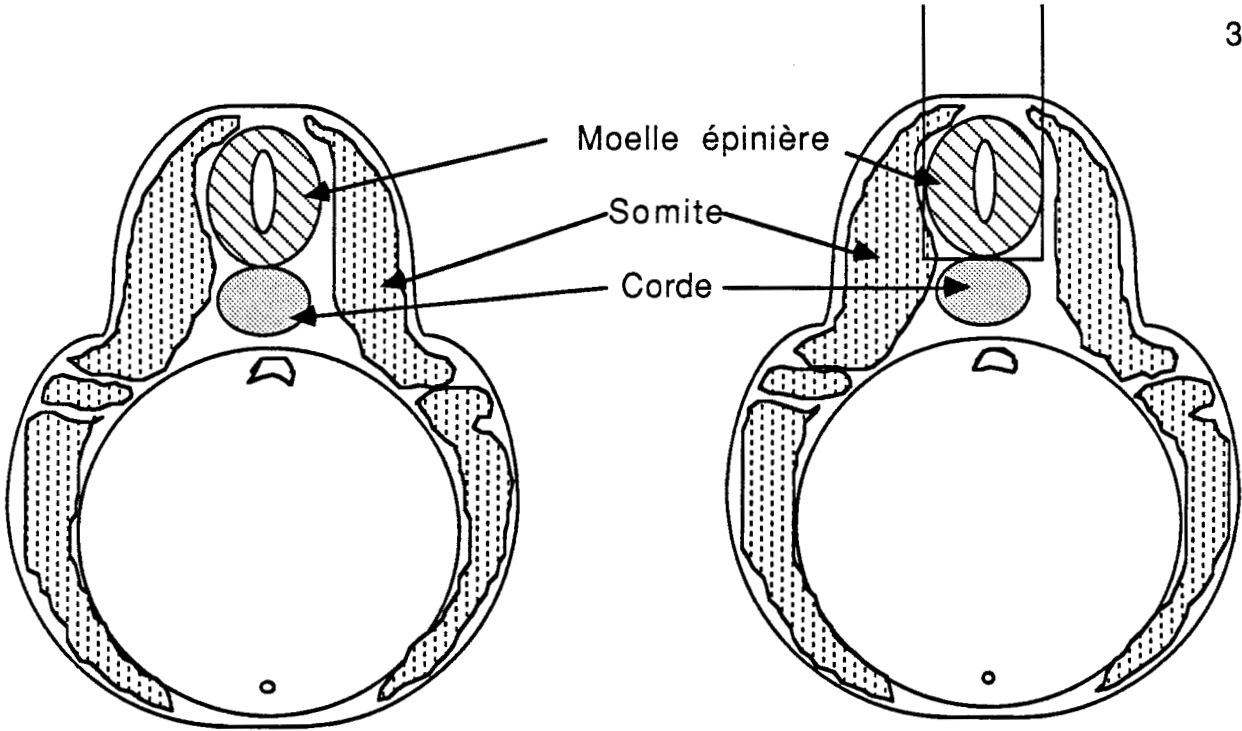


Figure 7-A

Figure 7-B

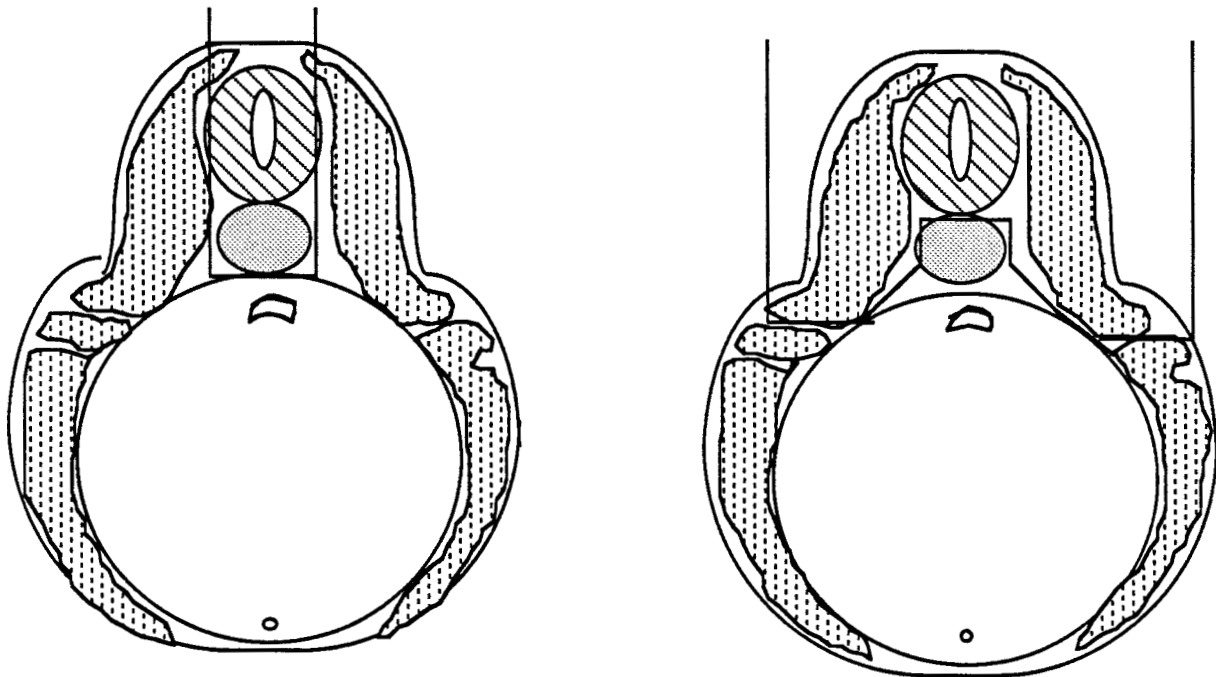


Figure 7-C

Figure 7-D

Les limites d'ablations de différents éléments sont en pointillé.

## B) RESULTATS ET DISCUSSION

Compte tenu de l'ampleur des sections antérieure et postérieure, les explants mettent environ 48 heures avant de se cicatriser complètement. Ils se transforment ensuite en des vésicules qui, 15 jours plus tard, développent des bourgeons de membres. Chez l'animal normal du même âge, les bourgeons correspondent au stade 37 (forme d'une palette) ; alors que dans nos cultures, les bourgeons atteignent à peine le stade 36 ; au-delà de ce stade, nous avons constaté un début de désintégration des vésicules avec le plus souvent une perte de cellules du côté ventral correspondant aux structures d'origine endodermique. Les numérations des cellules en mitose sont reportées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Indice mitotique des bourgeons des membres antérieurs au stade 35-36 issus des cultures *in vitro* des secteurs dorsaux des embryons au stade bourgeon caudal. Chaque échantillon porte généralement deux bourgeons de membre.

Types	Nombre d'échantillons	Nombre de bourgeons	Nombre de mitoses	Nombre total de cellules	Indice Mitotique	Moyenne de l'IM	Ecart Type
A (Témoins)	I	1er bourgeon	34	2500	1,36	} 1,32	0,1
		2e bourgeon	28	2086	1,34		
	II	1er bourgeon	47	4266	1,1		
		2e bourgeon	21	1404	1,5		
B Secteurs dorsaux sans système nerveux	I	1er bourgeon	49	3872	1,27	} 1,4	0,3
		2e bourgeon	85	4710	1,8		
	II	1er bourgeon	32	3218	1,0		
		2e bourgeon	65	3652	1,77		
	III	1er bourgeon	25	2272	1,1		
		2e bourgeon	44	2852	1,54		
C Sans système nerveux ni corde	I	1er bourgeon	2	135	1,48	} 1,3	0,1
		2e bourgeon	19	1752	1,08		
	II	1er bourgeon	15	1118	1,34		
		2e bourgeon	14	1128	1,24		

A partir de ce tableau, nous remarquons qu'avec ou sans système nerveux, l'indice mitotique des bourgeons est quasiment identique. Ainsi, dans nos conditions d'expérience, les bourgeons des secteurs dorsaux atteignent le stade 36 de développement sans difficultés apparentes et indépendamment de toute influence externe. Au-delà du stade 36, nous avons constaté un arrêt de la croissance dû vraisemblablement à l'épuisement du vitellus.

Au vu de nos résultats, notamment du nombre total des cellules de chaque bourgeon, on se rend compte que ces bourgeons n'ont pas tous la même taille ; certains sont plus développés que d'autres, même ceux qui sont sur le même secteur. Cette variation de taille est restée inexplicable.

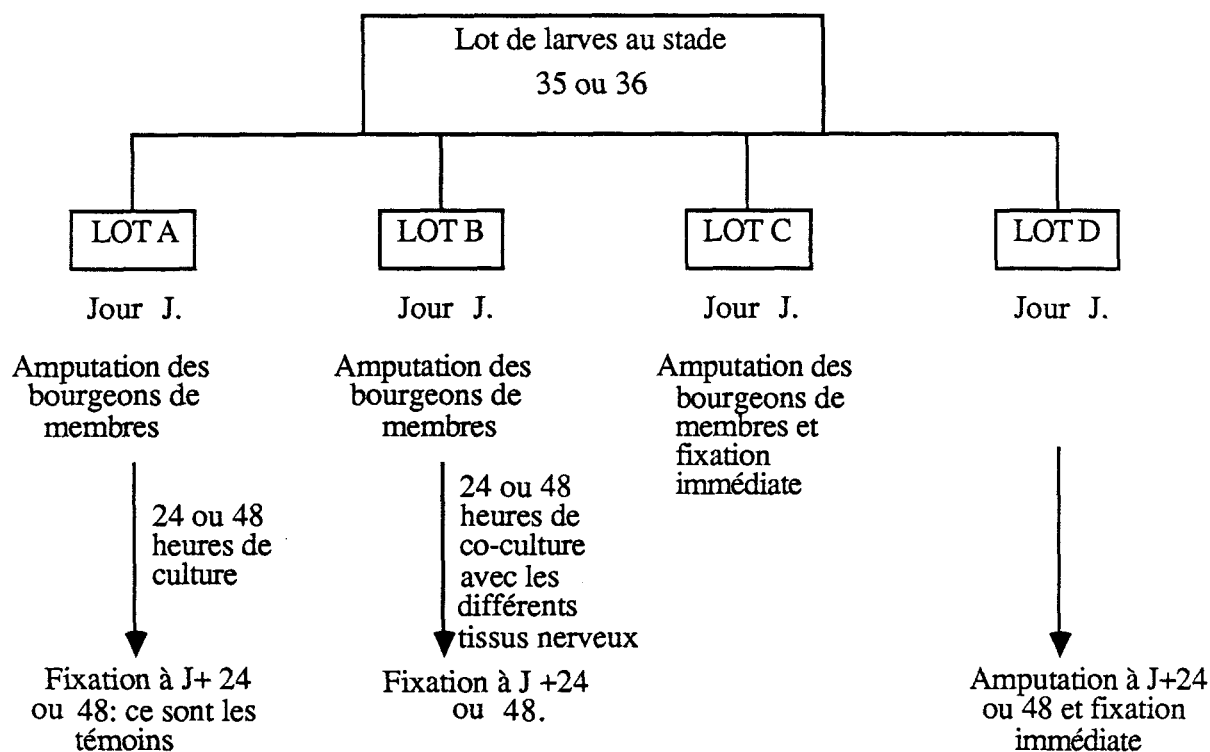
Il est à noter que nous avons également réalisé des ablations simultanées du système nerveux et des somites (Type D). Il en résulte des bourgeons peu développés, sous forme de boursouflures plus ou moins pointues. L'histologie de ces bourgeons révèle l'existence de nombreuses cellules pycnotiques et l'absence quasi totale de mitoses. Cette observation pose le problème, souvent abordé, du rôle joué par les somites dans l'organogenèse du membre d'Amphibiens. Si la contribution des somites à la constitution de la musculature squelettique du membre antérieur a été démontrée chez le poulet (CHRIST et coll., 1977 ; CHEVALLIER, 1979 ; KIENY et CHEVALLIER, 1979 ; MAUGER et KIENY, 1980 ; CAUWENBERG et coll., 1986), elle n'a jusqu'à présent été que suggérée chez les Urodèles (AMANO, 1960, 1962 ; FINNEGAN, 1962, 1963 ; BOURGEOIS et HOUBEN, 1975). Diverses expériences, actuellement en cours dans notre laboratoire, montrent que cette contribution est bien effective chez le Pleurodèle. L'absence des somites pourrait ainsi expliquer une absence de mitoses et de croissance dans les premières étapes du développement du membre dans nos cultures des secteurs dorsaux.

### III - CO-CULTURE BOURGEON DE MEMBRE-TISSUS NERVEUX

#### A) METHODOLOGIE

Les bourgeons prélevés à des stades jeunes (stade 35, 36) sont cultivés en présence des différents tissus nerveux (moelle épinière, cerveau) pendant 24 à 48 heures : ce sont des co-cultures.

4 lots ont été utilisés, ils se définissent comme suit :



Les bourgeons cultivés ou non sont fixés dans le liquide de Bouin Hollande et débités en coupes sériées de 7  $\mu\text{m}$  afin de calculer l'indice mitotique. Certains bourgeons cultivés reçoivent une dose (1,5  $\mu\text{l/ml}$ ) de thymidine tritiée pendant 24 heures afin de mesurer la synthèse d'ADN.

## B) RESULTATS

### 1) Co-culture bourgeon-moelle épinière

#### a) Evolution de la synthèse d'ADN

L'incorporation de la thymidine  $^3\text{H}$  dans l'ADN ne diffère pratiquement pas dans les cultures témoins et dans les co-cultures. Les résultats consignés dans le tableau 5 et la figure 8 nous montrent une augmentation négligeable de la synthèse d'ADN de 6% par rapport aux témoins ; cette augmentation n'étant d'ailleurs pas significative statistiquement à 5%.

Tableau 5 : Incorporation de la thymidine tritiée dans les bourgeons témoins et co-cultivés avec la moelle épinière  
 N: nombre des cas. Chaque cas correspond à 2 bourgeons.

	Moyenne	Ecart-type	N
Lot A	3,662	0,49	3
Lot B	3,835	0,49	3

### Synthèse d'ADN

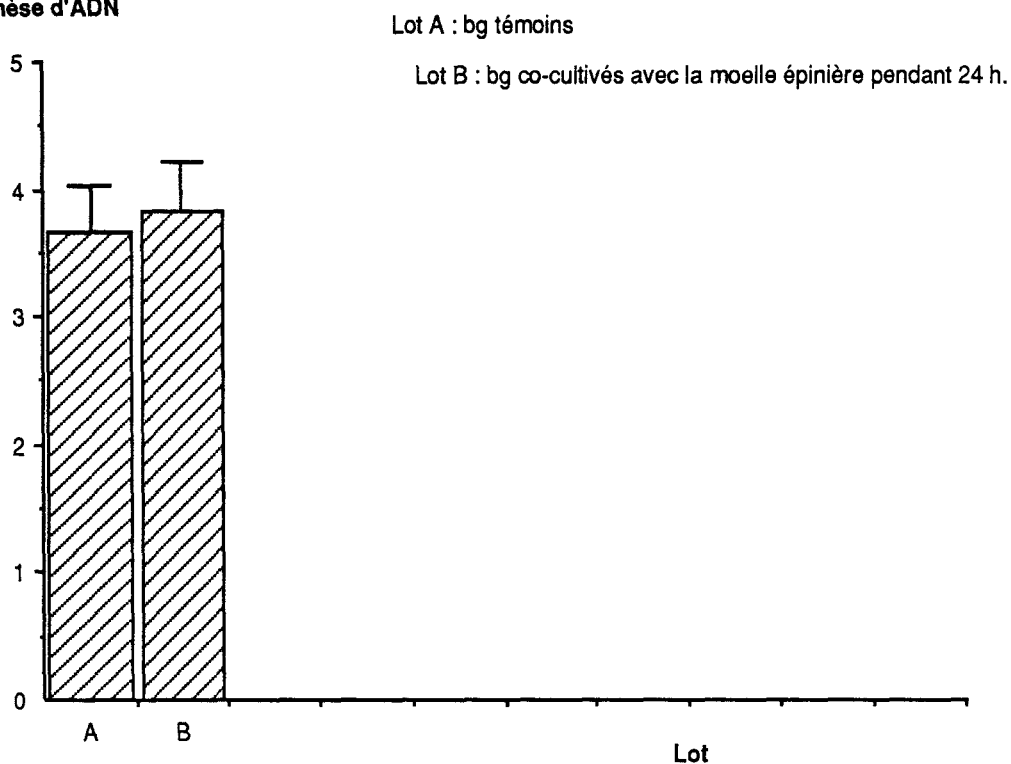


Figure 8 : Comparaison de l'incorporation de la thymidine tritiée dans les bourgeons témoins (lot A) et co-cultivés avec la moelle épinière (lot B) ; ceci après 24h. de culture. Chaque barre représente la moyenne et l'écart-type.

Cette technique de dosage de l'incorporation de la radioactivité dans les bourgeons de membres en développement est, à notre avis, limitée compte tenu de la petitesse des bourgeons. C'est ainsi que, pour le reste de nos manipulations, nous avons surtout utilisé la technique de la mesure de l'indice mitotique.

b) Evolution de l'indice mitotique

Les bourgeons de membres co-cultivés pendant 24 heures avec la moelle épinière présentent un indice mitotique de 0,96 alors que celui des bourgeons témoins (cultivés sans moelle épinière) est de 0,92 soit une petite hausse négligeable, compte tenu de la marge d'erreur, de 4%. Les résultats sont dans le tableau 6 et la figure 9.

Tableau 6 : Indice mitotique des bourgeons de membres témoins et co-cultivés avec la moelle épinière pendant 24h.

N: nombre des cas. Chaque cas correspond à 2 bourgeons.

	Moyenne en (%)	Ecart-type	N
Lot A	0,92	0,161	3
Lot B	0,96	0,288	3

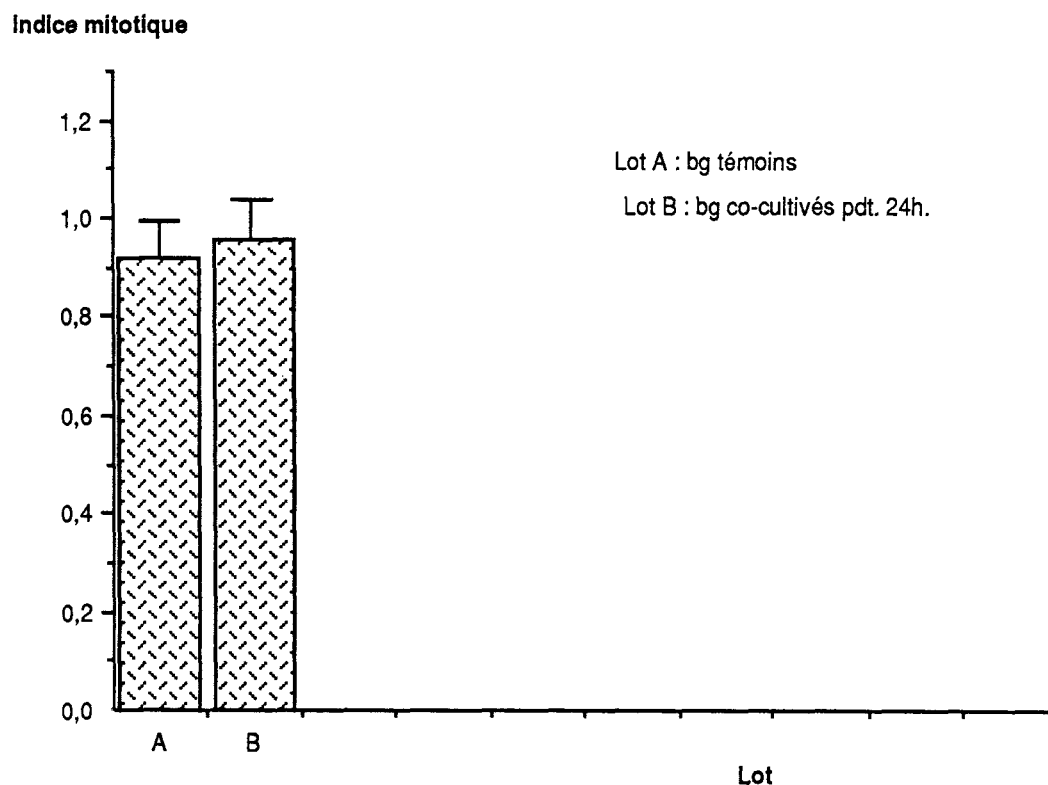


Figure 9 : Activité mitotique des bourgeons de membres témoins cultivés seuls ( lot A ) et des bourgeons de membres co-cultivés pendant 24h. avec la moelle épinière ( lot B ). Chaque barre représente la moyenne et l'écart-type.

Les résultats diffèrent (tab. 7 et fig. 10) si on laisse les cultures 24 heures de plus avec les tissus nerveux soit 48 heures (lot B ; IM = 1,0), l'augmentation de l'indice mitotique est de 17% par rapport aux témoins (lot A ; IM = 0,85). L'effet des tissus nerveux devient plus évident. Quant aux bourgeons coupés et fixés de suite (lot C), ils présentent un indice mitotique de 1,4 alors que celui des témoins cultivés sans tissu nerveux est de 0,85. On constate donc une baisse de 35,3% après 48 heures de "dénervation". *In vitro* , sous l'effet de la moelle épinière, cette baisse de 35,3% est ramenée à 28,6% ( $\text{LOT B} \times 100 = \frac{1}{1,4} \times 100 = 71,4$  ;  $100 - 71,4 = 28,6$ ).

LOT C            1,4

Les bourgeons qui sont restés 48 heures de plus sur les larves (lot D) ont un indice mitotique de 1,726 soit une augmentation de 23,3% par rapport aux bourgeons amputés et fixés 48 heures avant.

Tableau 7 : Stimulation de la croissance des bourgeons de membres antérieurs co-cultivés avec la moelle épinière pendant 48 heures ou laissés sur les larves. Indice mitotique des bourgeons  
 N: nombre des cas. Chaque cas correspond à 2 bourgeons.

	Moyenne en (%)	Ecart-type	N
Lot A	0,85	0,187	4
Lot B	1,0	0,056	4
Lot C	1,4	0,28	4
Lot D	1,726	0,127	5

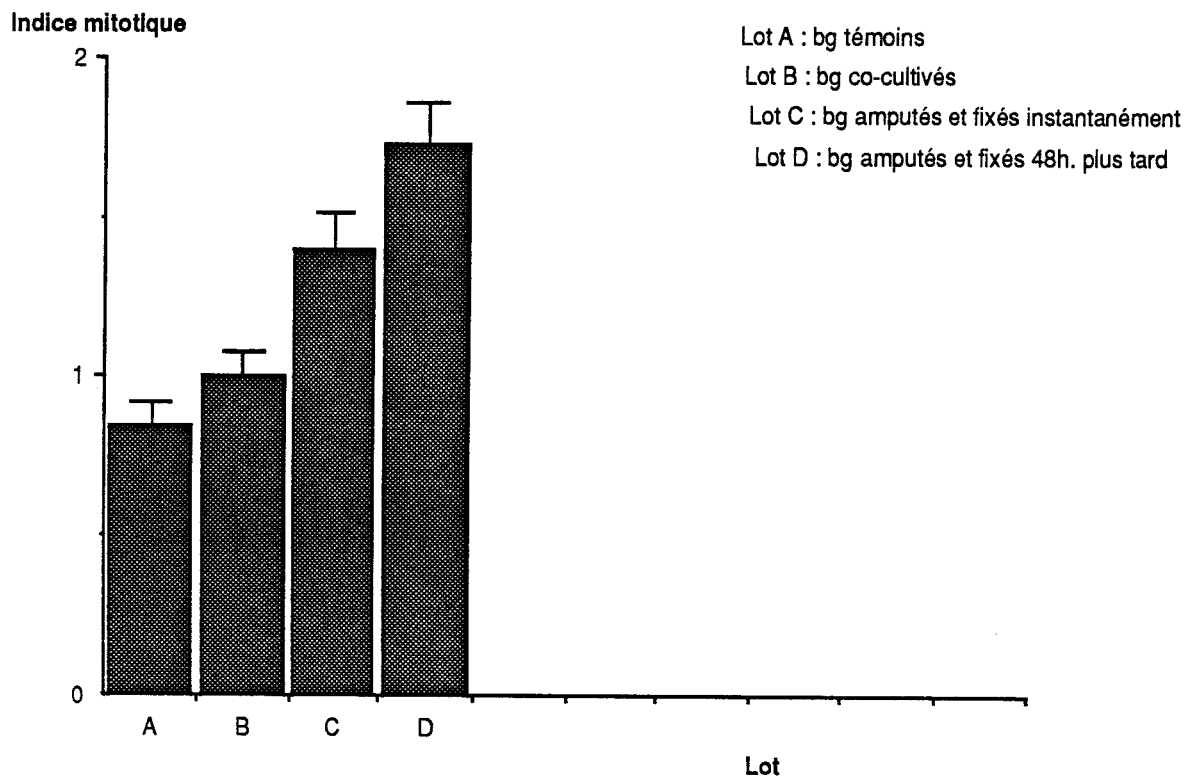


Figure 10 : Histogramme montrant l'augmentation croissante de l'indice mitotique des bourgeons. La co-culture avec la moelle épinière a duré 48h. Chaque barre représente la moyenne et l'écart-type.



## 2) Co-culture bourgeon - cerveau de larve

Dans cette culture de 48 heures, on s'est limité à l'évaluation de l'indice mitotique. Les résultats sont dans le tableau 8 et la figure 11 :

Tableau 8 : Indice mitotique des bourgeons de membres co-cultivés ou non avec le cerveau.  
N: nombre des cas. Chaque cas correspond à 2 bourgeons.

	Moyenne en(%)	Ecart-type	N
Lot A	0,735	0,085	4
Lot B	0,95	0,08	3
Lot C	1,47	0,121	3
Lot D	1,813	0,185	3

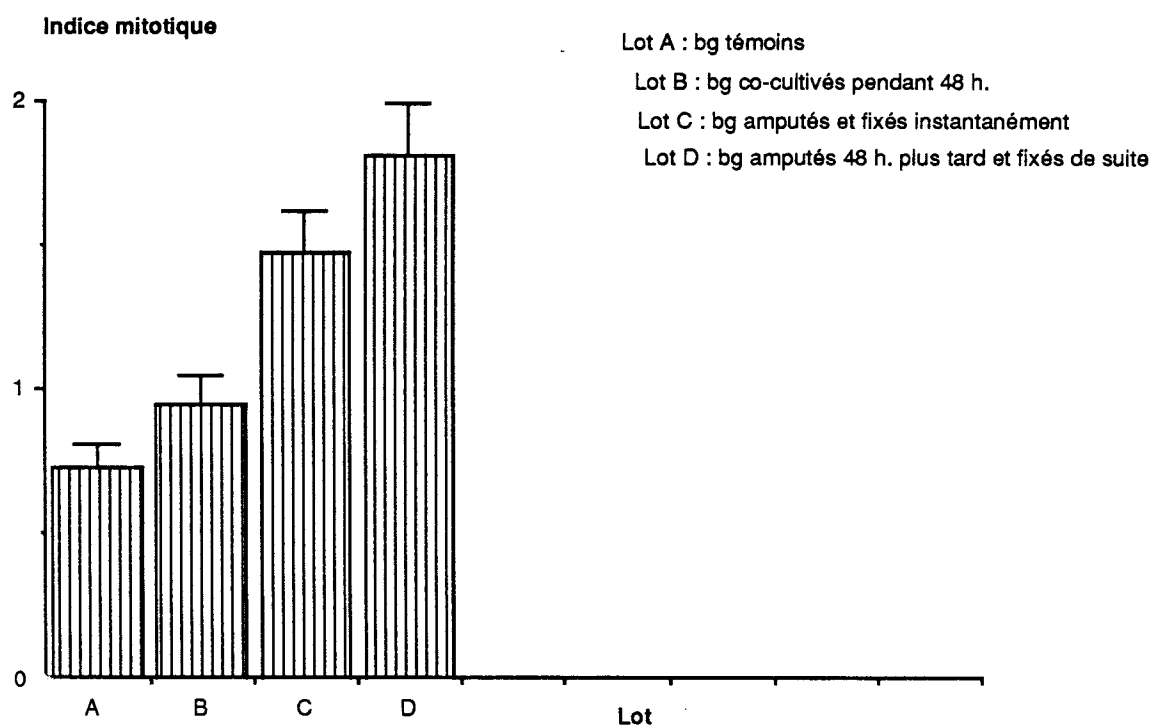


Figure 11 : Histogramme montrant l'effet du cerveau et d'autres facteurs non nerveux existant *in vivo* sur l'indice mitotique des bourgeons de membres en développement pendant 48h. Chaque barre représente la moyenne et l'écart-type.

- Les bourgeons coupés et fixés de suite (lot C) ont un indice mitotique de 1,47, ceux coupés et fixés après 48 heures de culture (témoins = lot A) ont un indice mitotique de 0,735 soit une baisse de l'indice mitotique d'environ 50% après 48 heures de "dénervation". Afin de stopper cette chute de l'indice mitotique après "dénervation" (50% en 48 heures de culture) et de voir également le rôle que peut jouer le cerveau dans la croissance du membre, nous avons ajouté dans les cultures des bourgeons des morceaux de cerveau de larves. L'indice mitotique de ces bourgeons de membres co-cultivés est de 0,95 (lot B). La chute de l'indice mitotique est ainsi ramenée à 35,1%. Lorsqu'on compare le lot B au lot A (témoins), on observe une augmentation de l'indice mitotique de l'ordre de 29,3% sous l'effet du cerveau *in vitro*. Les bourgeons de membres, qui sont restés 48 heures de plus sur les animaux (lot D), ont un indice mitotique de 1,813 ; par rapport au lot C, nous avons une augmentation de 23,3%, alors que par rapport aux témoins (lot A) cultivés sans cerveau l'activité est multipliée par 2,5.

### C) DISCUSSION

Nous remarquons que les bourgeons de membres en culture réagissent aux effets des tissus nerveux d'une manière positive et plus ou moins importante selon la nature du tissu nerveux. Cette réponse est plus importante quand les bourgeons de membres sont en présence du cerveau. Nous avons obtenu une augmentation de l'indice mitotique de 29,3% statistiquement significative à un risque  $\leq 5\%$ . Avec la moelle épinière l'augmentation est de 17%, après 48 heures de culture. Nous n'avons d'ailleurs pas obtenu d'augmentation importante de l'indice mitotique par rapport aux témoins après 24 heures de co-culture entre le bourgeon de membre et la moelle épinière. Ainsi l'action de la moelle épinière devient plus nette après 48 heures de co-culture où l'on obtient une augmentation de l'indice mitotique de 17%, cette dernière n'étant pas, toutefois, statistiquement significative. POLLACK (1980) et coll. (1981) sont les seuls, à notre connaissance, à avoir pratiqué des co-cultures des bourgeons de membres des larves de *Rana pipiens* avec la moelle épinière jeune. Mais, contrairement à nous, ils ont plutôt observé l'effet du tissu cible c'est-à-dire le bourgeon de membre sur la croissance des neurites de la moelle épinière. Nos résultats étant donc originaux, nous ne pouvons les comparer qu'avec les multiples études déjà réalisées avec les blastèmes de régénération d'animaux adultes co-cultivés soit avec la moelle épinière, soit avec les ganglions spinaux ou rachidiens d'adultes. C'est ainsi que BAUDUIN (1983) a fait des co-cultures de blastèmes de régénération de Pleurodèle posés sur un filtre en présence de la moelle épinière adulte, il a obtenu une augmentation non significative statistiquement de l'indice de prolifération de 24% après 24 heures de culture. GLOBUS et VETHAMANY-GLOBUS (1977) ont obtenu une stimulation de l'indice mitotique de 49% 24 heures après avoir co-cultivé les blastèmes de

régénération avec les ganglions rachidiens du triton *Notophthalmus viridescens*. Après 48 heures de co-cultures, l'indice mitotique des blastèmes témoins était multiplié environ par 3. GLOBUS a utilisé ici le système de culture par transfiltre. LASSALLE et coll.(1985) ont obtenu une augmentation de l'indice mitotique de 62% des blastèmes co-cultivés avec les ganglions spinaux de Pleurodèles pendant 4 jours par rapport aux témoins cultivés sans tissu nerveux. Il est tout à fait compréhensible qu'avec un matériel différent (blastème de régénération ; ganglion adulte ; espèce utilisée) et des méthodes de co-cultures différentes (culture transfiltre, culture des tissus sur des supports différents), les résultats ne soient pas les mêmes.

#### IV - CONCLUSION

La culture des secteurs dorsaux permet de constater que le membre à l'état de champ se développe normalement avec ou sans tube nerveux, ce au moins jusqu'au stade 36. Ainsi, au cours des premiers stades de son développement, la prolifération du bourgeon de membre est indépendante du système nerveux. Au-delà de ce stade, l'état de culture n'a pas permis de poursuivre l'expérience.

Les co-cultures entre les bourgeons de membres et les tissus nerveux qui sont faites pendant 24 ou 48 heures, se sont traduites par une certaine stimulation de la croissance ; mais celle-ci bien que significative dans un cas est restée relativement faible. Ceci semble montrer qu'à partir du stade 35-36 (stade de la mise en culture), les facteurs neurotrophiques, s'ils existent, ne sont pas essentiels à la poursuite du développement du membre. Certes, le système nerveux a bien un effet mitogénique sur les cellules du bourgeon de membre, puisqu'en co-culture il permet d'augmenter la prolifération dans une certaine mesure, mais cette action n'est pas comparable à ce qui se passe *in vivo* puisque les bourgeons qui restent sur l'animal (lot D) ont un indice mitotique largement supérieur ; elle n'est pas comparable non plus à ce qui se passe sur les blastèmes de régénération de membre puisque ces derniers réagissent très positivement à la présence des tissus nerveux. *In vivo*, il y a plusieurs facteurs qui joueraient un rôle important dans la croissance du membre, notamment l'environnement du membre, des facteurs circulant dans le sang et des facteurs nerveux et non nerveux. Ainsi, la baisse de l'indice mitotique constatée après amputation et culture sans système nerveux ne serait pas seulement due à ce que l'on a assimilé à une "dénervation" mais à l'absence d'autres facteurs.

Afin de ne pas séparer le bourgeon de membre en développement de cet environnement, nous avons été amenés à faire des animaux aneurogéniques pour voir dans quelle mesure un membre pourrait se passer du système nerveux au cours de son développement ultérieur. Cette étude fera l'objet du chapitre suivant.

## **CHAPITRE III**

**EFFET DE L'ENVIRONNEMENT ANEUROGENIQUE SUR LA  
CROISSANCE ET LA REGENERATION DU MEMBRE.**

## CHAPITRE III

### EFFET DE L'ENVIRONNEMENT ANEUROGENIQUE SUR LA CROISSANCE ET LA REGENERATION DU MEMBRE.

#### I - INTRODUCTION

En cultivant *in vitro* le jeune bourgeon de membre en présence d'un facteur de croissance d'origine nerveuse, nous avons obtenu une augmentation de l'indice de prolifération des cellules de ce bourgeon. Mais cette augmentation est restée très inférieure à celle qui se produit dans les blastèmes de régénération et à celle qui se produit naturellement *in vivo*. De ce fait, nous nous sommes orientés vers la réalisation des co-cultures en mettant les bourgeons de membres en croissance en présence des différents tissus nerveux (moelle épinière, cerveau). Là encore, nous avons obtenu une augmentation mesurée de l'indice mitotique des cellules de bourgeons de membres traités par rapport aux bourgeons témoins, c'est-à-dire cultivés en l'absence du système nerveux. Cette augmentation de l'indice mitotique s'est aussi maintenue en deçà de l'indice des blastèmes de régénération, et de celui des bourgeons restés sur les animaux vivant pendant le temps de culture.

Ces deux types de travaux, les premiers de ce genre à notre connaissance, réalisés sur des jeunes bourgeons de membres au stade 35-36, nous ont amené à conclure à l'indépendance de l'organogenèse et de la croissance du bourgeon de membre vis-à-vis du système nerveux ; du moins pendant les premiers stades du développement. En effet, les cultures des secteurs dorsaux comportant les champs de membres, isolés à partir des animaux au stade bourgeon caudal, qui ont atteint le stade 36 (le bourgeon de membre a une forme cylindrique), démontrent bien cet état de fait.

Toujours dans la perspective d'analyser le rôle éventuel du système nerveux, tout en éliminant les effets inhérents à la culture *in vitro*, nous avons entrepris la réalisation d'animaux qualifiés d'"aneurogéniques" (dépourvus du système nerveux). Après le développement de ces animaux, qui ne survivent qu'après une mise en parabiose avec un animal normal, nous avons comparé la croissance de leurs jeunes bourgeons de membres avec celle des membres des animaux hôtes. Nous avons ensuite étudié la croissance et la différenciation des structures de ces membres (cartilage et muscles).

Nous nous sommes également intéressés à la régénération de ces animaux dits "aneurogéniques" comme l'ont déjà fait plusieurs auteurs (YNTEMA, 1959a, b ; THORNTON et STEEN, 1962 ; THORNTON et THORNTON, 1970 ; FEKETE et BROCKES, 1987b, 1988). En effet, ces auteurs ont constaté qu'un membre dit "aneurogénique" se développe en l'absence de nerfs et régénère également en l'absence de nerfs avec un retard de 1 à 2 jours. Nous avons étudié dans ce chapitre, l'état de croissance, la vitesse de régénération, la morphologie et l'histologie de ces régénérats.

## II - METHODOLOGIE : MISE AU POINT DU PROTOCOLE OPERATOIRE

L'objectif est de réaliser des animaux dont les membres antérieurs sont dépourvus de nerfs.

Pour cela, il est nécessaire de pratiquer l'ablation du système nerveux avant la croissance des fibres nerveuses ventrales et la gangliogenèse qui conduit à la formation des racines dorsales des nerfs brachiaux. D'où une première contrainte : l'ablation doit se faire avant la migration des cellules de crêtes neurales. Nous avons pour cela choisi d'intervenir au stade 20, 21, ce qui correspond à la fermeture du tube nerveux.

La deuxième contrainte concerne l'étendue antéro-postérieure du secteur enlevé qui doit être suffisamment importante pour empêcher tout nerf, provenant du système nerveux laissé en place, de venir coloniser les bourgeons de membres en développement. On sait, en effet, que parmi les mécanismes invoqués pour expliquer l'établissement du réseau neuronal, l'attraction exercée par la cible sur le cône de croissance du neurite peut jouer un rôle important (revue par JACOBSON et HUANG, 1985). Ceci implique que l'ablation soit faite sur un nombre de segments suffisamment élevé avec comme conséquence l'incapacité pour l'animal de survivre au-delà de la prise de la nourriture. D'où une dernière contrainte : la mise en parabiose de l'embryon opéré avec un embryon hôte normal, cette procédure est d'ailleurs celle utilisée par les auteurs qui ont tenté d'obtenir des animaux dits "aneurogéniques" (YNTEMA, 1959a, b ; THORNTON et THORNTON, 1970 ; FEKETE et BROCKES, 1987b, 1988). Seul POPIELA (1976, 1977) n'a pas réalisé de parabiose, il a ainsi élevé ces animaux dits "aneurogéniques" jusqu'au stade 4 doigts aux membres antérieurs. Notons que dans toutes nos parabioses, l'animal opéré était toujours à droite et l'hôte à gauche.

Les diverses tentatives que nous avons réalisées peuvent se regrouper ainsi :

### Série A

le tube nerveux est enlevé depuis la limite du diencephale-rhombencéphale jusqu'à la hauteur du cloaque (fig. 12).

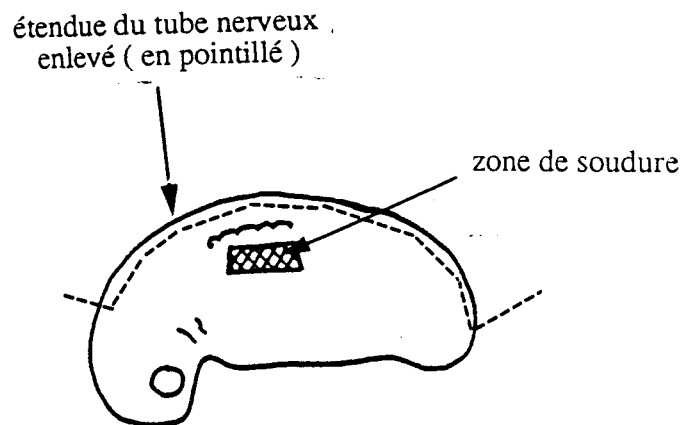


Figure 12 : Représentation schématique de l'extirpation du tube nerveux d'un embryon au stade 21

La parabiose entre l'animal opéré et l'animal témoin est faite à l'emplacement de la région présomptive du membre antérieur (PL. I-E). Ainsi, dans cette série, les animaux joints n'avaient plus qu'un membre antérieur chacun, de morphologie plus ou moins identique ; l'animal opéré ayant pratiquement la même taille que son hôte.

Les coupes histologiques de ce type de parabiose nous ont montré l'existence de nerfs dans le membre de l'animal opéré (PL. III-A). Ces nerfs proviennent du plexus brachial droit de l'animal hôte, traversent la zone de soudure, passent sous la corde de l'animal opéré pour innerver son membre droit restant (PL.II-A- B- C). Dans d'autres cas, les nerfs proviennent de la partie antérieure de l'animal opéré.

Dans cette première série, la limite céphalique de l'ablation apparaissant trop postérieure et la localisation de la soudure des partenaires inopportune, nous avons réalisé une autre série

### Série B

Nous avons enlevé le tube nerveux de la limite postérieure du télencéphale (cerveau antérieur) jusqu'à la hauteur du cloaque (fig. 13).

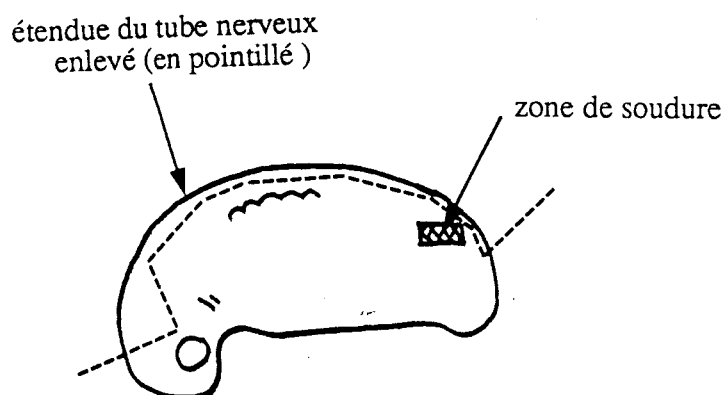


Figure 13 : Schéma de l'ablation du tube nerveux d'un embryon au stade 21

La soudure est effectuée dans la région troncale postérieure, dans la zone située au-dessus du cloaque correspondant au champ du membre postérieur. Dans ce type de soudure, les animaux développent chacun 2 membres antérieurs (PL. III-C). Les membres de l'animal opéré sont plus grêles que ceux du témoin. L'examen histologique du membre de l'opéré révèle l'existence de petits filets nerveux, se traduisant par la présence de muscles. Dans quelques cas, leur présence n'a pu être constatée (PL. III-D). Quand ils existent, ces nerfs proviennent des ganglions crâniens de l'animal opéré. Pour tenter d'obtenir de véritables aneurogéniques, nous avons de ce fait réalisé une troisième série.

### Série C

Dans cette série, l'ablation inclut la totalité de l'encéphale avec ses vésicules sensorielles et la moelle épinière jusqu'aux abords du cloaque (fig. 14).

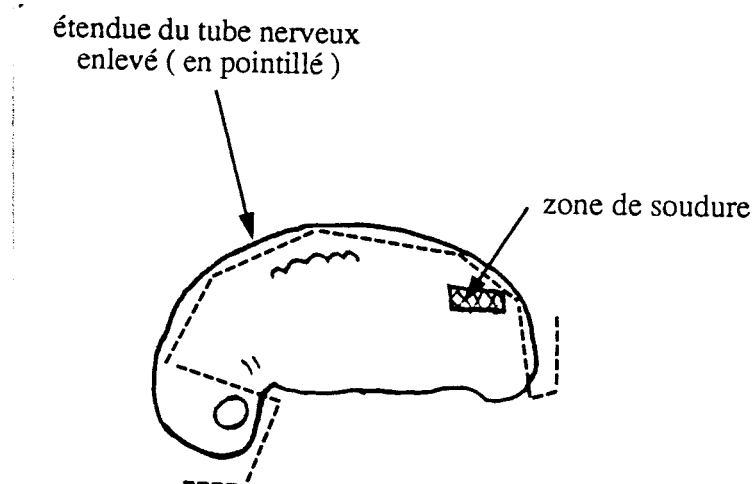


Figure 14 : Schéma expérimental. Le tube nerveux est enlevé sur toute la longueur de l'embryon au stade 21.

La soudure est réalisée de la même manière que dans la série B (PL. III-E et PL. V-A).

On constate que l'animal de droite est dépigmenté, il est réduit morphologiquement et les examens histologique (PL. III-F) et immunohistochimique (PL. IV-A- B- C) de ses membres révèlent l'absence quasi complète de nerfs : ce sont donc ces animaux que nous avons qualifiés de "véritables aneurogéniques" ou "vrais aneurogéniques", ce contrairement aux membres dits "aneurogéniques" de la série B qui ressemblent aux membres rarement innervés de YNTEMA.

Pour établir quantitativement les effets de l'environnement aneurogénique sur la croissance du membre, l'indice mitotique des jeunes bourgeons (du stade 36 au stade 39) des membres innervé et aneurogénique est déterminé. Nous avons également évalué les surfaces des coupes transversales de l'avant-bras avec ses principaux constituants (humérus, ensemble anconeus ou triceps et biceps) des membres âgés des deux animaux en parabiose (du stade 41 au stade 52)



L'avant-bras, avec ses constituants, a été reconstruit à l'aide de la chambre claire au microscope photonique (LEITZ, Gx160) à partir des dessins des coupes sériées. Cette technique nous a posé quelques difficultés. En fait, il n'a pas été facile d'apprécier avec certitude les limites et l'état de différenciation de ces muscles. Comme le montrent les PL. III-A et V-C, l'emplacement des muscles normaux est le plus souvent occupé par des amas cellulaires plus ou moins denses que l'on ne peut assurément pas assimiler à des muscles en voie de développement. Ces amas ont toujours été pris en compte dans les évaluations figurant dans les tableaux 11 et 12. On peut donc estimer que les valeurs figurant dans ces tableaux sont surestimées. Dans d'autres cas (PL. III-D- F), les muscles sont pratiquement inexistantes ou ne subsistent que sous la forme de cellules pycnotiques. Ces dessins ont été ensuite mesurés à l'aide d'un planimètre.

Les membres de ces parabioses ont été amputés à différents stades de développement afin d'étudier l'impact de l'environnement aneurogénique sur la régénération. Nous avons procédé aux mêmes méthodes de quantification lorsque les animaux régénéraient leurs membres.

### III - RESULTATS

#### A) EVOLUTION MORPHOLOGIQUE DES PARABIOSES.

Dans les 3 séries réalisées, le nombre total d'embryons soumis à l'ablation du tube nerveux est de 211 (Série A : 16 ; Série B : 111 ; Série C : 84). Nous avons eu un taux de mortalité très important. Cette mortalité était due :

- soit à une contamination suivie d'une desquamation de la peau, les pattes et les branchies restant collées le long du corps. Nous avons pensé que l'eau du robinet pouvait en être la cause mais l'utilisation des différentes eaux minérales ou de source n'a pas donné les résultats escomptés. A noter que ces incidents se sont produits également chez les témoins non opérés.

- soit aux suites opératoires : absence de cicatrisation des animaux opérés avec dissociation progressive.

Pour un grand nombre de parabiontes, la prise de nourriture constitue une étape fatale, la mise en parabiose entraînant fréquemment des anomalies des tubes digestifs des deux animaux.

Ainsi :

- 1) dans la Série A : le taux de mortalité est de 31%, soit 11 survivants. Les animaux hôtes et opérés se sont développés à la même vitesse, ils ont pratiquement la même taille. L'animal opéré présente les yeux et les branchies ; la zone de dépigmentation est très réduite et possède encore quelques chromatophores dispersés (PL. I-E). Les deux animaux développent deux membres antérieurs au lieu de quatre puisque la soudure entre les deux s'est faite au niveau des membres antérieurs droit pour l'hôte et gauche pour l'opéré. Ces membres se développent à la même vitesse (PL. I-E) ; de plus l'animal opéré réagit vivement aux pincements de son membre antérieur, témoignant ainsi de l'existence de l'innervation. Pour la suite de nos travaux, nous ne

nous sommes pas intéressés davantage à ces membres puisqu'ils sont aussi innervés que ceux de leurs homologues non opérés.

2) Série B : le taux de mortalité est de 55%, soit 50 survivants. Deux semaines après la mise en parabiose, les animaux opérés mesurent les trois quarts de la longueur des animaux porteurs, ils présentent une grosse tête, disproportionnée par rapport au reste du corps ; on note également la présence d'yeux, de branchies et d'une zone de dépigmentation plus large que celle de la Série A (PL. III-C et PL. V-B). Compte tenu du lieu de soudure postérieure des deux animaux, ils développent chacun deux membres antérieurs. En ce qui concerne ces derniers, il faut envisager deux étapes : jusqu'au stade 42, les membres des deux partenaires se développent de manière identique (PL. III-C). Après quoi, chez les opérés, la croissance des membres en épaisseur ralentit considérablement alors qu'en longueur, elle se poursuit normalement. Quand les animaux survivent suffisamment longtemps, on obtient donc chez les opérés des membres de forme et de longueur normales, mais extrêmement grêles.

3) Série C : le taux de mortalité est de 58%, il est plus important que dans les deux premières séries en raison de l'importance de l'ablation du système nerveux ; le nombre d'animaux survivants est ainsi de 35. Comme le montre la fig. E, PL. III, l'animal opéré est complètement dépigmenté sur une étendue assez large, il n'a plus d'encéphale donc pas d'yeux, les branchies sont soit absentes, soit réduites, la taille est inférieure à celle du porteur ; c'est un animal inerte, les seuls mouvements visibles sont les battements du coeur et la circulation sanguine. Ses membres antérieurs ont un diamètre très réduit, ils sont très fins surtout l'avant-bras, ils sont également rectilignes et raides. Ces différences de taille des membres d'animaux opérés ne sont visibles qu'à partir du stade 41-42, avant ce stade, on ne note aucune différence morphologique entre les membres témoins et aneurogéniques (PL. V-A).

## B) OBSERVATIONS HISTOLOGIQUES.

De tout le membre amputé, seul l'avant-bras est sectionné complètement en coupes sériées de  $7\mu\text{m}$  et la présence ou l'absence des nerfs est établie par une réaction immunohistochimique (voir Matériel et Méthodes). Ainsi, un membre est considéré comme "véritable aneurogénique" si l'examen microscopique révèle l'absence complète de nerfs et même de certains muscles. En outre, les parabiontes sont fixés et sectionnés complètement afin de vérifier la présence ou l'absence de la moelle épinière au niveau des membres antérieurs et l'existence des nerfs brachiaux. Dans le cas où ces derniers font défaut, nous avons pu contrôler une éventuelle colonisation des membres par des nerfs inappropriés.

C'est ainsi que dans la série B, 3 animaux seulement ont montré une absence totale de nerfs, le reste des membres a une innervation très réduite ressemblant aux membres obtenus par d'autres chercheurs (YNTEMA, 1959a, b ; THORNTON et STEEN, 1962; FEKETE et BROKES, 1987b, 1988) qu'ils avaient simplement nommés membres "aneurogéniques" ou "rarement innervés".

Les muscles (anconeus et biceps) sont très réduits et parfois atrophiés (PL. III-D) par rapport aux muscles des membres de l'animal hôte (PL. III-B), le cartilage lui aussi est atteint, sa croissance au cours du développement est réduite par rapport à celle du cartilage témoin. Dans cette série à suture postérieure, les quelques rares nerfs existants proviennent souvent des ganglions crâniens de l'animal opéré.

L'examen immunohistochimique des membres de la série C a montré l'absence totale d'innervation (PL. IV-A-B-C). Ces membres très grêles sont dénommés "vrais aneurogéniques". Dans l'état actuel des choses, nous sommes les seuls à avoir pu réaliser des véritables membres aneurogéniques. POPIELA (1976) les avait obtenus à partir d'animaux isolés (*Ambystoma maculatum*), mais on peut se demander comment ceux-ci, dépourvus de système nerveux, ont pu survivre jusqu'au stade 4 doigts aux membres antérieurs sans se nourrir. Les animaux opérés que nous n'avons pas mis en parabiose ont succombé quelques jours après le stade de la prise de nourriture.

En tout état de cause, ces membres sont des véritables aneurogéniques car l'absence complète de certains muscles n'a pas attendu des stades tardifs de développement ; ainsi, nous avons pu déceler dans cette série l'absence quasi-totale des muscles au stade 41 ou au stade 42 (PL. III-F). Par contre tous les auteurs, ayant travaillé sur ce sujet et qui ont obtenu des membres partiellement innervés, ont montré que tous les muscles se formaient normalement jusqu'à un certain stade très tardif (stade 4 doigts au membre antérieur), puis ils commençaient à dégénérer. On peut donc se demander si les quelques fibres nerveuses existant dans ces membres n'ont pas favorisé ce développement des muscles. Bien que moins atteint par cet état de non innervation, l'humérus des membres opérés croît moins rapidement que celui des membres témoins.

Il a donc fallu d'une part une ablation complète du tissu nerveux (moelle épinière et encéphale), et d'autre part une suture très postérieure (au niveau du champ du membre postérieur), pour empêcher l'innervation des membres antérieurs des animaux opérés et obtenir ainsi des membres "véritablement aneurogéniques" (cas de la série C). Ces membres restent dans cet état aneurogénique pendant très longtemps jusqu'à environ le stade 53, 54 soit plus de 2 mois après l'ablation du tube nerveux. En effet, à partir des stades proches de la métamorphose et dans certains cas, les nerfs du plexus sacré de l'animal témoin poussent, remontent le long de la paroi abdominale du traité (paroi qui est très réduite en longueur puisqu'il y a un phénomène de résorption de l'animal opéré qui se produit) et atteignent tout au moins la partie proximale de l'avant-bras (constatations *in vivo* par dissection des parabioses : 2 cas sur 8). Ainsi, pour plus de précautions, nous avons considéré qu'un membre est dit véritable aneurogénique du stade 21 (stade d'opération) jusqu'à environ le stade 54 ; c'est pendant ce laps de temps que nous avons comparé l'effet de la présence ou de l'absence du système nerveux sur la croissance et la régénération du membre en réalisant une étude approfondie de la croissance de l'humérus, de l'ensemble anconeus et du biceps.

Il est à noter que seules les deux dernières séries (B et C) sont utilisées dans cette étude.

C) INDICE MITOTIQUE DES JEUNES BOURGEONS DE MEMBRES.

L'indice mitotique est utilisé comme critère pour comparer l'état de la croissance des membres des deux séries B et C pendant les premiers stades de développement (tableaux 9 et 10).

Tableau 9 : Série B

Stades Animaux	36	37	39
Témoins	1,5 ± 0,0033 (2)	1,13 ± 0,0037 (4)	1,0 ± 0,0001 (2)
Traités	1,03 ± 0,0004 (2)	1,11 ± 0,0031 (4)	0,9 ± 0,0025 (2)

Tableau 10 : Série C

Stades Animaux	36	37	39
Témoins	1,34 ± 0,0012 (2)	1,0 ± 0,005 (3)	1,0 ± 0,0009 (4)
Traités	1,5 ± 0,0007 (2)	1,1 ± 0,003 (3)	0,9 ± 0,0001 (3)

Indice mitotique des bourgeons de membres témoins et aneurogéniques à différents stades de développement. L'écart type est à droite de la moyenne des indices mitotiques, le nombre de bourgeons utilisés est entre parenthèses.

Il n'y a aucune différence majeure statistiquement significative entre les bourgeons témoins et aneurogéniques, quelle que soit la série. L'indice mitotique est plus important dans les jeunes bourgeons (stade 36), et il diminue dans les bourgeons plus âgés (stade 39) ; en effet, à partir du stade 38 se produit déjà un début de différenciation des muscles de l'avant-bras, visible en microscopie électronique (ZENJARI, 1987). Ainsi, le développement des bourgeons de membres témoins et dits "aneurogéniques" se produit à la même vitesse et sans différence aucune quel que soit l'état d'innervation (PL. V-A). Comme conclu dans les précédents chapitres, il est donc sûr et certain que le développement du membre est indépendant de l'innervation dès les premiers stades de développement.

#### D) CROISSANCE COMPAREE DES MUSCLES BRACHIAUX ET DE L'HUMERUS D'ANIMAUX INNERVES ET ANEUROGENIQUES.

Cette croissance a été étudiée au cours de ce qu'on a appelé la deuxième phase de développement du membre (à partir du stade 41). La quantification de la surface des différents tissus est faite à 4 stades distincts (41, 44, 48 et 52).

Pour des raisons d'ordre pratique, nous avons étudié dans un premier temps, un seul échantillon dans chaque stade ; puis, dans un deuxième temps, l'étude a été généralisée à un ensemble d'échantillons pour chaque stade.

##### 1) Etude d'un seul échantillon par stade.

Les tableaux 11 et 12 présentent l'évolution de la moyenne des surfaces des coupes transversales des différents tissus des membres normaux et aneurogéniques des séries B et C.

Comme constaté précédemment, lors de l'observation morphologique, les membres dits aneurogéniques sont plus grêles que leurs homologues témoins.

Cas d'un seul échantillon

Tableau 11 : Série B. Evolution de la surface (en mm<sup>2</sup>) des coupes transversales (CT) de l'avant-bras et de ses constituants des membres témoins et "aneurogéniques" à différents stades de développement . La mesure est effectuée toutes les 4 coupes. Chaque chiffre correspond à la somme intégrée de la surface divisée par le nombre de coupes. La surface des tissus aneurogéniques comparée à celle des tissus normaux est indiquée en pourcentage.

Stades de Tissus Dvpt de membres	41			44			48			52		
	Témoin	Aneurog.	$\frac{\text{Aneur.}}{\text{Témoin}} \times 100$	Témoin	Aneurog.	$\frac{\text{Aneur.}}{\text{Témoin}} \times 100$	Témoin	Aneurog.	$\frac{\text{Aneur.}}{\text{Témoin}} \times 100$	Témoin	Aneurog.	$\frac{\text{Aneur.}}{\text{Témoin}} \times 100$
CT de l'avant-bras	41,8	24,3	58,1%	42,3	25,2	59,6%	98,4	45,6	46,3%	181,9	63,8	35,1%
Humérus	11,5	8,0	69,6%	15,9	12,8	80,5%	38,5	21,2	55,1%	54,8	22,2	40,5%
Ensemble Anconeus	2,2	1,1	50 %	3,8	1,2	31,6%	9,1	2,5	27,5%	17,9	3,9	22,4%
Biceps	1,9	0,9	47,4%	2,0	0,9	45,0%	4,5	1,1	24,4%	8,9	1,8	20,2%

Les muscles sont apparemment les tissus les plus affectés comme le montrent les figures 15 et 16 qui comparent respectivement la variation en pourcentage et la surface des muscles (anconeus et biceps) dits "aneurogéniques" par rapport aux mêmes muscles témoins dans la série B :

- en effet, dès le stade 41, moment où les muscles commencent à être plus ou moins bien délimités, l'anconeus aneurogénique représente 50% de son homologue innervé, le biceps est à 47% (tab. 11, fig. 15).

- au stade 52, l'anconeus aneurogénique est à 22,4% de la surface de l'anconeus innervé, le biceps lui atteint 20% de la surface de son homologue innervé. Ainsi, plus on avance dans le développement, plus l'écart se creuse entre les dimensions des muscles témoins innervés avec celles des muscles aneurogéniques (tab. 11, fig. 15).

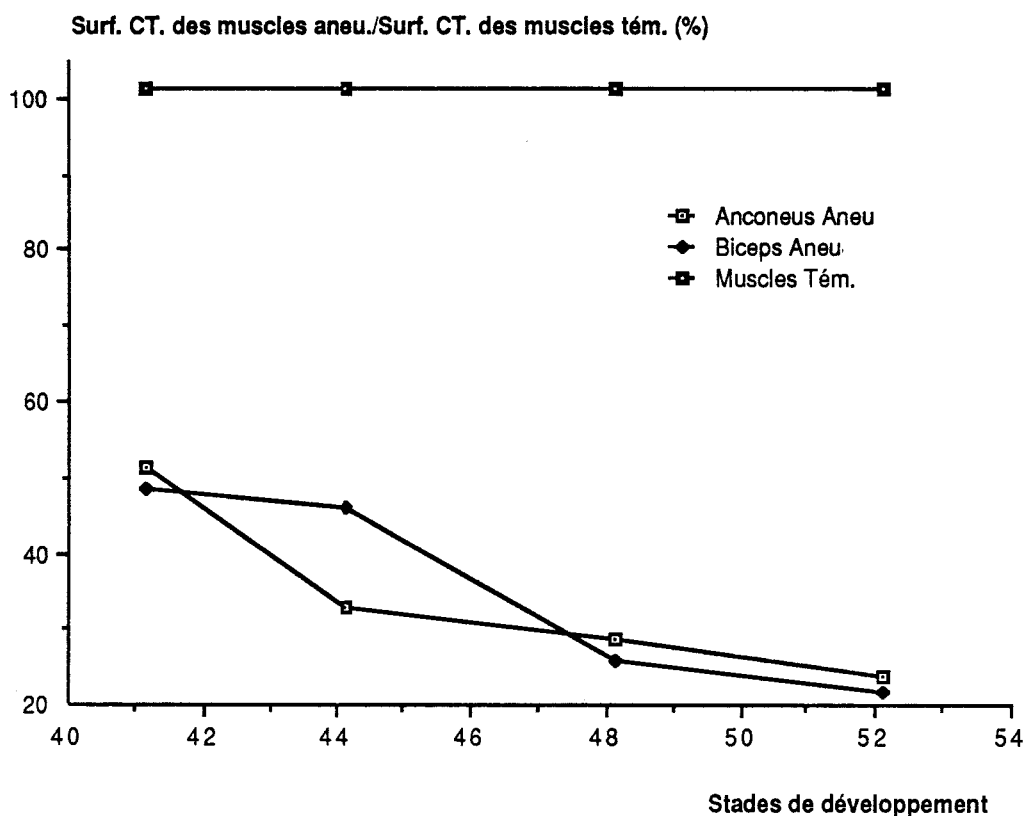


Figure 15 : Cas d'un seul échantillon. Variation des muscles aneurogéniques (Aneu.) par rapport aux muscles témoins (Tém.) dans la série B.

• du stade 41 jusqu'au stade 52, la surface de l'anconeus et celle du biceps du membre témoin augmentent respectivement de 8 fois et de 5 fois, alors que celles des muscles aneurogéniques n'augmentent que de 3,5 et 2 fois (fig. 16).

Surf. CT. des muscles (mm<sup>2</sup>)

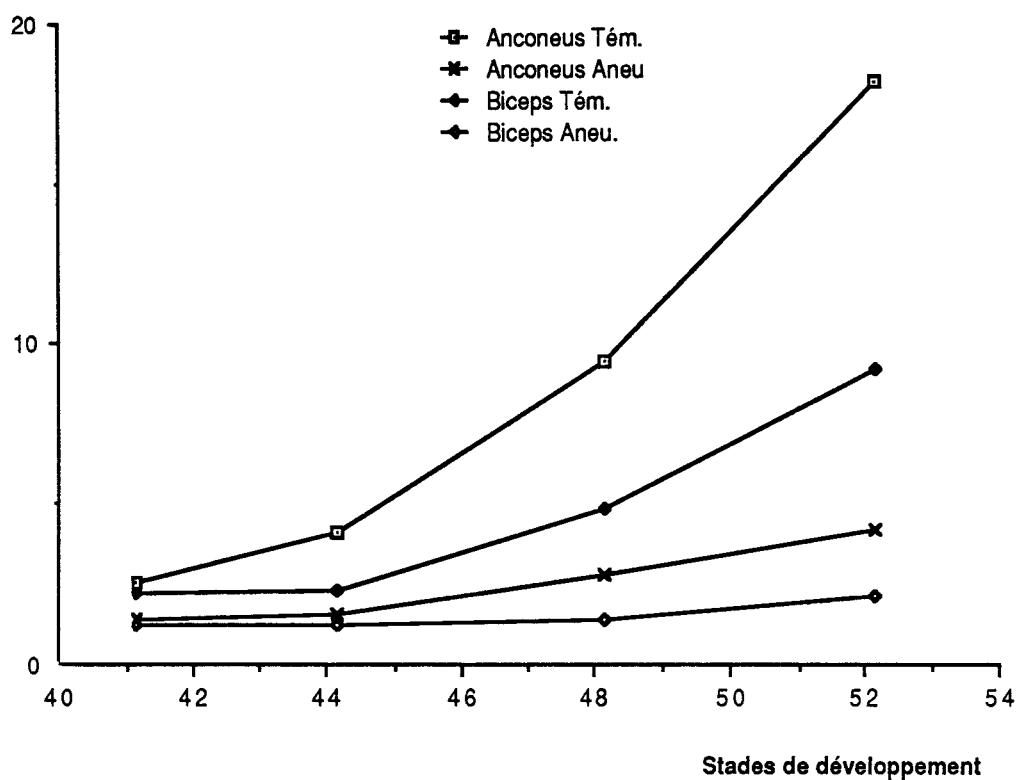


Figure 16 : Cas d'un seul échantillon.

Évolution des surfaces des coupes transversales (CT) de l'anconeus et du biceps des membres des parabioses, à différents stades de développement, dans la série B.

Les mêmes comparaisons ont été faites dans la série C, série des véritables aneurogéniques. (tab. 12, figs. 17 et 18 )



Cas d'un seul échantillon

Tableau 12 Série C. Evolution de la surface (en mm<sup>2</sup>) des coupes transversales (CT) de l'avant-bras et de ses constituants des membres témoins et "aneurogéniques" à différents stades de développement. La mesure est effectuée toutes les 4 coupes. Chaque chiffre correspond à la somme intégrée de la surface divisée par le nombre de coupes. La surface des tissus aneurogéniques comparée à celle des tissus normaux est indiquée en pourcentage.

Stades de Dvpt Tissus de membres	41			44			48			52		
	Témoin	Aneurog.	$\frac{\text{Aneur.}}{\text{Témoin}} \times 100$	Témoin	Aneurog.	$\frac{\text{Aneur.}}{\text{Témoin}} \times 100$	Témoin	Aneurog.	$\frac{\text{Aneur.}}{\text{Témoin}} \times 100$	Témoin	Aneurog.	$\frac{\text{Aneur.}}{\text{Témoin}} \times 100$
CT de l'avant-bras	33,4	24,6	73,6%	44,7	31,0	69,4%	111	41,4	37,3%	172,3	55,0	31,9%
Humérus	14,5	10,3	71,0%	20,0	16,6	83,0%	32,9	17,0	51,6%	48,5	17,9	36,9%
Ensemble Anconeus	2,1	1,2	57,1%	3,0	1,2	40%	10,8	2,3	21,3%	17,4	3,0	17,3%
Biceps	1,4	0,0		1,5	0,0		6,7	1,0	14,9%	10,5	1,3	12,3%

• ici, au stade 41, l'anconeus aneurogénique est à 57,1% de la surface totale de l'anconeus témoin (tab. 12, fig. 17), alors qu'il n'y a pratiquement pas de traces de biceps ; on trouve à son emplacement soit quelques cellules mésenchymateuses disséminées ici et là, soit une absence totale de cellules (tab. 12, fig. 17, PL. III-F).

• au stade 52, l'anconeus de l'aneurogénique est à 17,3% de la surface de l'anconeus innervé, alors que le biceps est à 12,3% du biceps témoin (tab. 12, fig. 17).

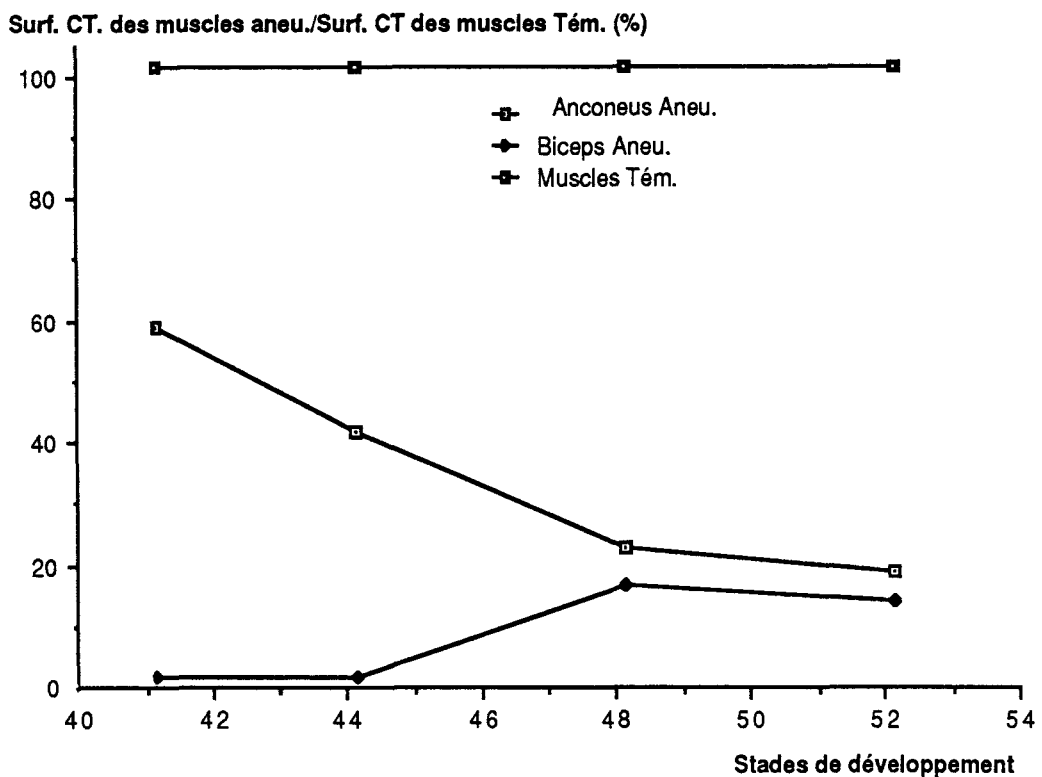


Figure 17 : Cas d'un seul échantillon.

Variation des muscles aneurogéniques (Aneu.) par rapport aux muscles témoins (Tém.) dans la série C.

• du stade 41 au stade 52, la surface de l'anconeus innervé est multipliée par 8, celle du biceps innervé par 7 ; alors que la surface de l'anconeus aneurogénique n'est multipliée que par 2,5 et celle du biceps aneurogénique a une croissance nulle (fig. 18, tab. 12).

Surf. CT. des muscles (mm<sup>2</sup>)

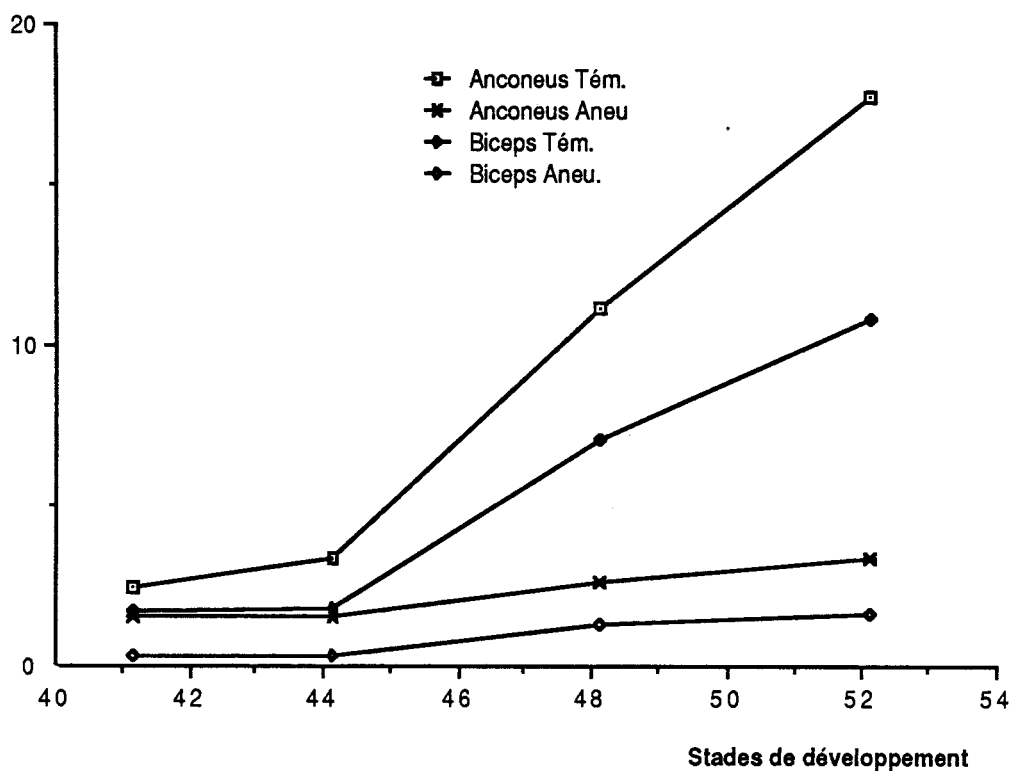


Figure 18 : Cas d'un seul échantillon.

Evolution des surfaces des coupes transversales (CT) de l'anconeus, du biceps des membres aneurogéniques (Aneu.) et témoins (Tém.), à différents stades de développement, dans la série C.

Au vu de ces résultats, on peut remarquer que le biceps semble être le muscle le plus sensible des deux muscles étudiés à l'environnement aneurogénique ; peut-être parce qu'il est moins important en volume que l'ensemble anconeus.

L'humérus n'est pas épargné ; bien que moins touché vers le début du développement (stade 40-41), il est presque réduit de moitié vers les stades 48 et 52 (tab. 11,12 ; fig. 19). Il est à noter que la structure de l'humérus n'est pas du tout atteinte par l'absence d'innervation.

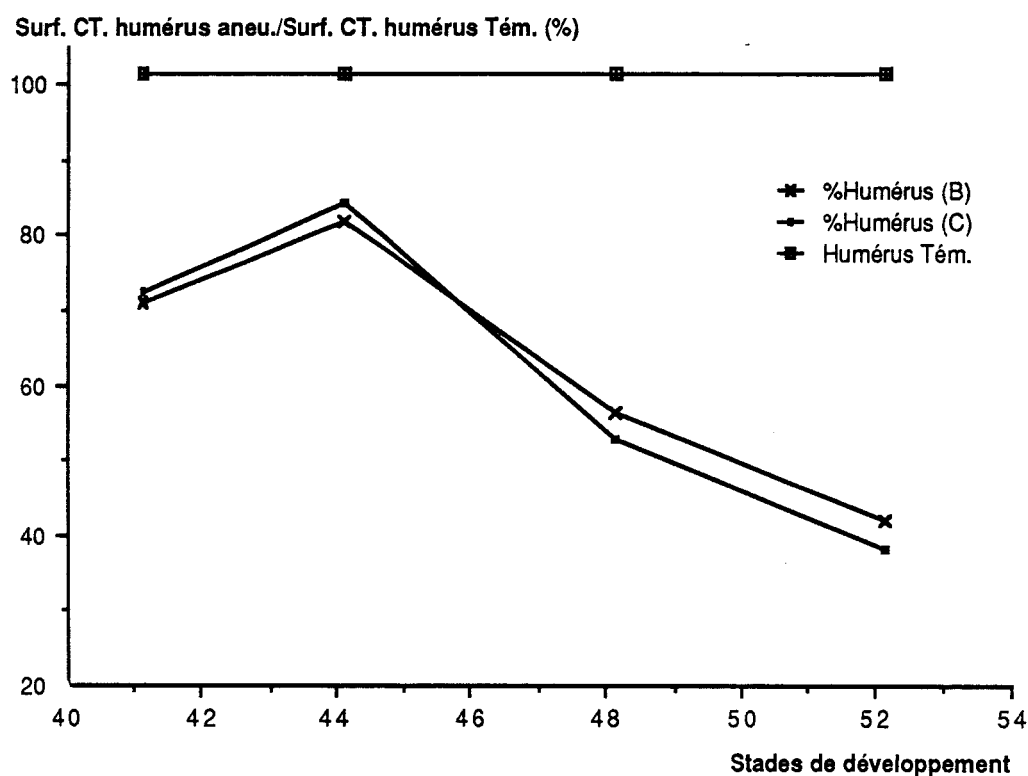


Figure 19 : Cas d'un seul échantillon.

Variation de la surface de l'humérus du membre aneurogénique par rapport à celui du membre témoin dans les séries B et C en fonction du stade de développement.

Les profils de la figure 20, relatifs à l'évolution de la surface des coupes transversales de l'avant-bras et de l'humérus des deux parabiontes par rapport aux stades de développement, sont quasiment identiques dans les deux séries.

Du stade 41 au stade 52, la surface de l'humérus innervé est multipliée par 5, ainsi que celle de l'avant-bras ; tandis que la surface de l'humérus des animaux aneurogéniques est multipliée par 3 et celle de l'avant-bras par 2 environ .

Surf. CT. de l'avant-bras et de l'humérus (mm<sup>2</sup>)

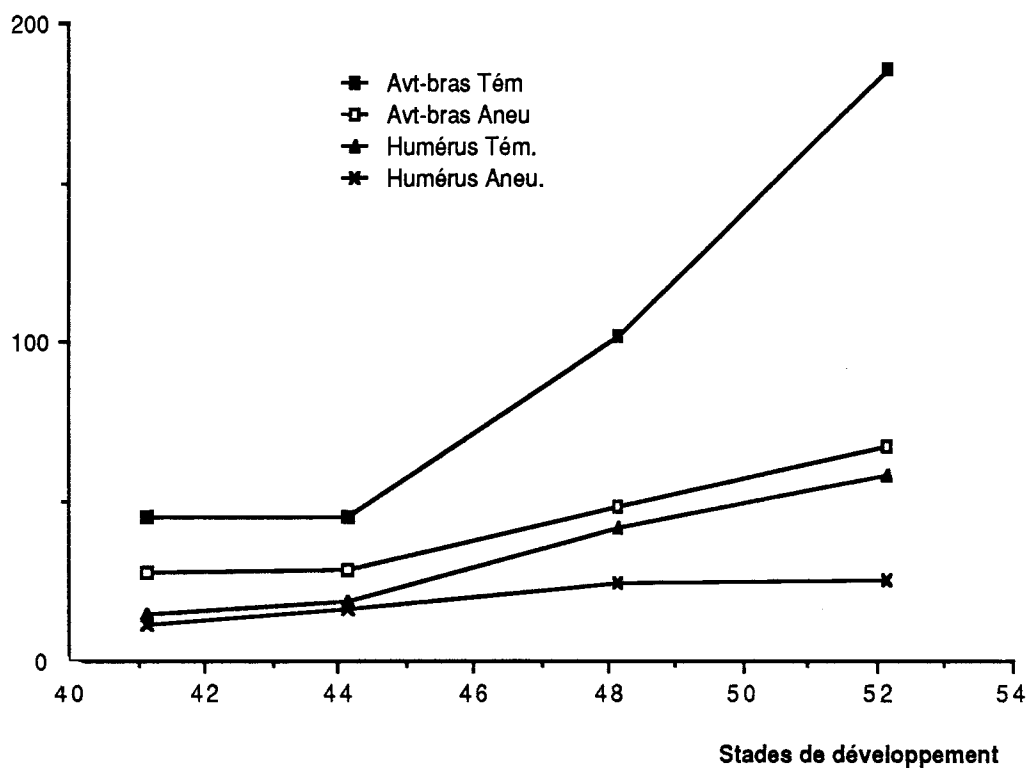


Figure 20 : Cas d'un seul échantillon.

Evolution de la surface des coupes transversales (CT) de l'avant-bras (Avt-bras) et de l'humérus des animaux aneurogéniques (Aneu.) et témoins (Tém) à différents stades de développement dans la série B.

Pour que tous ces résultats soient significatifs, il a fallu les généraliser. Ainsi, nous avons étudié plusieurs cas par stade.

## 2) Etude d'un ensemble d'échantillons par stade.

L'évolution des moyennes des surfaces des coupes transversales de différents tissus des membres normaux et dits "aneurogéniques" est représentée dans le tableau 13 pour la série B, dans le tableau 14 pour la série C.

Cas de plusieurs échantillons

Tableau 13 : Série B. Evolution de la surface (en mm<sup>2</sup>) des coupes transversales (CT) de l'avant-bras et de ses constituants des membres témoins et "aneurogéniques" à différents stades de développement .  
Chaque chiffre correspond à la somme intégrée de la surface divisée par le nombre de coupes.  
La surface des tissus aneurogéniques comparée à celle des tissus normaux est indiquée en pourcentage.

Stades de Dévpt Tissus de membres	41			44			48			52		
	Témoin	Aneurog.	$\frac{\text{Aneur.}}{\text{Témoin}} \times 100$	Témoin	Aneurog.	$\frac{\text{Aneur.}}{\text{Témoin}} \times 100$	Témoin	Aneurog.	$\frac{\text{Aneur.}}{\text{Témoin}} \times 100$	Témoin	Aneurog.	$\frac{\text{Aneur.}}{\text{Témoin}} \times 100$
CT de l'avant-bras (N) Nombre d'échant.	35,6 (5)	26,2	73,6%	43,3 (5)	30,9	71,4%	97,0 (3)	46,0	47,4%	179,3 (3)	65,0	36,3%
Humérus	13,4	8,8	65,7%	16,2	13,9	85,9%	39,2	23,2	59,2%	53,5	22,8	42,6%
Ensemble Anconeus	2,9	1,1	37,9%	2,5	1,1	44%	10,0	2,7	27,0%	16,0	3,9	24,4%
Biceps	1,3	0,5	38,5%	1,05	0,4	38,1%	4,8	1,2	25,0%	7,9	1,7	21,5%

Cas de plusieurs échantillons

Tableau 14 : Série C. Evolution de la surface (en mm<sup>2</sup>) des coupes transversales (CT) de l'avant-bras et de ses constituants des membres témoins et "aneurogéniques" à différents stades de développement .  
Chaque chiffre correspond à la somme intégrée de la surface divisée par le nombre de coupes.  
La surface des tissus aneurogéniques comparée à celle des tissus normaux est indiquée en pourcentage.

Stades de Tissus Dvp de membres	41			44			48			52		
	Témoin	Aneurog.	$\frac{\text{Aneur.}}{\text{Témoin}} \times 100$	Témoin	Aneurog.	$\frac{\text{Aneur.}}{\text{Témoin}} \times 100$	Témoin	Aneurog.	$\frac{\text{Aneur.}}{\text{Témoin}} \times 100$	Témoin	Aneurog.	$\frac{\text{Aneur.}}{\text{Témoin}} \times 100$
CT de l'avant-bras (N) Nombre d'échantil.	33,4 (5)	24,6	73,7%	56,2 (5)	30,7	54,6%	111,5 (2)	40,6	36,4%	165,8 (3)	55,0	33,2%
Humérus	14,0	10,3	73,6%	21,5	14,6	67,9%	33,7	14,9	44,2%	44,4	17,9	40,3%
Ensemble Anconeus	2,1	0,7	33,3%	4,03	1,2	29,8 %	11,0	2,3	20,9%	17,5	3,1	17,7%
Biceps	1,4	0	-	2,7	0,4	14,8%	5,8	0,8	13,8%	10,8	1,1	10,2%

Nous avons effectué les mêmes comparaisons sur l'évolution et la variation des surfaces des différents tissus des membres dits "aneurogéniques" ou "véritables aneurogéniques" par rapport aux tissus des membres témoins. La différence avec le cas d'un seul échantillon est pratiquement inexistante ; les profils des courbes sont identiques à quelques exceptions près. Ainsi, les figures 21 et 22, qui récapitulent respectivement les variations des muscles aneurogéniques par rapport aux muscles témoins et l'évolution des surfaces des coupes transversales des muscles des deux parabiontes à différents stades de développement, sont quasiment identiques aux figures 15 et 16 du premier exemple. Il en est de même pour les figures 23 et 24 et les figures 17 et 18 de la série C.

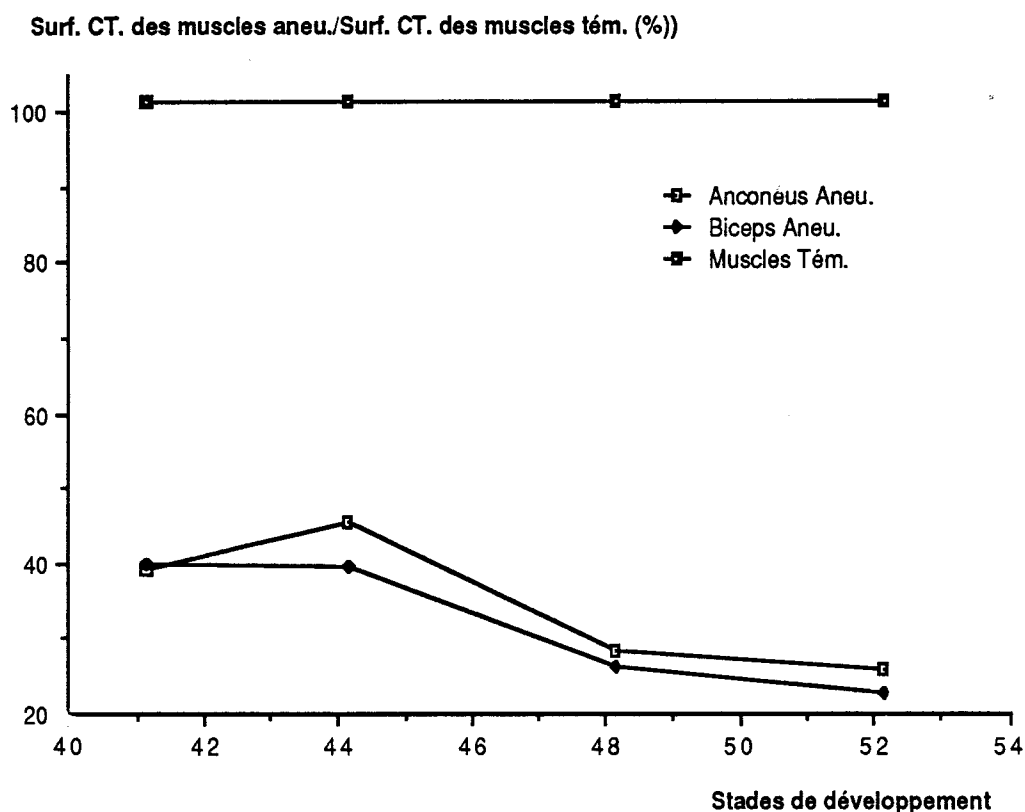


Figure 21 : Cas de plusieurs échantillons.

Variation des muscles aneurogéniques (Aneu.) par rapport aux muscles témoins (Tém.) dans la série B.



Surf. CT. des muscles (mm<sup>2</sup>)

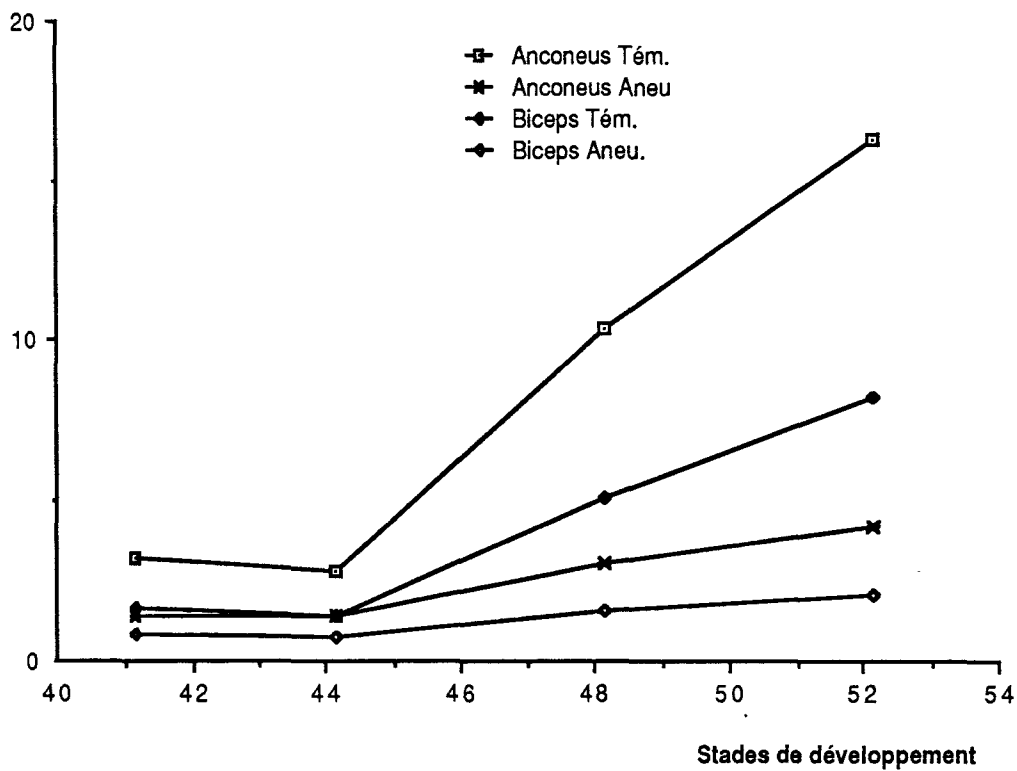


Figure 22 : Cas de plusieurs échantillons:

Evolution des surfaces des coupes transversales (CT) de l'anconeus et du biceps des membres des parabioses, à différents stades de développement, dans la série B.

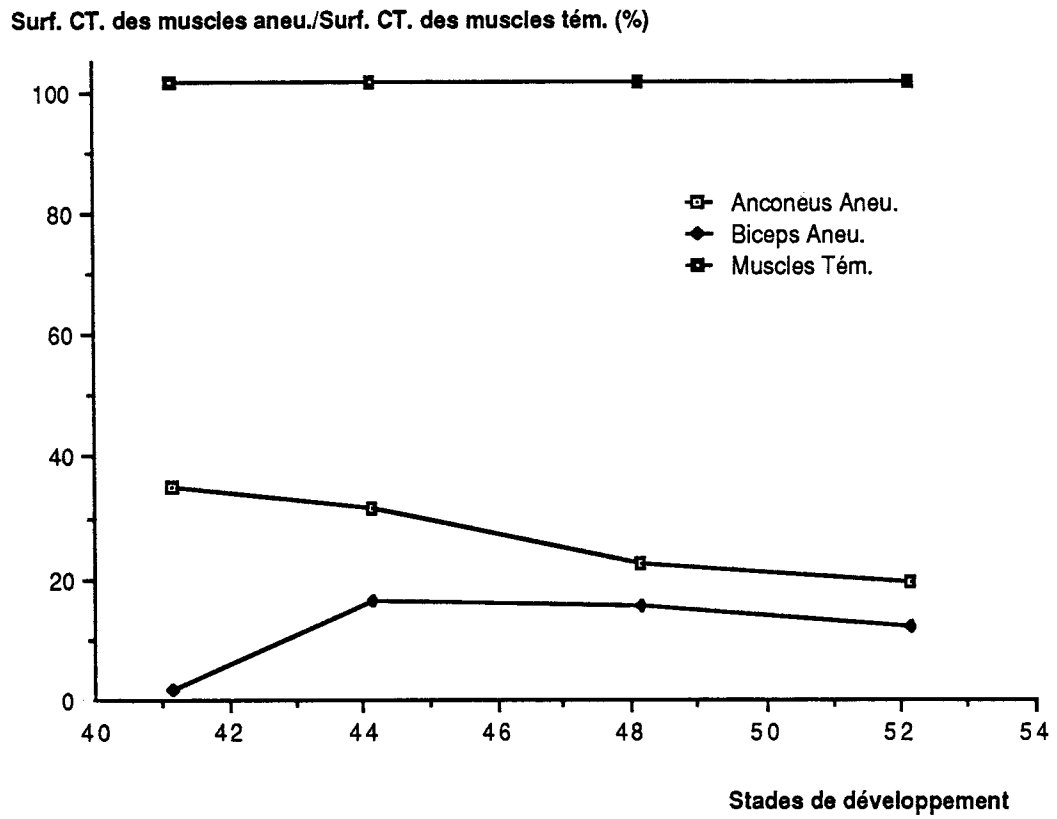


Figure 23 : Cas de plusieurs échantillons.  
Variation des muscles aneurogéniques (Aneu.) par rapport aux muscles témoins (Tém.) dans la série C.

Surf. CT. des muscles (mm<sup>2</sup>)

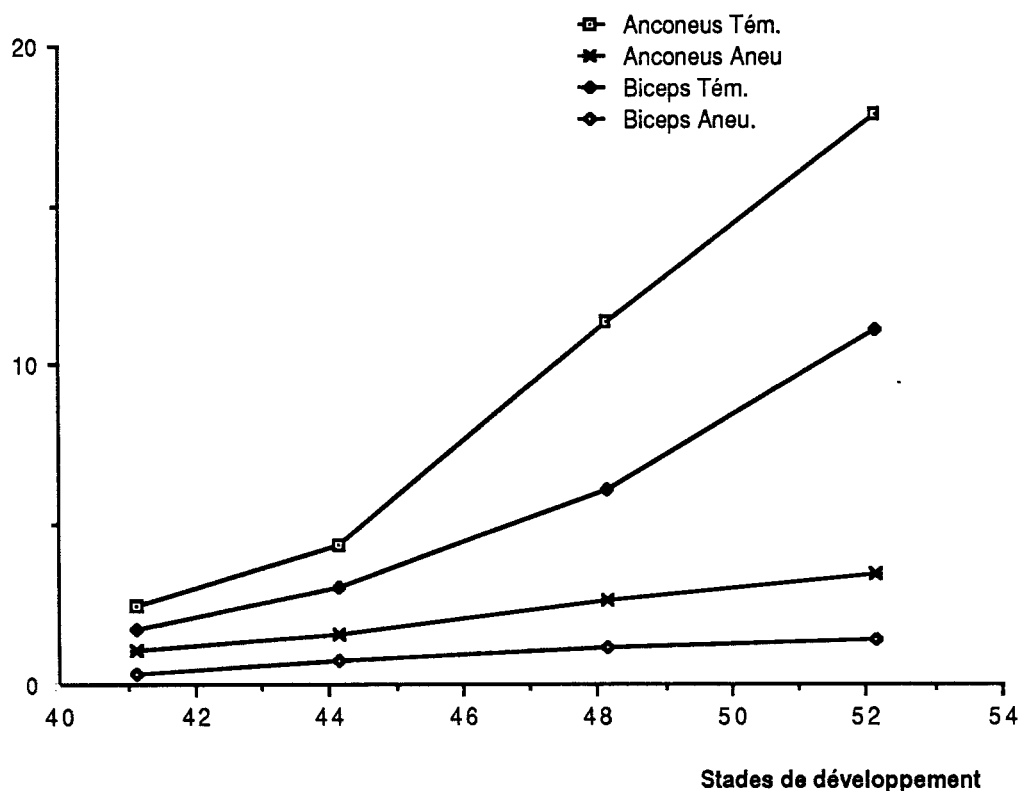


Figure 24 : Cas de plusieurs échantillons.

Evolution des surfaces des coupes transversales (CT) de l'anconeus et du biceps des membres aneurogéniques (Aneu.) et témoins (Tém.), à différents stades de développement dans la série C

Les figures 19 et 20 qui concernent l'humérus sont pratiquement identiques dans les deux cas. Cette absence significative d'écart importants entre les différents échantillons utilisés démontre l'homogénéité des manipulations que nous avons réalisées, et donc la fiabilité de nos résultats. D'où, la possibilité de comparer l'état des muscles dans la série B (muscles moins innervés ou rarement innervés) par rapport à ceux de la série C (muscles totalement aneurogéniques) (figs. 25 et 26)

Il apparaît nettement que les profils des courbes de la figure 25 sont quasiment identiques, il n'y a aucune différence significative entre les muscles des deux séries. Au tout début du stade du développement des muscles, l'anconeus est à environ 31% du muscle témoin dans les 2 cas, puis vers le stade 48, il atteint le tiers de la surface de l'anconeus témoin. Nous avons tout de même noté que l'anconeus aneurogénique de la série C a une baisse beaucoup plus prononcée que celui de la série B.

Variation de l'Ancon. Aneu./l'Ancon. Tem.(%)

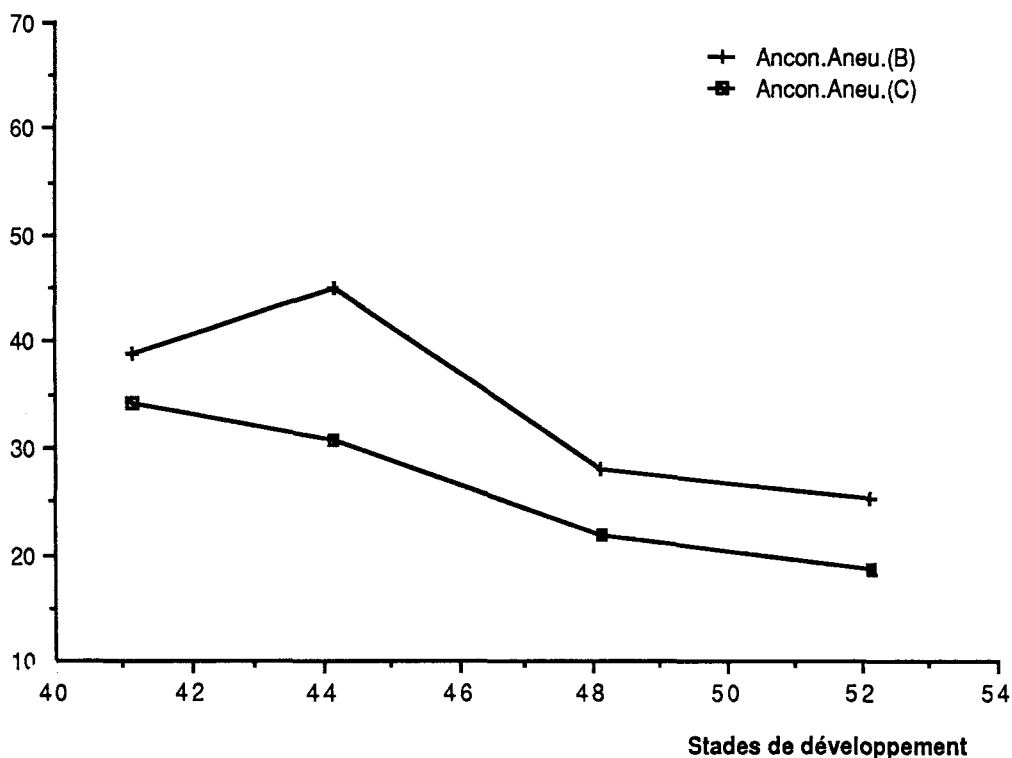


Figure 25 : Cas de plusieurs échantillons.

Comparaison de l'état de croissance de l'anconeus (Ancon.) aneurogénique (Aneu.) en pourcentage entre les deux séries (B) et (C).

Pour le biceps (fig. 26), au tout début (stade 41), le profil suivi par le muscle dans les deux séries est différent. Dans la série B, la surface du biceps aneurogénique est à environ 40% de celle du biceps témoin ; puis elle commence à décroître progressivement avant son décrochage net et important qui se produit entre les stades 44 et 48. La situation est très différente dans la série C : le biceps, pratiquement inexistant au tout début, apparaît entre le stade 42 et le stade 44. Son maximum de volume par rapport au même muscle chez le témoin est d'ailleurs atteint au stade 44, car à partir de ce stade, sa surface par rapport à celle de l'hôte commence à décroître.

La décroissance des muscles qui est plus importante dans la série C que dans la série B traduit la différence qui existe entre ces deux séries : l'existence de quelques rares fibres nerveuses dans la série B.

Variation du Biceps Aneu. / Biceps Tém. (%)

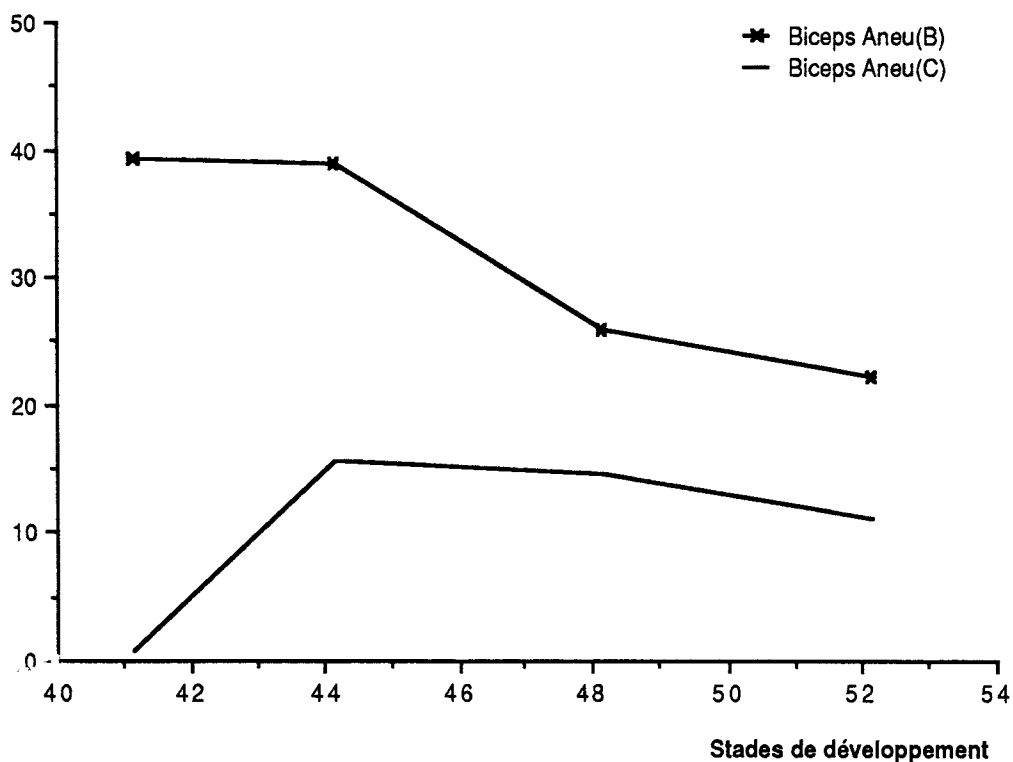


Figure 26 : Cas de plusieurs échantillons.

Comparaison de l'état de croissance du biceps aneurogénique (Aneu.) en pourcentage entre les deux séries B et C.

Nous avons conclu, au vu de nos résultats, qu'il existe une réponse différentielle des muscles anconeus et biceps à un environnement aneurogénique. Bien que structurellement intacte, la croissance de l'humérus du membre aneurogénique est sérieusement atteinte surtout dans les stades tardifs du développement.

## E) REGENERATION

Après l'amputation des membres d'Amphibiens, un blastème de régénération se forme très progressivement au niveau de la blessure. Les étapes de sa formation sont décrites dans divers ouvrages ou articles généraux (revue par WALLACE, 1981 ; revue par GERAUDIE et SINGER, 1984). Il est admis par la plupart des chercheurs, que la formation d'un blastème de régénération nécessite la présence d'une certaine quantité de fibres nerveuses au niveau du plan d'amputation (SINGER, 1946 , 1952 ; VAN STONE, 1955). Au contraire, un membre qui se développe en absence de nerfs (membre aneurogénique) peut ultérieurement régénérer sans nerfs (YNTEMA, 1959a, b ; THORNTON et STEEN, 1962; THORTON et THORNTON, 1970 ; FEKETE et BROCKES, 1987b, 1988).

Dans les expériences présentes, nous nous sommes demandés si un membre véritablement aneurogénique pouvait également régénérer. Ainsi nous avons procédé à l'amputation d'un membre aneurogénique et d'un membre normal qui servira de témoin. Après amputation, la plupart des animaux se sont nourris normalement, leur développement s'est poursuivi sans problème. Dans les conditions précisées dans le tableau 15 pour la série B et le tableau 16 pour la série C, qui récapitulent l'évolution morphologique des membres amputés, il apparaît que tous les membres dits aneurogéniques et tous les membres témoins amputés aux stades jeunes (stades 40 et 41) ont régénéré quelle que soit la série après un temps plus ou moins long (PL. V-B). Par contre, les membres dits véritablement "aneurogéniques" (série C) amputés à partir du stade 48 accusent un retard de régénération d'environ un mois par rapport à leurs homologues témoins. Cet écart se creuse davantage quand l'amputation a lieu vers les stades 50, 52. Nous avons longtemps cru à une incapacité de régénération de ces membres. En effet, ces membres sectionnés au niveau du tiers distal de l'humérus sont restés au moins 1 mois sans esquisser le moindre signe de régénération, on observait une cicatrisation, puis 5 jours après, la formation d'une petite pointe à peine visible à la place d'un vrai blastème de régénération (PL. VI-B). A 30 jours, alors que les régénérats témoins ont déjà un début de 4ème doigt aux membres antérieurs, certains régénérats des membres dits "véritables aneurogéniques" commencent à s'allonger (forme d'une palette), d'autres n'évoluent toujours pas (tab. 16, PL. VI-C). A 2 mois, dans certains cas, les régénérats des membres "véritables aneurogéniques" s'allongent mais ne forment pas de doigts (tab. 16). Nous les avons qualifiés de "pseudorégénérats". Par contre, d'autres commencent à former 2 puis 3 doigts vers le 70ème jour après amputation alors que l'animal dit "aneurogénique" s'est considérablement résorbé.

Tableau 15 : Série B. Evolution de la régénération des membres des parabioses après amputation.

	Stades au moment de l'amputation	Nombre de membres	Etat de régénération			
			16 jours	21 jours	47 jours	60 jours et plus
TEMOINS	2 doigts aux membres antérieurs (St. 40)	8	forme palette	ébauche du 3e doigt	4 doigts aux membres antérieurs	4 doigts aux membres antérieurs
	4 doigts aux membres antérieurs (St. 44)	3	forme palette	ébauche du 3e doigt	4 doigts aux membres antérieurs	4 doigts aux membres antérieurs
	3 doigts aux membres postérieurs (St. 51)	2	forme palette	ébauche du 3e doigt	4 doigts aux membres antérieurs	4 doigts aux membres antérieurs
ANEUROGENIQUES	2 doigts aux membres antérieurs (St. 40)	8	forme cylindrique	2 doigts aux membres antérieurs	4 doigts aux membres antérieurs	4 doigts aux membres antérieurs
	4 doigts aux membres antérieurs (St. 44)	3	forme cylindrique	2 doigts aux membres antérieurs	ébauche du 4e doigt	4 doigts aux membres antérieurs
	3 doigts aux membres postérieurs (St. 51)	2	forme cylindrique	2 doigts aux membres antérieurs	4 doigts aux membres antérieurs	4 doigts aux membres antérieurs

Tableau 16 : Série C. Evolution de la régénération des membres des parabioses après amputation.

	Stades au moment de l'amputation	Nombre de membres	Etat de régénération				
			16 jours	21 jours	37 jours	47 jours	60 jours et +
TEMOINS	2 doigts aux membres antérieurs (St. 40)	6	forme palette	ébauche du 3e doigt	4 doigts aux membres antérieurs	4 doigts aux membres antérieurs	4 doigts aux membres antérieurs
	4 doigts aux membres antérieurs (St. 44)	4	forme palette	ébauche du 3e doigt	4 doigts aux membres antérieurs	4 doigts aux membres antérieurs	4 doigts aux membres antérieurs
	3 doigts aux membres postérieurs (St. 51)	4	forme palette	2 doigts aux membres antérieurs	ébauche du 4e doigt	4 doigts aux membres antérieurs	4 doigts aux membres antérieurs
	4 doigts aux membres postérieurs (St. 52b)	3	forme palette	ébauche du 3e doigt	4 doigts aux membres antérieurs	4 doigts aux membres antérieurs	4 doigts aux membres antérieurs
"VRAIS" ANEUROGENIQUES	2 doigts aux membres antérieurs (St. 40)	6	forme cylindrique	Palette échancrée	3 doigts aux membres antérieurs	4 doigts aux membres antérieurs	4 doigts aux membres antérieurs
	4 doigts aux membres antérieurs (St. 44)	4	Pas de régénération (cicatrisation)	Pas de régénération	forme palette	3 doigts aux membres antérieurs	4 doigts aux membres antérieurs
	3 doigts aux membres postérieurs (St. 51)	4	Pas de régénération (cicatrisation)	Pas de régénération	Pas de régénération	Pas de régénération	Allongement des membres sans doigt (à 70 jours)
	4 doigts aux membres postérieurs (St. 52b)	3	Pas de régénération (cicatrisation)	Pas de régénération	Pas de régénération	Pas de régénération	Palette échancrée à 60 j. puis début 3e doigt à 68 j.



La morphologie des régénérats des membres dits "véritables aneurogéniques" (quand ils régénèrent) est très particulière. Ces régénérats sont très minces, effilés, raides et très transparents ; à tel point qu'on y observe même la vascularisation, par ailleurs très importante.

Pour des raisons d'ordre technique liées surtout à l'étude histologique, nous avons laissé les membres "aneurogéniques" régénérer au moins jusqu'au stade 3 doigts aux membres antérieurs. Ces régénérats sont ainsi coupés, fixés et colorés, soit par immunohistochimie, soit par coloration à l'argent. Nous avons ensuite mesuré, comme pour les membres en développement, la surface des coupes transversales de l'avant-bras et de ses constituants (humérus et muscles). Les résultats sont réunis dans le tableau 17 pour la série B et dans le tableau 18 pour la série C. Au vu de ces résultats, il n'apparaît aucune différence notable entre les membres "aneurogéniques" en développement et leurs régénérats ; on retrouve la petitesse du diamètre de l'avant-bras, la réduction, il est vrai, moins importante de l'humérus et le faible développement des muscles des régénérats "aneurogéniques" par rapport aux régénérats normaux.

L'examen immunohistochimique a montré dans certains régénérats de membres amputés tardivement l'existence de quelques filets de nerfs alors que le même membre, au moment de l'amputation, en était dépourvu. Ceci nous a amené à penser que les membres antérieurs des animaux initialement aneurogéniques ont pu être colonisés secondairement par le système nerveux. On constate, en effet, que lorsqu'on ampute un animal au stade 4 doigts aux membres postérieurs (stade 52b), le début de la régénération n'apparaît qu'environ 2 mois plus tard (tab. 16). Avec le vieillissement, l'animal opéré a très fortement tendance à être résorbé, à s'assimiler avec le porteur surtout au niveau troncal (Pl. VI-B-C), pour ne laisser apparaître que la tête et la queue. Dans ces conditions, on peut penser que les membres antérieurs de l'animal primitivement aneurogénique ont de fortes chances d'être colonisés par le système nerveux du porteur ; ceci expliquerait la présence de nerfs dans les régénérats de certains animaux âgés.

En définitive, on peut admettre que les membres dits "véritables aneurogéniques" amputés aux stades précoces de développement (stade 40, 41) régénèrent en l'absence totale d'innervation avec un retard d'environ 5 jours par rapport aux membres innervés. Amputés aux stades tardifs (stade 48, 50), ces membres ne régénèrent pas ou régénèrent difficilement après un temps très long avoisinant 70 jours.

Tableau 17 : Série B. Evolution de la surface des coupes transversales de l'avant-bras et de ses constituants des membres régénérés

Stades au moment de l'amputation	Nombre de jours de post-amputation	Nombre de membres	Moyenne de la surface des coupes transversales de l'avant-bras et de ses constituants en mm <sup>2</sup>						
			Avant-bras	Humérus	Humérus x100 Avant-bras	Anconeus	Anconeus x100 Avant-bras	Biceps	Bicepsx100 Avant-bras
4 doigts aux membres antérieurs (stade 44)	47 jours	2	282,9	35,5	12,5%	31,7	11,2%	13,1	4,6%
			132,6	28,5	21,5%	3,9	2,9%	0,7	0,5%
			46,9%	80,3%		12,3%		5,3%	
3 doigts aux membres antérieurs (stade 51)	60 jours	2	433,6	71,1	16,4%	57,2	13,2%	22,3	5,1%
			273,6	46,8	23,0%	13,1	6,4%	6,3	3,1%
			63,1%	65,8%		22,9%		28,3%	

Tableau 18 : Série C. Evolution de la surface des coupes transversales de l'avant-bras et de ses constituants des membres régénérés.

Stades au moment de l'amputation		Nombre de jours de post-amputation	Nombre de membres	Moyenne de la surface des coupes transversales de l'avant-bras et de ses constituants en mm <sup>2</sup>						
				Avant-bras	Humérus	Humérus x100 Avant-bras	Anconeus	Anconeus x100 Avant-bras	Biceps	Biceps x100 Avant-bras
2 doigts aux membres antérieurs (stade 40)	Témoins	37 jours	4	63,7	32,2	50,6%	4,5	7,1%	2,6	4,1%
	Aneurogéniques		4	49,8	25,2	50,6%	0	0	0	
	$\frac{\text{Aneurog.}}{\text{Témoins}} \times 100$			78,2%	78,3%					
4 doigts aux membres antérieurs (stade 44)	Témoins	47 jours	2	201,3	52,7	26,2%	19,0	9,4%	11,2	5,6%
	Aneurogéniques		2	60,2	19,0	31,7%	2,9	4,8%	1,5	2,5%
	$\frac{\text{Aneurog.}}{\text{Témoins}} \times 100$			29,9%	36,1%		15,3%		13,4%	
4 doigts aux membres antérieurs (stade 51)	Témoins	68 jours	2	435,8	75,5	17,4%	58,0	13,3%	23,0	5,3%
	Aneurogéniques		2	110,8	29,2	26,4%	6,4	5,8%	2,3	2,1%
	$\frac{\text{Aneurog.}}{\text{Témoins}} \times 100$			25,4%	38,7%		11,0%		10,0%	

## IV - DISCUSSION ET CONCLUSION

### A) OBTENTION DES VÉRITABLES ANEUROGÉNIQUES

Il nous a fallu trois tentatives différentes pour arriver à fabriquer des membres véritablement aneurogéniques.

La première tentative (série A) n'a pas été satisfaisante. L'insuffisance de l'ablation du tube nerveux au niveau rostral et la soudure très antérieure des deux parabiontes ont permis aux nerfs brachiaux de l'animal hôte de coloniser le membre antérieur de l'animal opéré, en traversant le lieu de soudure (PL. II-A- B- C). Ce résultat très intéressant semble confirmer l'hypothèse selon laquelle il existerait un mécanisme de guidage des nerfs, ces derniers retrouveraient toujours leurs cibles indépendamment de leur localisation. Cette hypothèse a été établie à partir des travaux effectués soit chez le poulet où l'on a réalisé des délétions proximales et distales des nerfs dans l'aile (STIRLING et SUMMERBELL, 1977), des inversions des trois premiers segments lombo-sacrés de la moelle épinière le long de l'axe antéro-postérieur (LANCE-JONES et LANDMESSER, 1980); soit chez les Urodèles sur lesquels WIGSTON (1986) a réalisé des modifications des positions des muscles cibles du membre.

La deuxième tentative (série B) n'a pas donné non plus les résultats escomptés. Les nerfs provenant des ganglions crâniens de l'animal opéré, sont venus coloniser leurs membres antérieurs. Toutefois, l'ablation plus antérieure du tube nerveux et la soudure postérieure des parabiontes sont telles que ces membres sont plutôt moins innervés que ceux de la série A.

Quant à la troisième tentative (série C), nous la considérons comme optimale. Le tube nerveux enlevé sur toute sa longueur et la soudure postérieure des animaux ont donné comme résultats des membres dépourvus totalement de nerfs. Ce sont des véritables aneurogéniques.

D'autres auteurs (YNTEMA, 1959a ; THORNTON et STEEN, 1962 ; EGAR et coll., 1973 ; FEKETE et BROCKES, 1987b) ont tenté de fabriquer des membres aneurogéniques en utilisant une procédure différente de la nôtre. Ils ont tout d'abord réalisé des parabioses et ensuite extirpé le tube nerveux à partir de la limite antérieure du cerveau postérieur (la limite du rhombencéphale-diencephale) jusqu'au 12ème somite. Les embryons d'*Axolotl* souvent utilisés étaient déjà au stade 29 ou 30 de la table de HARRISON (1924), ce qui correspond approximativement au stade 26 du Pleurodèle. Au stade 32 (stade 27 ou 28 chez le Pleurodèle), l'ectoderme incluant les placodes post-auditives et épibranchiales est enlevé. En utilisant cette technique, à quelques variantes près, ces auteurs ont obtenu des membres légèrement innervés proches de ceux de la série A ou B. Cette différence essentielle de technique nous permettra, par la suite, d'expliquer certaines divergences dans les résultats obtenus.

## B) CROISSANCE DES MEMBRES

L'indice mitotique mesuré sur les jeunes bourgeons des membres antérieurs d'animaux "aneurogéniques" ou normaux est identique. Ceci démontre que pendant les premiers stades de développement et au moins jusqu'au stade 39, le système nerveux n'est pas nécessaire à la formation du membre. Plusieurs auteurs ont rapporté des résultats similaires dans des espèces variées YNTEMA (1959a), THORNTHON et THORNTHON (1970), TWEEDLE et coll.(1974), POPIELA (1976), FEKETE et BROCKES (1987b) chez les Amphibiens ; BUTLER et coll. (1982), FISZMAN et coll. (1983) et BONNER (1987) chez le poulet. Ceci signifie que si la croissance du bourgeon de membre nécessite des facteurs trophiques, ceux-ci ne seraient pas d'origine nerveuse.

Cependant, à partir du stade 41, les membres aneurogéniques ont une croissance ralentie, et un volume moins important que celui des membres normaux. Ce ralentissement de la croissance des membres est d'autant plus important que l'on avance dans le développement (tab. 11 et 12). De plus, l'examen histologique de ces membres révèle que ce sont surtout les muscles qui sont atteints. Le système nerveux a donc un rôle trophique sur la croissance des cellules du membre en développement à partir des stades de la différenciation musculaire. En effet, chez le Pleurodèle, ZENJARI (1987) a montré en microscopie électronique la présence des nerfs à la base du bourgeon de membre antérieur au stade 35-36 et à l'intérieur du bourgeon de membre au stade 38 dans une position distale par rapport au site où débute la différenciation musculaire. Au stade 41, le membre antérieur possède 2 doigts bien individualisés, des muscles bien différenciés et un réseau nerveux susceptible d'intervenir dans le développement. Lors de notre étude, l'évolution de la croissance musculaire au sein des membres des véritables aneurogéniques est résumée dans le tableau 12. On voit qu'au stade 41-42, la quantité des muscles présents est fortement réduite ou inexistante. En fait, les difficultés inhérentes à la délimitation et à l'état de différenciation de ces muscles font que les valeurs rapportées dans le tableau 12 ont pu être surestimées.

Pour interpréter ces résultats, deux explications semblent possibles :

1) l'absence de formation de véritables muscles aux stades précoces de développement en absence totale d'innervation. Si cette explication est juste, cela veut dire que les fibres nerveuses qui envahissent les cellules mésenchymateuses indifférenciées du bourgeon de membre normal joueraient un rôle trophique sur la multiplication et la différenciation de ces cellules. Ainsi, les membres aneurogéniques dépourvus totalement d'innervation n'auraient pas la quantité de matériel nécessaire à la formation et à la différenciation normales des muscles. Aux stades plus avancés, ces cellules mésenchymateuses se positionneraient en lieu et place des muscles et formeraient les amas cellulaires décrits précédemment.

2) la dégénérescence des muscles. Il est en effet possible qu'il y ait formation initiale des muscles en absence d'innervation et que ceux-ci dégèrent au cours de la différenciation secondaire par manque de nerfs. Cette dégénérescence serait d'autant plus rapide si le membre est totalement dénervé d'où l'absence totale des muscles au stade 41.

Cette deuxième hypothèse ne rend pas compte de la présence de muscles aux stades 48 ou 50. Par contre, elle est en accord avec de nombreux travaux faits essentiellement chez le poulet LANDMESSER et MORRIS (1985), BUTLER et coll. (1982), FISZMAN et coll. (1983), revus par MILLER et coll. (1985), MILLER et STOCKDALE (1986), BONNER (1987). Chez les Amphibiens, les résultats ne sont pas aussi nets et convaincants. Deux séries de travaux sont néanmoins en faveur de cette deuxième hypothèse ; ceux de TWEEDLE et coll. (1974) qui ont montré et suivi, en ultrastructure, l'atrophie des muscles des membres aneurogéniques dès le stade 3 doigts chez *Ambystoma opacum* ; et ceux de POPIELA (1976) chez *Ambystoma maculatum*. Par contre, les travaux de YNTEMA (1943) de EGAR et coll. (1973) ou plus récemment de FEKETE et BROCKES (1987b, 1988) semblent discutables puisque leurs membres aneurogéniques sont partiellement innervés, les nerfs qui s'y trouvent peuvent donc servir de support trophique à une éventuelle différenciation initiale des muscles

Nos résultats sur les membres "véritables aneurogéniques" penchent plutôt pour la première explication. Ainsi, nous suggérons que la formation des muscles chez le Pleurodèle est précoce, qu'il faut pour cela un matériel mésodermique suffisant. Ce matériel mésodermique se met en place au tout début du développement indépendamment du système nerveux ; il peut être soutenu par le facteur de croissance non neural libéré par ces mêmes cellules (FEKETE et BROCKES, 1987b, 1988). A un stade bourgeon âgé, ce matériel a besoin d'un support trophique neural pour se maintenir, s'organiser et se différencier en véritables muscles.

La croissance de l'humérus est également ralentie dans les membres aneurogéniques par rapport aux membres témoins. L'absence de nerfs à un effet sur le développement des os, contrairement à ce qui a été dit par d'autres chercheurs (YNTEMA, 1959a ; THORNTON et STEEN, 1962 ; POPIELA, 1976). DIETZ (1987), dans son article sur les effets des nerfs périphériques sur le développement des muscles et des os des membres de *Rana pipiens*, a d'ailleurs constaté l'effet du système nerveux sur les os, plus précisément sur la longueur et le diamètre des os ; la structure des os n'étant pas du tout altérée.

### C) REGENERATION

Dans tous les cas, quelle que soit la série, les membres amputés cicatrisent. Mais la régénération proprement dite varie en fonction de la série opératoire.

Ainsi, dans la série B, les membres aneurogéniques amputés régénèrent mais avec un retard d'environ 5 jours par rapport aux membres témoins. Les autres auteurs (YNTEMA, 1959b ; THORNTON et THORNTON, 1970 ; EGAR et coll., 1973 ; FEKETE et BROCKES, 1987b) ont eu 2 à 3 jours de retard avec la régénération des membres d'*Axolotl* partiellement innervés. Cet ensemble de faits concordants, portant sur des membres partiellement innervés, laisse supposer que les fibres nerveuses présentes interviendraient dans leur régénération. Qu'en est-il au niveau des membres totalement dénervés ?

Dans la série des "véritables aneurogéniques" (série C), les membres amputés au stade 2 doigts (stade 41) régénèrent avec un retard de quelques jours ; ce retard peut atteindre une soixantaine de jours dans le cas où l'amputation est réalisée à des stades plus âgés (tableau 16). Ce type d'expérience montre que les membres dépourvus de nerfs sont capables de régénérer mais avec un retard considérable, ce qui plaide en faveur du rôle trophique joué par le système nerveux dans une régénération normale. S'il est vrai que les membres des animaux de la série C amputés très tôt régénèrent en absence d'innervation, ceux amputés à partir du stade 48 ne régénèrent pas dans les conditions habituelles d'expériences ; ils ne régénéreront que 2 mois plus tard, d'où la présence nécessaire du système nerveux (PL. VI-B) pour une régénération normale.

## **DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES**



## DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES

Il est établi que la régénération des membres d'Urodèles ne peut s'effectuer qu'en présence de nerfs dont le premier rôle est de stimuler la prolifération des cellules blastémales. Des nombreuses études faites sur cette dépendance nerveuse est née l'idée de la nécessaire intervention d'un facteur neurotrophique (SINGER, 1952). En ce qui concerne le membre, toutes les études faites ces dernières années à propos des facteurs de croissance nerveux, des extraits nerveux purifiés ou non ou des tissus du système nerveux l'ont été sur les blastèmes de régénération.

Paradoxalement, aucune recherche de ce genre n'a été entreprise sur les bourgeons de membres en développement. C'est pourquoi nous nous sommes proposés de vérifier si un agent neurotrophique intervient chez les jeunes larves de Pleurodèle en étudiant son rôle éventuel sur la croissance et le développement des bourgeons de membres aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Dans un premier temps, nous avons constaté que l'amputation du bourgeon de membre se caractérise par une baisse importante de l'indice de prolifération de ses cellules. L'association *in vitro* d'un facteur de croissance d'origine nerveuse, le BDGF I, et d'un bourgeon de membre de Pleurodèle en développement provoque une augmentation de la prolifération cellulaire. Mais cette augmentation est restée largement en deçà de l'indice de prolifération des bourgeons non amputés. Cet écart est en partie imputable à l'effet de l'amputation et aux conditions de cultures. Il n'empêche que l'effet certes stimulateur du BDGF I est resté faible et très inférieur à celui qu'il exerce sur les blastèmes de régénération. Cette insuffisance pourrait être due au fait que le BDGF I n'est pas un facteur efficace, susceptible de se substituer au système nerveux, ou encore que ce dernier n'intervient pas seul ou plus simplement qu'il n'intervient pas du tout dans la croissance du membre pendant les stades précoces de développement.

Au lieu de mimer l'effet du système nerveux par des facteurs de croissance nerveux, nous avons, dans un deuxième temps, réalisé des co-cultures entre le système nerveux et les bourgeons de membres en développement. L'augmentation de l'indice de prolifération que nous avons obtenue n'a pas été meilleure que dans le cas précédent. Ce dernier résultat ne fait que confirmer l'idée émise précédemment, à savoir que le système nerveux jouerait un rôle partiel ou nul dans la croissance des jeunes bourgeons. La baisse des synthèses des macromolécules constatée lors de l'explantation des bourgeons de membres serait une conséquence de l'isolement du bourgeon de son environnement, et donc du manque de facteurs trophiques non nerveux diffusant au niveau des cellules du bourgeon ou circulant dans le sang. Ainsi le facteur neurotrophique de SINGER (1952), qui agit pendant les

premières phases de la régénération des blastèmes de membres ou d'autres appendices, n'a aucune influence sur la croissance primaire du bourgeon de membre. Il est d'ailleurs connu que la seule différence importante entre le bourgeon de membre en développement et le blastème de membre en régénération est la présence au niveau de ce dernier de fibres nerveuses au plan d'amputation ; ces fibres nerveuses, en quantité suffisante, relarguent un facteur neurotrophique qui agit sur les cellules du blastème. Il était donc possible de penser que les nerfs, qui se trouvent à la base du bourgeon de membre au stade 35 ou 36, puissent également influencer la croissance des cellules par l'intermédiaire d'un ou des facteurs neurotrophiques. Au vu de nos résultats, ces nerfs n'ont aucun rôle pendant les premiers stades de développement et ils ne sécrètent aucun facteur susceptible d'agir sur les cellules du bourgeon de membre. D'où cette différence entre nos résultats et ceux obtenus par la plupart des chercheurs qui ont travaillé sur le blastème de régénération ; ce dernier répondant d'une façon très significative à la présence de facteurs de croissance (MESCHER et LOH, 1981 ; ALBERT et coll., 1987), d'extraits de tissus nerveux (CHOO et coll., 1978 ; CARLONE et FORET, 1979 ; ALBERT et BOILLY, 1986 ; BOILLY et ALBERT, 1988a, b) ou de tissus nerveux en culture *in vitro* (GLOBUS, 1978 ; BAUDUIN, 1983 ; LASSALLE et coll., 1985) ; tandis que les bourgeons de membre répondent d'une façon très modérée.

Grâce aux cultures des secteurs dorsaux, isolés au stade bourgeon caudal, le développement du membre a pu être suivi dès sa phase initiale. Avec ou sans tube nerveux, les bourgeons se sont développés au même rythme que celui des témoins, on peut ainsi conclure que pendant cette première étape, du moins jusqu'au stade 36, la prolifération des cellules du bourgeon est indépendante du système nerveux.

La réalisation des membres que nous qualifions de "véritables aneurogéniques" a permis de suivre l'évolution de leur croissance en absence de toute innervation de manière continue depuis leur apparition jusqu'au stade 4 doigts. Jusqu'au stade palette échancrée (st. 39), les membres antérieurs aneurogéniques se sont développés normalement sans difficulté aucune comme leurs homologues innervés, tant sur le plan morphologique qu'au niveau de la prolifération cellulaire appréciée par l'étude de l'indice mitotique. Ceci confirme et précise la conclusion précédente : les premières étapes du développement du membre, du moins jusqu'au stade 39, sont indépendantes du nerf. Au-delà de ce stade, on constate un ralentissement de la croissance se traduisant par une diminution de la surface moyenne des muscles, des os et du membre dans son ensemble. Dès le stade 2 doigts bien formés (st. 41), nous avons pu constater certains cas d'atrophie musculaire pouvant aller jusqu'à l'absence complète de muscles, plus particulièrement au niveau du biceps. Au cours de cette seconde étape, la croissance et la différenciation (du moins celle des muscles) deviendraient dépendantes du nerf.

En résumé, il apparaît que

- le rôle du système nerveux sur l'indice de prolifération du bourgeon de membre est effectif *in vitro* mais son action n'est pas indispensable pour la croissance des membres aux stades précoces de développement, comme elle l'est pour la régénération du membre,

- la formation initiale des fibres musculaires serait précocement établie indépendamment du système nerveux ; elle pourrait dépendre d'autres facteurs de source non neurale, mais l'organisation de ces cellules musculaires en véritables amas musculaires dépendrait du système nerveux,

- les amas musculaires ont besoin, à partir d'un certain stade, du système nerveux pour se maintenir et pour continuer leur croissance, sinon ils dégénèrent. La vitesse de dégénérescence est fonction de la qualité des aneurogéniques ; dans la série C, "véritables aneurogéniques", nous avons eu des membres dépourvus totalement de muscles dès le stade 41, attestant ainsi de la rapidité de la dégénérescence en absence totale d'innervation.

Les membres aneurogéniques amputés à des stades relativement jeunes (jusqu'au stade 42) régénèrent sans difficulté hormis un retard de quelques jours par rapport aux témoins innervés. Ce résultat est identique à celui obtenu par YNTEMA (1959a, b), THORNTON et THORNTON (1970), FEKETE et BROCKES (1987b). Par contre, quand l'amputation est réalisée à partir du stade 46-48, la formation du régénérat ne se produit pas avant une soixantaine de jours.

Par rapport à celles d'autres auteurs, nos expériences se caractérisent par deux aspects :

- nous avons l'assurance que les membres des animaux de la série C sont dépourvus de nerfs.

- les amputations réalisées sur des membres antérieurs au stade 4 doigts ont permis de constater l'absence de régénération par rapport aux témoins pendant au moins 2 mois.

La comparaison des résultats des séries B et C montre que plus un membre est pauvre en nerfs, plus sa régénération est difficile à obtenir. Elle peut néanmoins se réaliser après un délai extrêmement long. Ceci confirme bien le rôle trophique joué par le système nerveux dans la régénération.

En définitive, notre conclusion rejoint, tout en apportant des précisions, celle de YNTEMA, THORNTON ou FEKETE et BROCKES selon lesquels un membre dépourvu de système nerveux est capable de régénérer. Nous ajoutons que cette régénération n'est possible que dans certaines conditions liées à l'âge de l'animal au moment de l'amputation, mais que la présence du système nerveux la favorise grandement.

Ainsi, sous certains aspects, le bourgeon de membre en développement et le blastème de régénération, qui ont souvent fait l'objet de comparaisons, peuvent être considérés comme équivalents dans la mesure où ils sont capables de former les mêmes structures. Le meilleur argument en faveur de cette similitude réside dans le fait que le blastème peut se substituer au bourgeon en développement, et vice versa, dans la formation de membres surnuméraires (MUNEOKA et BRYANT, 1982). Mais il existe aussi des différences, plus particulièrement dans le domaine nous concernant, au niveau du rôle du système nerveux dans le contrôle de la croissance. Toutes nos expériences montrent que le début de la croissance et du développement du membre s'effectue sans système nerveux. Par contre, la dépendance de la régénération au système nerveux est reconnue depuis les travaux de TODD (1823). La capacité d'un membre dit "aneurogénique" ou

"véritable aneurogénique" à régénérer, mise en évidence par YNTEMA (1959a, b) et confirmée par nos travaux, est apparue comme un paradoxe qui a fait l'objet de diverses explications. Celle qui est la plus généralement admise propose qu'en absence de nerfs, les cellules du membre sont sensibles à un facteur de croissance dont la synthèse ou l'efficacité est réduite en présence de nerfs, la prolifération des cellules devient alors sous la dépendance des nerfs qui se comportent à leur tour comme source de facteur.

Récemment, FEKETE et BROCKES (1987a, b) ont envisagé le problème sous un autre angle en utilisant un anticorps monoclonal (appelé 22/18) obtenu chez la souris à partir des cellules blastémales d'un triton adulte, *Notophthalmus viridescens*. Cet anticorps a le mérite d'identifier les cellules blastémales dont la division dépend de nerfs. Ainsi, chez le Pleurodèle, alors que les cellules blastémales normales réagissent positivement à l'anticorps, les cellules mésenchymateuses du bourgeon de membre en développement ne répondent effectivement qu'à partir du stade 39, ce qui correspond à la colonisation du bourgeon par les filets nerveux. Ainsi FEKETE et BROCKES ont émis deux hypothèses pour tenter d'expliquer cette transition de l'état 22/18 négatif à l'état 22/18 positif d'un bourgeon de membre amputé : la première est que l'expression de l'antigène 22/18 serait liée à un changement selon lequel la régulation embryonnaire céderait sa place à une régénération épimorphique. La deuxième possibilité est que les nerfs joueraient un rôle critique dans l'origine et la prolifération ultérieure des cellules blastémales.

En 1988, ces mêmes auteurs ont montré que les cellules des régénérats obtenus à partir des membres aneurogéniques chez le Pleurodèle, ne réagissent pas avec l'anticorps. Ils ont ainsi conclu, après une série d'expériences, qu'il existe une différence moléculaire entre les cellules blastémales des membres normaux et celles des membres aneurogéniques, ces dernières étant semblables à celles des bourgeons de membres non encore innervés.

Cet ensemble de résultats se superpose à celui que nous avons obtenu chez le même Urodèle ; au cours d'une première phase de développement, le bourgeon de membre croît indépendamment du système nerveux, il en est de même chez les membres aneurogéniques. Ultérieurement, dans les deux cas, le système nerveux joue un rôle trophique.

En définitive, les résultats et les conclusions obtenus sur les blastèmes de régénération de membre normal d'une part, et ceux obtenus sur le bourgeon de membre normal ou aneurogénique et sur le blastème de régénération de membre aneurogénique d'autre part, ne peuvent pas être superposés.

Une étude biochimique de la production autocrine des facteurs de croissance non nerveux, semblable à celle faite dans les bourgeons de membres normaux par POLLACK (1981) et dans les blastèmes de régénération de membres adultes par BOILLY (1988), pourrait être réalisée sur les bourgeons de membres aneurogéniques et leurs blastèmes de régénération. Cette étude compléterait aussi bien ce travail, que celle qui pourrait être entreprise sur la nature du contrôle de la prolifération des cellules du membre à l'échelon moléculaire.

## BIBLIOGRAPHIE

- ALBERT P. et BOILLY B., (1986). Evolution *in vitro* de cellules de blastèmes de régénération de membre d'Axolotl : influence de l'insuline et d'extraits nerveux sur la prolifération cellulaire. *Biology of the Cell.*, **58**, 251-262.
- ALBERT P., BOILLY B., COURTY J. et BARRITAUULT D., (1987). Stimulation in cell culture of mesenchymal cells of newt limb blastemas by EDGF I or II (basic or acidic FGF). *Cell Diff.*, **21**, 63-68.
- AMANO H., (1960). Role of the somitic tissue in the limb development of the urodel an Amphibia. *Arch. Biol. (Liège)*, **71**, 343-366.
- AMANO H., (1962). Analyse du développement des membres après exogastrulation partielle. *Arch. Biol. (Paris)*, **73**, 205-223.
- AMPRINO R., (1984). The development of the vertebrate limb. *Clinical Orthop.*, **188**, 263-284.
- BALINSKY B.I., (1931). Zur Dyamik der Extremitätenknospenbildung. *Wilhelm Roux Arch. EntwMech. Org.*, **123**, 565-648.
- BALINSKY B.I., (1935). Selbstdifferenzierung der Extremitätenmesoderms im interplant. *Zool. Jahrb. Abt. Allgem. Zool. Physiol. Tiere*, **54**, 327-348.
- BARRITAUULT D., PLOUET J., COURTY J. et COURTOIS Y., (1982). Purification, characterisation and biological properties of the eye-derived growth factor from retina : Analogie with brain derived growth factor. *J. Neurosc. Res.*, **8**, 477-490.
- BAUDUIN B., (1983). *Etude du mode d'action du système nerveux par la contribution de la culture organotypique sur la régénération du membre de triton*. D.E.A., Lille I.
- BOILLY B., OUDKHIR M. et LASSALLE B., (1985). Rôle du système nerveux sur la prolifération cellulaire des blastèmes de régénération de membre de triton (*Pleurodeles waltlii* Michah). *Develop. Growth and Differ.*, **27**, 129-135.
- BOILLY B., (1988). Production of growth factors by the blastema during limb regeneration of Urodèles (Amphibia). *Recent Trends in Regeneration Research*. (in Press).
- BOILLY B. et ALBERT P., (1988a). Control of blastema cell proliferation during axolotl limb regeneration : *in vitro* cell culture study. *Monogr. devl. Biol.*, **21**, 1-8.
- BOILLY B. et ALBERT P., (1988b). Blastema cell proliferation *in vitro* : effects of limb amputation on the mitogenic activity of spinal cord extracts. *Biology of the Cell.*, **62**, 183-187.
- BONNER P.H., (1987). Myoblast differentiation is induced by nerve transplanted to chick embryo legs. *J. Exp. Zool.*, **243**, 63-70.

- BOURGEOIS N.M. et HOUBEN J.J.G., (1975). Morphogenèse primordiale du membre antérieur et ses aspects histochimiques chez le Pleurodèle et l'Axolotl. *C.R. Acad. Sc. Paris*, **280**, 2037-2040.
- BOURGEOIS N.M., (1977). Les aspects structuraux et histochimiques de la différenciation squelettique précoce du mésoblaste des bourgeons de membres antérieurs chez le Pleurodèle. *Arch. Biol. (Bruxelles)*, **88**, 305-332.
- BRYANT S. V. et ITEN L. E., (1976). Supernumerary limbs an amphibians : Experimental production in *Notophthalmus viridescens* and a new interpretation of their formation. *Develop. Biol.*, **50**, 212-234.
- BUTLER J., COSMOS E. et BRIERLEY J., (1982). Differentiation of muscle fiber types in aneurogenic brachial muscles of the chick embryo. *J. Exp. Zool.*, **224**, 65-80..
- CARLONE R. L. et FORET J. E., (1979). Stimulation of mitosis in cultured limb blastemata of the newt, *Notophthalmus viridescens* . *J. Exp. Zool.*, **210**, 245-252.
- CAUWENBERG P., BUTLER J. et COSMOS E., (1986). Intraspecific chick/chick chimaeras : dystrophic somitic mesoderm transplanted to a normal host forms muscle with a dystrophic phenotype. *Neurosc. Letters*, **68**, 149-154.
- CHEVALLIER A., (1979). Role of the somitic mesoderme in the development of the thorax in bird embryos. II. Origin of thoracic and appendicular musculature. *J. Emb. Exp. Morph.*, **49**, 73-88.
- CHOO A.F., LOGAN D.M. et RATHBONE M.P., (1978). Nerves trophic effects : an *in vitro* assay for factors involved in regulation of protein synthesis in regenerating amphibian limbs. *J. Exp. Zool.*, **206**, 347-354.
- CHRIST B., JACOB H. J. et JACOB M., (1977). Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anat. Embryol.*, **150**, 171-186.
- DEUEL T.F., (1987). Polypeptide growth factors : role in normal and abnormal cell growth. *Ann. Review Cell biology*, **3**, 443-492.
- DIETZ F.R., (1987). Effect of peripheral nerve on limb development. *J. Orthopaedic Research*, **5**, 576-585.
- EGAR M., YNTEMA C.L. et SINGER M., (1973). The nerve fibre content of *Amblystoma* aneurogenic limbs. *J. Exp. Zool.*, **186** (n°1), 91-96.
- ESCH F., UENO N. BAIRD A., HILL F., DENOROY L. et Coll., (1985a). Primary structure of bovine brain acidic fibroblast growth factor (FGF). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **133**, 554-562.
- ESCH F., BAIRD A., LING N., UENO N., HILL F. et Coll., (1985b). Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **82**, 6507-6511.

- FEKETE D. M. et BROCKES J. P., (1987a). A monoclonal antibody detects a difference in the cellular composition of developing and regenerating limbs of newts. *Development*, **99**, 589-602.
- FEKETE D. M. et BROCKES J. P., (1987b). The aneurogenic limb : a puzzle in cell interactions. *T.I.N.S.*, **10** (n°9), 364-368.
- FEKETE D. M. et BROCKES J. P., (1988). Evidence that the nerve controls molecular identity of progenitor cells for limb regeneration. *Development*, **103**, 567-573.
- FILATOW D.W., (1928). Über die Verpflanzung des Epithels und des Mesenchyms einer vorderen Extremitätenknospe bei Embryonen von Axolotl. *Wilhelm Roux Arch. EntwMech. Org.*, **113**, 240-244.
- FINNEGAN C.V., (1962). An analysis of the postgastrula differentiation of the hypomere. III. The histogenic competence of Salamander hypomere in heterotopic transplantation. *J. Emb. Exp. Morph.*, **10**, 293-314.
- FINNEGAN C.V., (1963). Observations of dependent histogenesis in salamander limb development. *J. Emb. Exp. Morph.*, **11**, 325-338.
- FISZMAN M.Y., TOUTANT M. et MONTARRAS D., (1983). *Biochemical evidence for two types of myoblasts during avian embryonic development*. Limb development and regeneration, eds. KELLY, GOETING et Mac CABE, Part B, 401-408.
- GALLIEN L. et DUROCHER M., (1957). Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltlii* Michah. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **91**, 97-114.
- GERAUDIE J. et SINGER M., (1984). Rôle du système nerveux périphérique au cours de la régénération des appendices des Vertébrés. *Année Biologique*, **23**, 244-265.
- GIMENEZ-GALLEGO G., RODKEY J., BENNETT C., RIOS-CANDELORE M., DI SALVO J. et Coll., (1985). Brain derived acidic fibroblast growth factor : complete amino acid sequence and homologies. *Science*, **230**, 1385-1388.
- GLOBUS M. et LIVERSAGE R. A., (1975). *In vitro* studies of limb regeneration in adult *Diemictylus viridescens* : neural dependence of blastema cells for growth and differentiation. *J. Emb. Exp. Morph.*, **33**, 813-829.
- GLOBUS M. et VETHEMANY-GLOBUS S., (1977). Transfilter mitogenic effect of dorsal root ganglia on cultured regeneration blastemata, in the newt, *Notophthalmus viridescens*. *Develop. Biol.*, **56**, 316-328.
- GLOBUS M., (1978) Neurotrophic contribution to a proposed tripartite control of the m cycle in the regeneration blastema on the newt, *Notophthalmus (Triturus) viridescens*. *Am. Zool.*, **18**, 855-868.
- GOSPODAROWICZ D., (1975). Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J. Biol. Chem.*, **250**, 2515-2520.

- HAMBURGER V., (1928). Entwicklung experimentell erzeugter nervenloser un schwach innervierter Extremitäten von Anuren. *Archiv. Entw-Mech.*, **114**, 272-363.
- HAMBURGER V. et WAUGH M., (1940). The primary development of the skeleton is nerveless and poorly innervated limb transplants of chick embryos. *Physiol. Zool.*, **13**, 367-379.
- HARRISON R.G., (1907). Experiments in transplanting limbs and their bearing upon the problems of the development of nerves. *J. Exp. Zool.*, **4**, 239.
- HARRISON R.G., (1924). Neuroblast versus sheath cell in the development of peripheral nerves. *J. Comp. Neur.*, **37**, 123-205
- JABAILY J.A. et SINGER M., (1978). Neurotrophic and hepatotrophic stimulation of proliferation of embryonic chick muscle cells *in vitro* : assay and partial characterization of mitogenic activity in chick embryonic organ and tissue extracts. *Develop. Biol.*, **64**, 189-202.
- JACOBSON M. et HUANG S., (1985). Neurite outgrowth traced by means of horseradish peroxidase inherited from neuronal ancestral cells in frog embryos. *Develop. Biol.*, **110**, 102-113.
- KIENY M. et CHEVALLIER A., (1979). Autonomy of tendon development in the embryonic chick wing. *J. Emb. Exp. Morph.*, **49**, 153-165.
- LANCE-JONES C. et LANDMESSER L., (1980). Motoneurone projection patterns in the chick hind limb following early partial reversals of the spinal cord. *J. Physiol. (London)*, **302**, 581-602.
- LANDMESSER L. et MORRIS D.G., (1985). The development of functional innervation in the hind limb of the chick embryo. *J. Physiol.*, **249**, 301-326.
- LASSALLE B., (1983). Synthèse d'ADN dans les blastèmes de régénération de *Pleurodeles waltlii* (Amphibien Urodèle) en culture *in vitro* . Condition de culture. *Biology of the Cell.*, **47**, 187-192.
- LASSALLE B., OUDKHIR M., VANRAPENBUSH S. et BOILLY B., (1985). Rôle du système nerveux dans la prolifération cellulaire des constituants épidermique et mésenchymateux des blastèmes de régénération de membre d'un triton Pleurodèle (*Pleurodeles waltlii* Michah.) en culture. *Biology of the Cell*, **53**, 37-40.
- LAUTHIER M., (1970). *Organogenèse de la ceinture pelvienne et des membres postérieurs chez Pleurodeles waltlii Michah. : étude d'anomalies spontanées des membres postérieurs.* Thèse de 3ème cycle, Paris.
- LAUTHIER M., (1980). Cell death and abnormalities in limb morphogenesis of *Pleurodeles waltlii* Michah. (Urodela, Amphibia) after nitrogen mustard treatment. *Wilhelm Roux's Arch.*, **189**, 35-45.
- LAUTHIER M., (1982). *Rôle morphogénétique des constituants épidermique et mésodermique des bourgeons des membres antérieurs et postérieurs du triton : Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibien).* Thèse de Doctorat d'Etat, Paris.



- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
- MARKWELL M.A.K., HASS S.M., BIEBER L. et TOLBERT N.E., (1978). A modification of the LOWRY procedure to simplify protein determination in membranes and lipoprotein samples. *Ann. Biochem.*, **87**, 206-210.
- MAUGER A. et KIENY M., (1980). Migratory and organogenetic capacities of muscles cells in bird embryos. *Wilhelm Roux's Arch.*, **189**, 123-134.
- MESCHER A. L. et LOH J. J., (1981). Newt forelimb regeneration blastema *in vitro* : cellular response to explantation and effects of various growth-promoting substances. *J. Exp. Zool.*, **216**, 235-245.
- MILLER J.B., CROW M.Y. et STOCKDALE F.E., (1985). Slow and fast myosin heavy chain content three types of myotubes in early muscle cell cultures. *J. Cell. Biol.*, **101**, 1643-1650.
- MILLER J.B. et STOCKDALE F.E., (1986). Developmental origins of skeletal muscle fibers : clonal analysis of myogenic cell lineages based an expression of fast and slow myosheavy chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 3860-3864.
- MUNEOKA K. et BRYANT S. V., (1982). Evidence that patterning mechanisms in developing and regenerating limbs are the same. *Nature (London)*, **298**, 369-371.
- POLLACK E. D., (1980). Target - dependent survival of tadpole spinal cord neurites in tissue culture. *Neuroscience Letters*, **16**, 269-274.
- POLLACK E.D., MUHLACH W.L. et LIEBIG V., (1981). Neurotrophic influence of mesenchymal limb target tissue on spinal cord neurite growth *in vitro* . *J. Comp. Neurology*, **200**, 393-405.
- POPIELA H., (1976). *In vivo* limb tissue development in the absence of nerves : A quantitative study. *Exp. Neurology*, **53**, 214-226.
- POPIELA H., (1977). *In vivo* limb muscle differentiation in the absence of nerves : A quantitative study. *Exp. Neurology*, **55**, 160-172.
- ROTMANN E., (1931). Die rolle des ektoderms und mesoderms bei der formbildung der kiemen und extremitäten von Triton. I. Operationen im gastrulastadium. *Wilhelm Roux's Arch.*, **124**, 747-794.
- ROTMANN E., (1933). Die rolle des ektoderms und mesoderms bei der formbildung der extremitäten von Triton. II. Operationen in gastrulaund schwangknospennstadium. *Wilhelm Roux's Arch.*, **129**, 85-119.
- SAUNDERS J.W., (1948). The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J. Exp. Zool.*, **108**, 368-404.
- SICARD R.E., (1985). *Regulation of vertebrate limb regeneration*. New York Oxford University Press.

- SINGER M., (1946). The nervous system and regeneration of the forelimb of adult *Triturus* v. The influence of number of nerve fibers, including a quantitative study of limb innervation. *J. Exp. Zool.*, **101**, 299-337.
- SINGER M., (1952). The influence of the nerve in regeneration of the Amphibian extremity. *Quart. Rev. Biol.*, **27**, 169-200.
- SINGER M., (1965). A theory of the trophic nervous control of amphibian limb regeneration, including a re-evaluation of quantitative nerve requirements. In: Proc. Regen. in Animals. V. Kiortsis and H. A. L. Trampusch, eds. North Holland Publ. Co., Amsterdam, 20-32.
- SINGER M. et CASTON J. D., (1972). Neurotrophic dependence of macromolecular synthesis in the early limb regenerate of the newt, *Triturus*. *J. Emb. Exp. Morph.*, **28**, 1-11.
- SINGER M., (1978). On the nature of the neurotrophic phenomenon in urodele limb regeneration. *Amer. Zool.*, **18**, 829-841.
- SLACK J.M.W., (1976). Determination of polarity in the Amphibian limb. *Nature*, **261**, 44-46.
- SLACK J.M.W., (1980). Regulation and potency in the forelimb rudiment of the Axolotl embryo. *J. Emb. Exp. Morph.*, **57**, 203-217.
- STEINER K., (1928). Entwicklungsmechanische Untersuchungen über die Bedeutung des Ektodermalen Epithels der Extremitätenknospe von Amphibien Larven. *Wilhelm Roux's Arch.*, **113**, 1-11.
- STIRLING R.V. et SUMMERBELL D., (1977). The development of functional deletions of proximal-distal axis. *J. Emb. Exp. Morph.*, **41**, 189-207
- STRECKER R.T. et STEPHENS D.T., (1983). Peripheral nerves do not play a trophic role in limb skeletal morphogenesis. *Teratology*, **27**, 159-167.
- STRYDOM D.J., HARPER J.W. et LOBB R.R., (1986). Amino acid sequence of bovine brain derived class 1 heparin-binding growth factor. *Biochemistry*, **25**, 945-951.
- STURDEE A. et CONNOCK M., (1975). The embryonic limb bud of the urodele : morphological studies of the apex. *Differentiation*, **3**, 43-49.
- TANK P. W., CARLSON B.M. et CONNELLY T. G., (1977). A scanning electromicroscopic comparison of the development of embryonic and regenerating limbs in the Axolotl. *J. Exp. Zool.*, **201**, 417-430.
- TARIN D. et STURDEE A.P., (1971). Early limb development of *Xenopus laevis*. *J. Emb. Exp. Morph.*, **26**, 169-179.
- THORNTON C. S. et STEEN T.P., (1962). Eccentric blastema formation aneurogenic limbs of *Ambystoma* larvae following epidermal cap deviation. *Develop. Biol.*, **5**, 328-343.
- THORNTON C. S. et THORNTON M. T., (1970). Recuperation of regeneration in denervated limbs of *Ambystoma* larvae. *J. Exp. Zool.*, **173**, 293-302.
- TOMLINSON B. L., GLOBUS M. et VETHAMANY-GLOBUS S., (1981). Promotion of mitosis in cultured newt limb regenerates by a diffusible nerve factor. *In vitro*, **17**, 167-172.

- TOMLINSON B. L. et TASSAVA R. Y., (1987). Dorsal root ganglia grafts stimulate regeneration of denervated Urodele forelimbs : timing of graft implantation with respect to denervation. *Development*, **99**, 173-186.
- TODD J.J., (1823). On the process of reproduction of the members of the aquatic salamander. *Quart. Sci. Lit. Arts*, **16**, 84-96.
- TWEEDLE C.D., POPIELA H. et THORNTON, C.S., (1974). Ultrastructure of the development and subsequent breakdown of muscle in aneurogenic limbs (*Ambystoma*). *J. Exp. Zool.*, **190**, 155-166.
- UNGEWITTER L.H., (1951). An urea silver nitrate method for nerve fibers and nerve endings stain. *Technol*, **26**, 73-76.
- VAN STONE J.M., (1955). The relationship between innervation and regenerative capacity in hind limbs of *Rana sylvatica*. *J. Morph.*, **97**, 345-392.
- VETHAMANY-GLOBUS S., GLOBUS M. et TOMLINSON B., (1978). Neural and hormonal stimulation of DNA and protein synthesis in cultured regeneration blastemata in the newt *Notophthalmus viridescens*. *Develop. Biol.*, **65**, 183-192.
- VETHAMANY-GLOBUS S., GLOBUS M., DARCH A., MILTON G. et TOMLINSON B.L., (1984). *In vitro* effects of insulin on macromolecular synthesis events in newt limb regeneration blastemata. *J. Exp. Zool.*, **231**, 63-74.
- WALLACE H., (1981). *Vertebrate limb regeneration*. Eds. John WILEY and sons Ltd, New York.
- WIGSTON D. J., (1986). Selective innervation of transplanted limb muscles by regenerating motor axons in the Axolotl. *J. Neurosc.*, **6**, 2757-2763
- YNTEMA C. L., (1943). Deficient efferent innervation of the extremities following removal of neural crest in *Amblystoma*. *J. Exp. Zool.*, **94**, 319-349.
- YNTEMA C.L., (1959a). Regeneration in sparsely innervated and aneurogenic forelimbs of *Amblystoma* larvae. *J. Exp. Zool.*, **140**, 101-123.
- YNTEMA C.L., (1959b). Blastema formation in sparsely innervated and aneurogenic forelimbs of *Amblystoma* larvae. *J. Exp. Zool.*, **142**, 423-440.
- ZENJARI C., (1987). *Contribution à l'étude de l'innervation du membre de Pleurodèle au cours de la croissance et de la régénération. Influence des formations surnuméraires sur l'innervation du membre*. Thèse de 3ème cycle, Lille I.

## PLANCHE I

### ASPECTS MORPHOLOGIQUES DES ANIMAUX UTILISES

Fig. A - Vue dorsale d'une larve de Pleurodèle au stade 34 . Début de la formation du bourgeon de membre (bg). (x10,5)

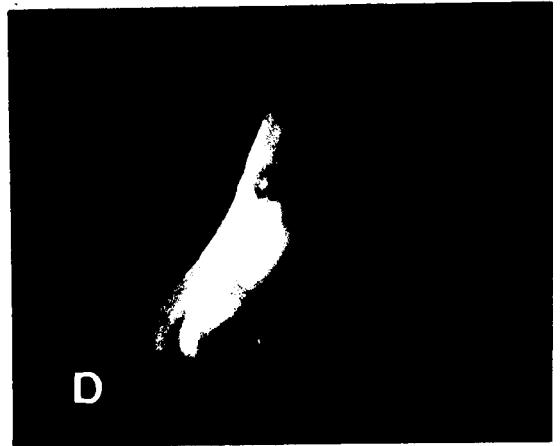
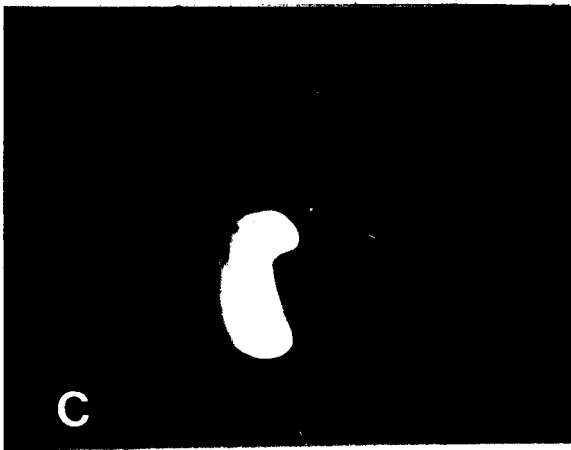
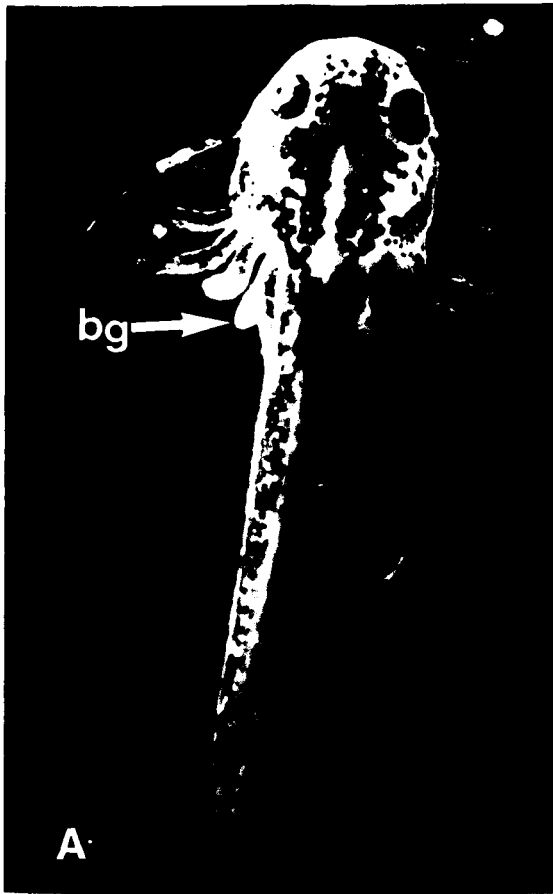
Fig. B - Les bourgeons de membres sont au stade 36 (forme de cylindre). Ce sont ces bourgeons qui ont été utilisés dans les cultures *in vitro*. (x11,5)

Fig. C - Embryon au stade 21-22, utilisé pour l'obtention des tranches de secteurs dorsaux et la fabrication d'animaux aneurogéniques. (x7)

Fig. D - Parabiose du type C en vue latérale au lendemain de la soudure.

L'animal de gauche est le porteur , celui de droite l'opéré. Ce dernier est plus réduit car dépourvu d'encéphale. (x9,5)

Fig. E - Parabiose de la série A au stade 38. On remarque la soudure très antérieure des deux parabiontes. Les deux animaux sont pratiquement identiques morphologiquement ; et leurs bourgeons de membres (bg) sont au même stade. (x11)

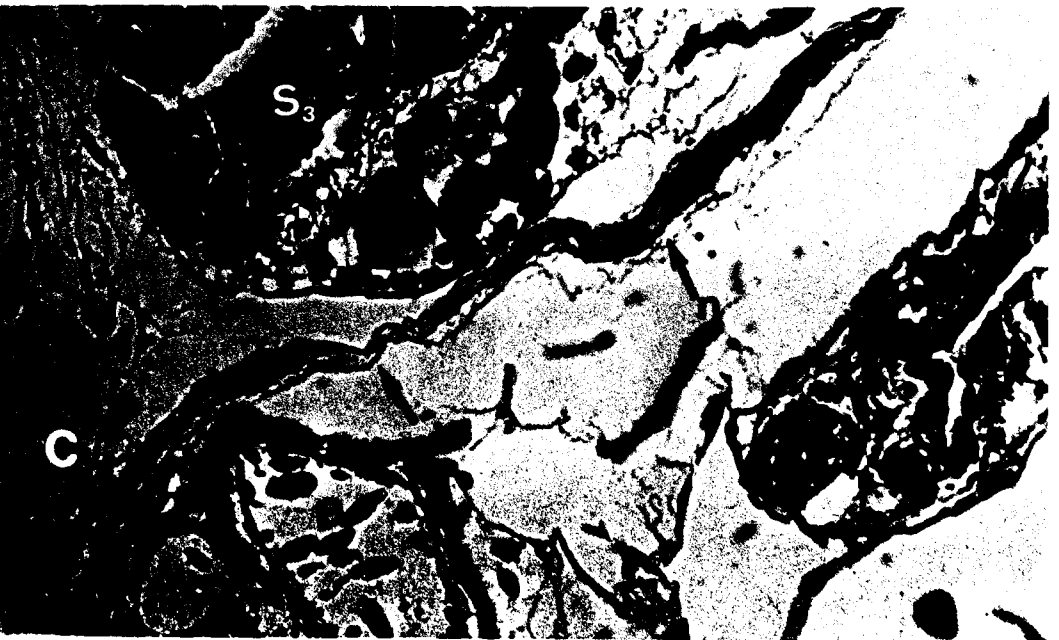
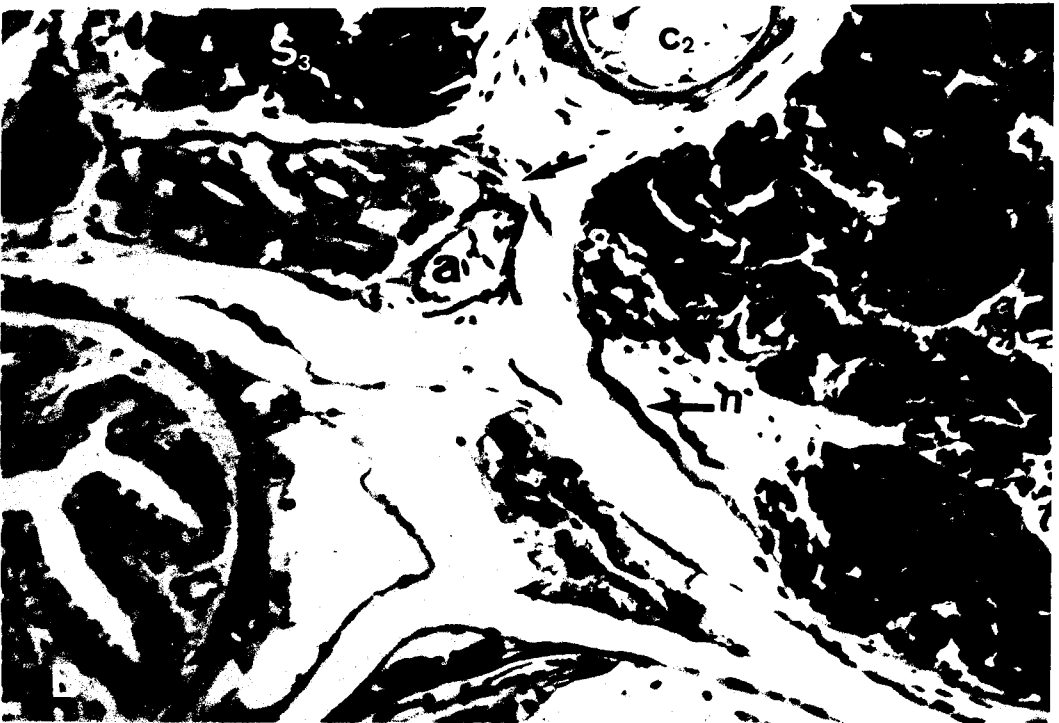
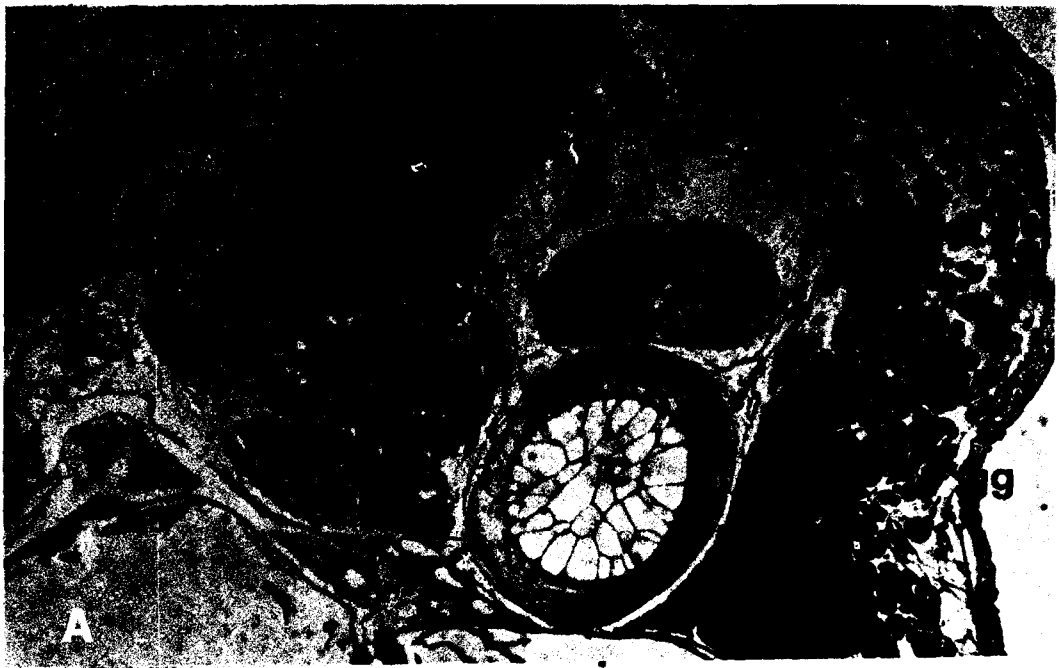


## PLANCHE II

### ETUDE HISTOLOGIQUE D'UN TRAJET DE NERF D'UNE PARABIOSE DE LA SERIE A

Fig. A - Coupe transversale de la parabiose au niveau du tronc au stade 51. On constate, au niveau de l'animal aneurogénique (à gauche des pointillés), l'absence de la moelle épinière (me) et des ganglions (gg) rachidiens alors qu'ils existent chez le témoin. Par contre, la corde ( $C_1$  pour le témoin et  $C_2$  pour l'aneurogénique), les somites ( $S_1$  : somites droits du témoin ;  $S_2$  : somites gauches du témoin et droits de l'aneurogénique ;  $S_3$  : somites gauches de l'aneurogénique, très réduits), l'aorte dorsale (a), les tubes néphrétiques (tn) existent chez les deux parabiontes. (x168)

Fig. B et C - Suivi du trajet d'un nerf passant du témoin à l'aneurogénique (flèches). Provenant de l'animal hôte, le nerf passe le long des somites ( $S_2$ ), de la corde de l'opéré ( $C_2$ ), de l'aorte dorsale, des tubes néphrétiques de l'opéré pour aller coloniser le membre droit de celui-ci. (x420 , B x1050 , C)



### PLANCHE III

#### ASPECTS MORPHOLOGIQUES DES PARABIOSES ETUDE HISTOLOGIQUE DE LEURS MEMBRES

Fig. A - Coupe transversale de l'avant-bras du membre dit "aneurogénique" de la série A au stade 51. On note la présence de nerfs (n). (x330)  
H : humérus ; AN : anconeus ; Bi : biceps

Fig. B - Coupe transversale d'un membre témoin au stade 51. (x330)  
Ep : épiderme

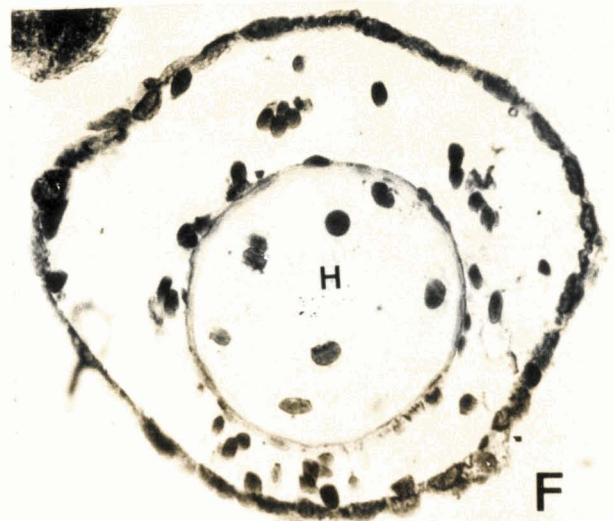
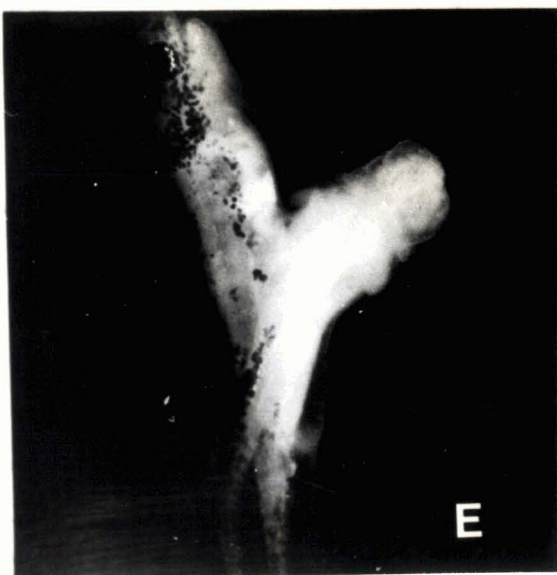
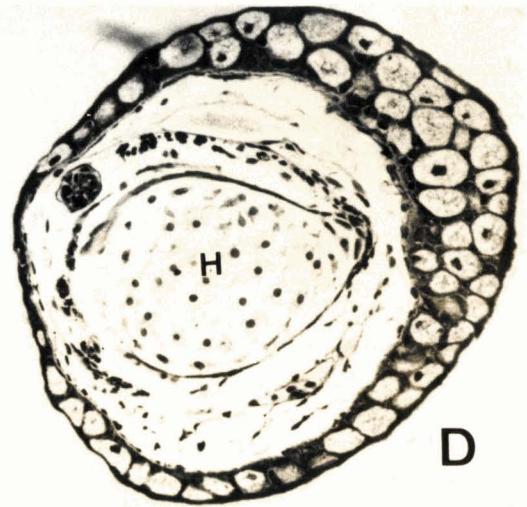
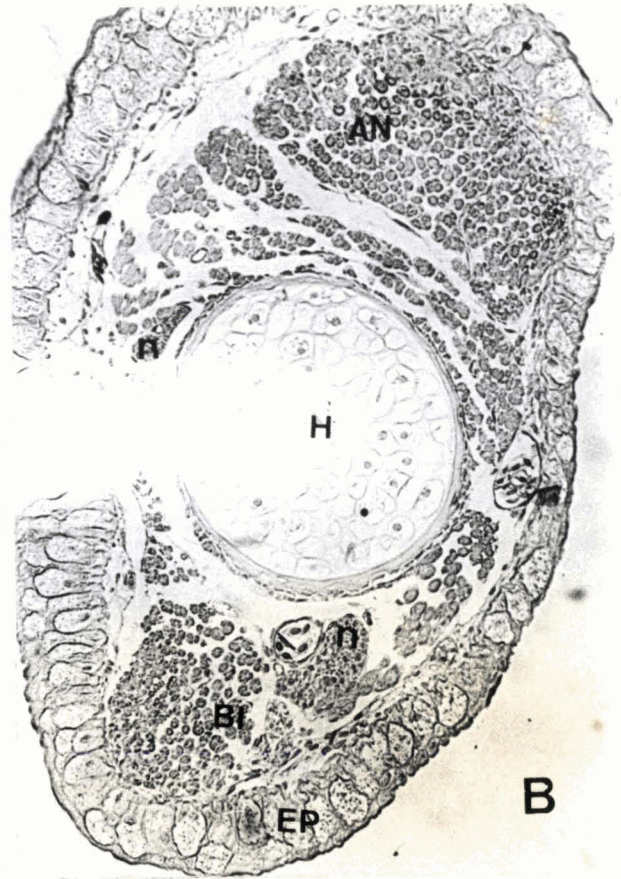
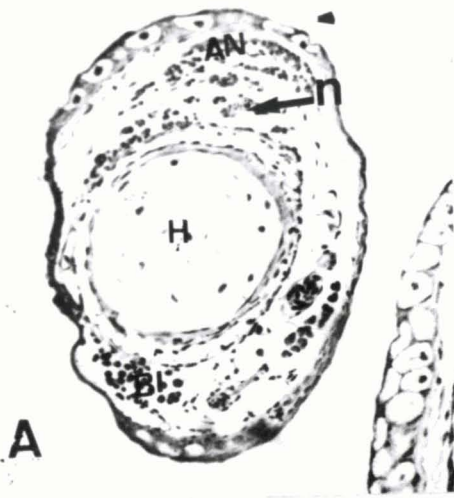
Fig. C - Parabiose de la série B en vue dorsale au stade 37. Les membres antérieurs des deux parabioses sont au même stade. L'animal opéré est à droite ; on note sa taille réduite, et la présence d'yeux et de branchies . (x13,22)  
bg : bourgeon de membre.

Fig. D - Coupe transversale du membre aneurogénique de la série B au stade 41. Les muscles sont pratiquement absents. (x1320)

Fig. E - Vue dorsale de la parabiose de la série C au stade 37. L'animal aneurogénique est totalement dépigmenté, il est également caractérisé par l'absence de la tête et donc d'yeux et de branchies. A ce stade, les membres commencent à se former. (x7,5)

Fig. F - Coupe transversale d'un membre aneurogénique de la série C au stade 41. Notez l'absence de nerfs et de muscles, et la présence de cellules mésenchymateuses isolées. (x1320)





## PLANCHE IV

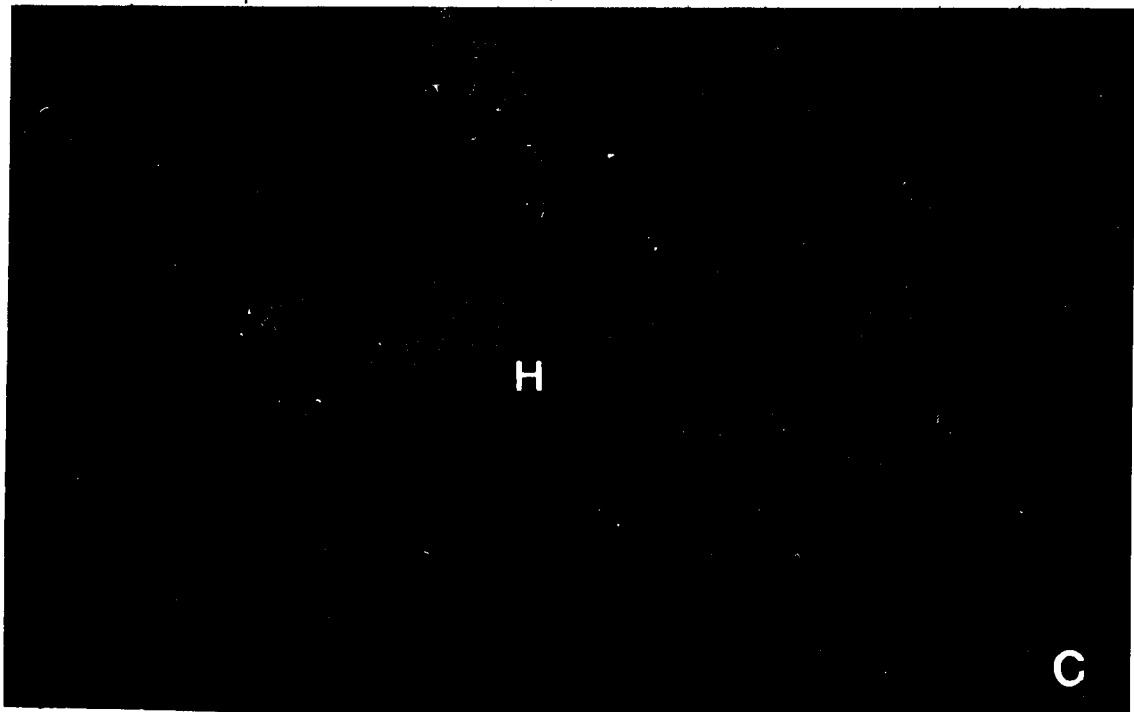
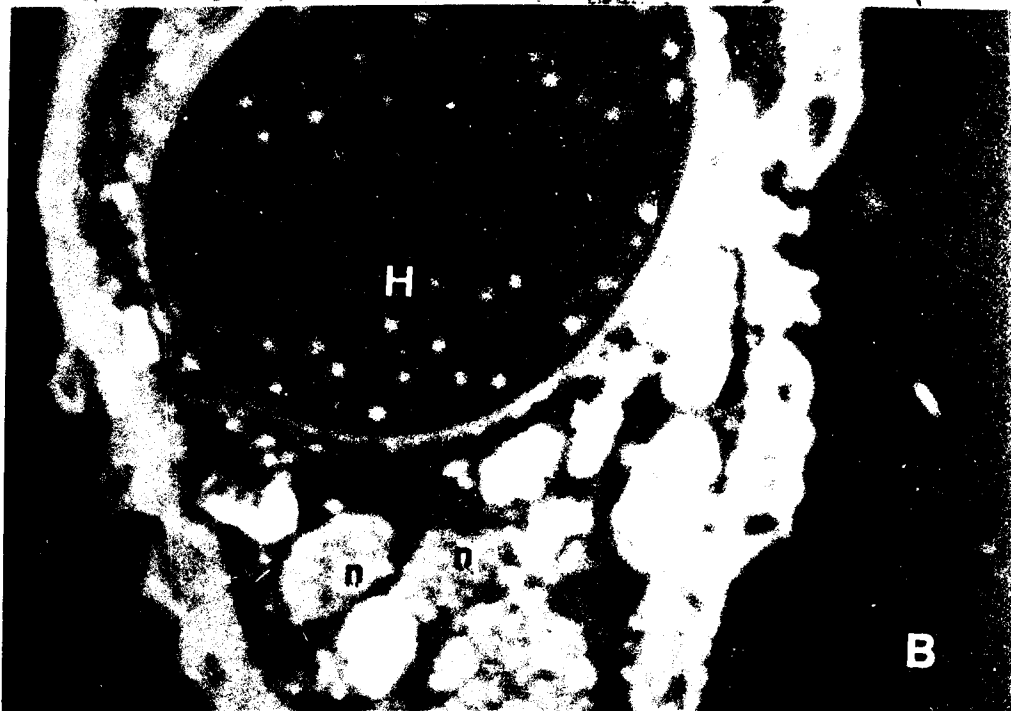
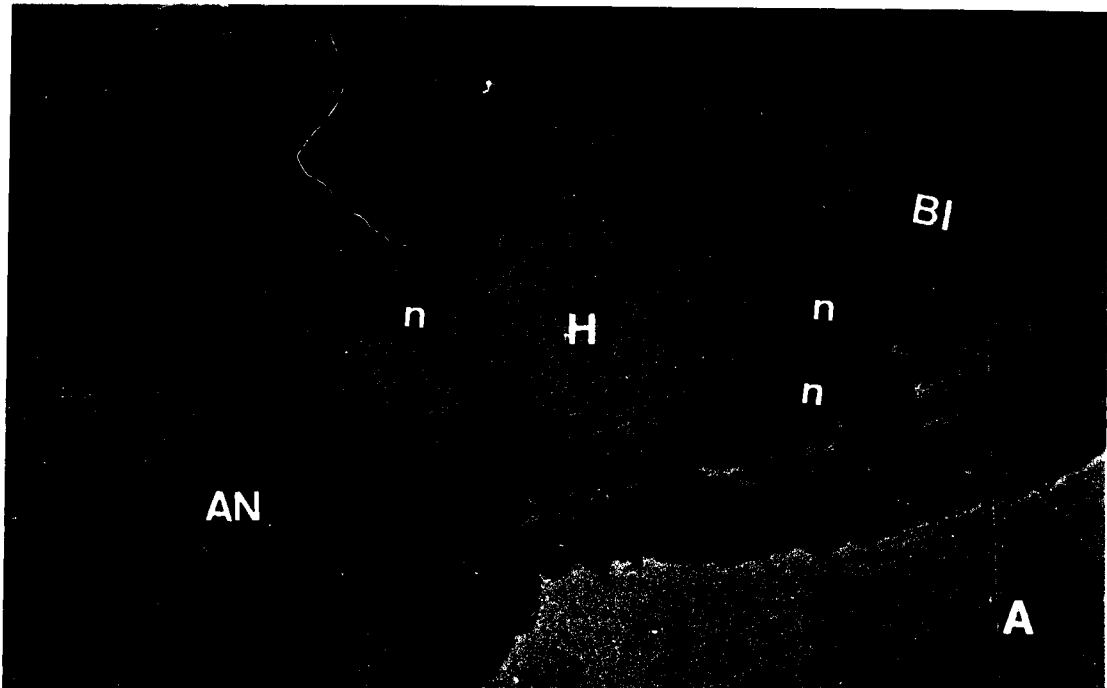
### IMMUNOREACTIVITE ANTI-NEUROFILAMENT SUR COUPES A PARAFFINE.

Fig. A et B - Coupes transversales de membres témoins colorées respectivement à la peroxydase (A) et à la fluorescéine (B) ( stade 51, A et stade 48, B).

Les nerfs sont très évidents et se situent à côté des vaisseaux sanguins. (x420 , A et x1050 , B)

An : anconeus ; Bi : biceps ; H : humérus.

Fig. C - Coupe transversale d'un membre aneurogénique au stade 48 coloré à la peroxydase. Les nerfs sont absents. (x1050)



## PLANCHE V

### ASPECTS MORPHOLOGIQUES ET HISTOLOGIQUES DES BOURGEONS DE MEMBRES ET DES BLASTEMES DE REGENERATION.

Fig. A - Les bourgeons (Bg) de membres de l'hôte et de l'animal aneurogénique sont au même stade de développement (stade 40) dans la série C. (x10)

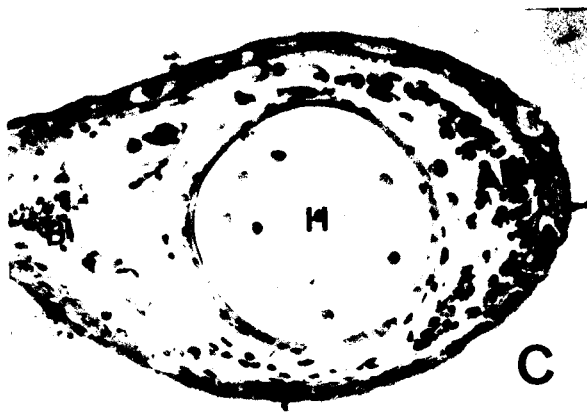
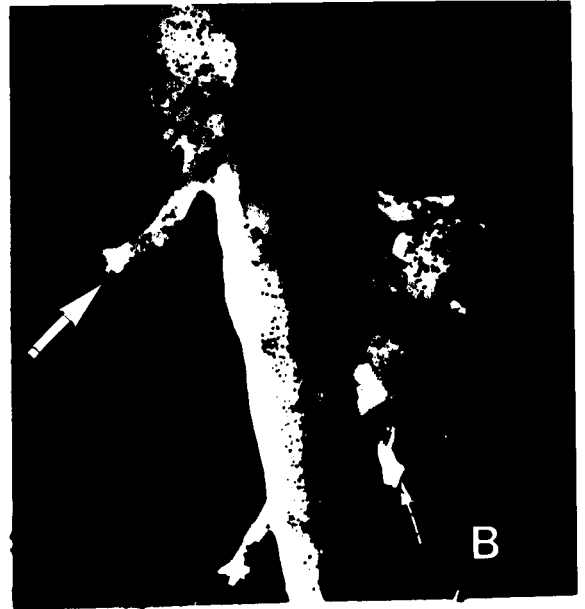
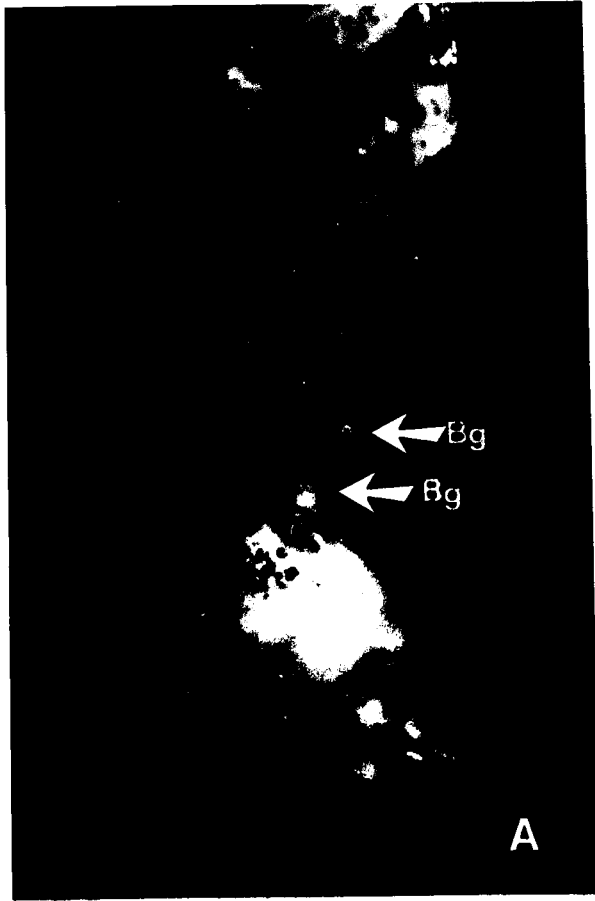
Fig. B - Parabiose de la série B dont les membres antérieurs gauche (grosse flèche) du témoin et droit de l'opéré (petite flèche) ont été amputés au stade 41. Ces membres ont régénéré jusqu'au stade début 3e doigt pratiquement à la même vitesse.

On remarque chez l'animal opéré, la petitesse du diamètre de l'avant-bras du membre régénéré droit par rapport au membre gauche de l'animal hôte ; la tête est plus grosse que le reste du corps. (x4,7)

Fig. C - Coupe transversale d'un membre régénéré de la série B au stade ébauche du 4e doigt. On note l'existence des muscles anconeus (An) et biceps (Bi) bien qu'ils soient réduits par rapport aux muscles témoins de la figure D. (x575)

Fig. D - Coupe transversale d'un membre régénéré de l'animal hôte au stade ébauche du 4e doigt. (x575)

H : humérus ; n : nerfs.



## PLANCHE VI

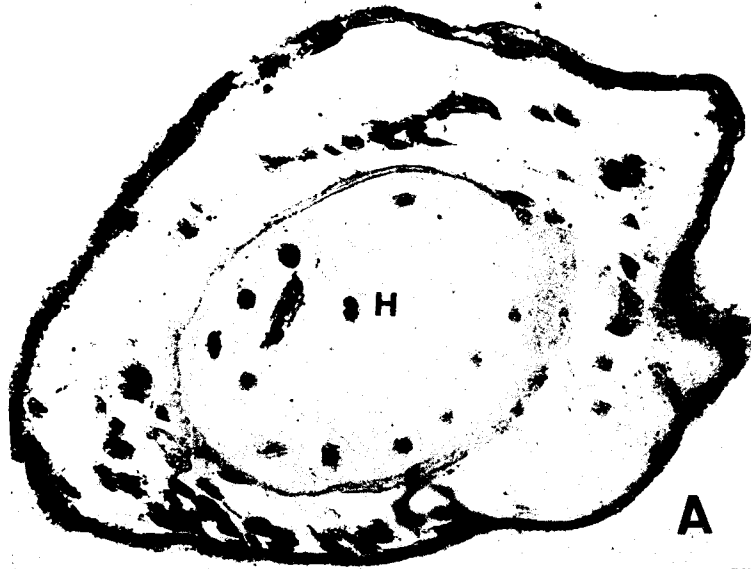
Fig. A - Coupe transversale d'un membre aneurogénique régénéré dans la série B au stade début 4e doigt. On note l'absence des muscles et des nerfs. (x825)

H : humérus.

Fig. B - Aspect morphologique d'une parabiose de la série C, 22 jours après amputation. L'animal aneurogénique n'a pas régénéré son membre gauche (petite flèche) ; alors que celui de son homologue témoin a atteint le stade 2 doigts (grosse flèche). L'amputation avait eu lieu au stade 51. (x3)

Fig. C - Aspect morphologique de la même parabiose que dans la figure B, 47 jours après amputation. L'animal aneurogénique n'a pas encore commencé sa régénération (petite flèche). Le témoin est déjà au stade 4 doigts au membre antérieur gauche (grosse flèche). L'amputation avait eu lieu au stade 51. (x2)





## RESUME

Il est connu que le système nerveux intervient dans la régénération des membres d'Urodèles. Par analogie, on a recherché chez le triton *Pleurodeles waltlii* si ce même système nerveux avait un effet trophique sur le bourgeon de membre en voie de développement.

On a testé, sur des bourgeons de membres au stade 35-36 l'action d'un facteur de croissance nerveux (le BDGF I) et des tissus nerveux (moelle épinière ; cerveau). L'effet positif constaté sur la prolifération est moins importante, la croissance est inférieure à celle des blastèmes ou des bourgeons restés sur les larves. Afin de rester aussi proche que possible des conditions de développement, on a explanté des secteurs dorsaux au stade bourgeon caudal incluant les membres antérieurs à l'état de champ avec ou sans la moelle épinière correspondante jusqu'au moment où ces cultures ont survécu (stade 36). Les membres dépourvus de nerfs se sont développés comme ceux des témoins innervés. Enfin, dans une dernière série d'expériences, après diverses tentatives, nous avons mis au point une technique opératoire permettant d'obtenir des animaux "véritablement aneurogéniques" dont on a analysé la croissance et l'organogenèse des membres. Les résultats obtenus plaident en faveur de deux phases distinctes dans l'organogenèse du membre :

(1) la I<sup>ère</sup> est indépendante du système nerveux, ce jusqu'au stade 38-39.

(2) la II<sup>ème</sup> phase est dépendante du système nerveux, car en son absence, la croissance chute de manière nette, la différenciation musculaire est fortement atteinte. Si ces membres dits "véritables aneurogéniques" sont amputés au stade 40-42, ils régénèrent avec 5 jours de retard par rapport aux membres témoins. Amputés au stade 46 ou plus, ils ne commencent leur régénération qu'après un retard de 60 jours par rapport aux témoins. On en a conclu que si la régénération des membres aneurogéniques est possible en l'absence de tout système nerveux, celui-ci exerce néanmoins un effet trophique sur la croissance des cellules blastémales.

En définitive, les résultats et les conclusions obtenus sur les blastèmes de régénération de membre normal d'une part, et ceux obtenus sur le bourgeon de membre normal ou aneurogénique et sur le blastème de régénération de membre aneurogénique d'autre part, ne peuvent pas être superposés.