

50376
1989
247

50376
1989
247

N° d'ordre : 780

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES ARTOIS

THESE
DE
DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée par :

Edith BROWAEYS-POLY



LES CELLULES EPIDERMiques ET LEUR ENVIRONNEMENT
LORS DE LA FORMATION D'UN REGENERAT DE PATTE
CHEZ LE PHASME *CARAUSIUS MOROSUS* Br:
ASPECTS SRUCTURaux, CYTOCHIMIQUES ET TENTATIVES
DE MODIFICATION DES SURFACES CELLULAIRES

Soutenu le *1er* décembre 1989 devant le jury :

Président : M. A. CAPURON

Directeur du Travail
et Rapporteur : M. A. BART

Rapporteurs : M. J.C. ANDRIES
M. B. FOURNIER

Examineur : M. J. BIERNE

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

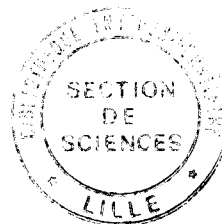
M. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

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

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

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN



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

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

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

M. A. DUBRULLE.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

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

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

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

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

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

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

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

AVANT-PROPOS

Monsieur le Professeur BART m'a permis de réaliser ce travail, qu'il trouve ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon admiration pour sa grande culture scientifique.

Monsieur le Professeur ANDRIES a accepté d'examiner ce travail, qu'il sache combien j'ai été sensible à ses qualités humaines et à sa compétence scientifique.

Monsieur FOURNIER, chargé de recherche au CNRS, a bien voulu juger ce manuscrit, qu'il soit assuré de toute ma gratitude.

Monsieur le Professeur BIERNE me fait l'honneur de participer à mon jury de thèse, qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Je ne saurais oublier que Monsieur le Professeur CAPURON a participé à ma formation universitaire et je lui sais gré d'avoir bien voulu assurer la présidence de mon jury de thèse.

Toutes les personnes, qui de près ou de loin m'ont aidée à mener à bien ce travail, sauront se reconnaître et recevoir tous mes remerciements.

J'espère qu'Alexandre voudra bien pardonner mes longues absences

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
MATERIEL ET TECHNIQUES	7

PREMIERE PARTIE

ETUDE DE LA MISE EN PLACE ET DU DEVELOPPEMENT D'UN REGENERAT DE PATTE APRES AUTOTOMIE	15
--	-----------

CHAPITRE I : ETUDE STRUCTURALE	16
---------------------------------------	-----------

I - STRUCTURE D'UNE PATTE DE PHASME	17
II - ETUDE DU REGENERAT	18
A - Structure d'une patte régénérée	18
B - Table de développement du régénérat	19
C - Aspects du moignon coxo-trochantérien au cours de l'intermue	21
1. Le caillot	21
2. La chambre de régénération	22
3. L'épiderme	23
4. L'intérieur du régénérat	29
III - DISCUSSION et CONCLUSION	30

CHAPITRE II : CARACTERISATION DU MATERIEL DE LA CHAMBRE DE REGENERATION ET DES MEMBRANES PLASMIQUES DE L'EPIDERME D'UN REGENERAT	33
---	-----------

ETUDE CYTOCHIMIQUE	35
I - MATERIEL ET METHODE	35
A - Techniques histologiques	35
1. Colorations histochimiques	35
2. Traitements enzymatiques	38
3. Lectines fluorescentes	39
4. Anticorps	40

B - Techniques ultrastructurales	41
1. Technique acide périodique-thiocarbohydrazide-protéinate d'argent	41
2. Colorants cationiques	41
3. Hyaluronidase testiculaire bovine	42
C - Immunotransfert ou Western blot	42
II - RESULTATS	43
A - Colorations histochimiques	43
B - Traitements enzymatiques	45
C - Lectines fluorescentes	47
D - Anticorps	48
E - Résultats ultrastructuraux	49
F - Caractérisation d'une substance apparentée à la fibronectine	51
ANTIGENES DE SURFACE	52
I - OBTENTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX	52
A - Technique	52
1. Antigène	52
2. Anticorps	56
B - Résultats	61
1. Analyse électrophorétique	61
2. Hybridomes	61
II - ANTICORPS MONOCLONAUX TOPOSPECIFIQUES DIRIGES CONTRE LES MEMBRANES DES CELLULES DE LA BLATTE :	
<i>BLABERUS CRANIIFER</i>	63
A - Suspensions membranaires de cellules épidermiques	63
1. Technique	63
2. Résultats	64
B - Coupes histologiques	65
C - Conclusion	66
DISCUSSION ET CONCLUSION	67

DEUXIEME PARTIE

TENTATIVES DE PERTURBATION D'UNE MORPHOGENESE REGENERATRICE	76
CHAPITRE III : INJECTION D'HEPARINE	77
ACTION DE L'HEPARINE	78
I - L'HEPARINE	78
II - INJECTION DANS LE MOIGNON COXO-TROCHANTERIEN	78
1. Méthode	78
2. Résultats	79
3. Conclusion	79
III - INJECTION DANS LE CORPS DE L'ANIMAL	79
A - Rapport dose-réponse	79
1. Méthodes	79
2. Résultats	80
3. Conclusion	87
B - Influence de l'héparine dans le temps	88
IV - DISCUSSION et CONCLUSION	94
LES ECDYSTEROIDES	99
I - MATERIEL ET METHODE	99
A - Matériel biologique	99
B - Etude histologique	99
C - Dosage des ecdystéroïdes	100
II - RESULTATS	102
A. Lot 1 : Animaux normaux	102
B. Lot 2 : Animaux autotomisés	104
C. Lot 3 : Animaux injectés et autotomisés	106
DISCUSSION ET CONCLUSION	108

CHAPITRE IV : INJECTION DE ROUGE DE RUTHENIUM	114
I - INJECTION TEMOIN	115
II - INJECTION DE ROUGE DE RUTHENIUM	115
A - Méthode	115
B - Résultats	116
1. Rapports dose-réponse	116
2. Etude histologique	128
3. Microscopie électronique	129
4. Rouge de ruthénium et tampon phosphate	129
C - Conclusion	129
CHAPITRE V : INJECTION DE MEMBRANES PLASMIQUES DE CELLULES EPIDERMQUES	132
I - MATERIEL ET METHODE	133
II - RESULTATS	133
A - Membranes plasmiques de tergites	134
B - Membranes plasmiques de sternites	138
C - Membranes plasmiques (mp) de fémurs	140
1. mp de faces antérieures, postérieures et dorsales	140
2. mp de faces dorsales	140
3. mp de faces ventrales	143
III - DISCUSSION et CONCLUSION	146
CHAPITRE VI : INJECTION DE LECTINES ET DE SUCRE	153
I - INJECTION DE LECTINES	154
A - Résultats	154
1. Concanavaline A	154
2. Agglutinine d' <i>Helix pomatia</i>	156
3. Agglutinine de germe de blé	157
B - Conclusion	158
II - INJECTION DE N- ACETYL- GALACTOSAMINE	158
A - Durée de l'intermue	158
B - Régénérats	158
III - DISCUSSION et CONCLUSION	160
 CONCLUSION GENERALE	 162
 BIBLIOGRAPHIE	

INTRODUCTION

La régénération est la capacité qu'ont certains animaux de reconstruire les parties manquantes ou détruites. Chez les Insectes, la régénération d'appendices est fréquente (revue de BULLIERE et BULLIERE, 1985) et l'étude en est ancienne (BORDAGE, 1897).

Chez la larve du phasme *Carausius morosus*, l'ablation d'une patte ou d'une partie de patte est suivie d'une régénération. Par ailleurs, cet insecte manifeste une capacité d'autotomie. Toute excitation mécanique au niveau du fémur entraîne une rupture de la patte au niveau de la jonction toujours ankylosée du trochanter et du fémur, niveau dont l'anatomie a été étudiée de façon détaillée par POSSOMPES (1966). Les premières recherches sur l'autotomie et la régénération ont été réalisées par GODELMANN (1901) et BORDAGE (1905). Il a été établi que la régénération, à la suite d'une autotomie, s'effectuait à partir du moignon constitué par la coxa et le trochanter (BORDAGE, 1916 ; HEDELMANN, 1929 ; FRIEDRICH, 1930 ; POSSOMPES, 1961, 1962). Par une étude expérimentale, BART (1969, 1970) a montré que le trochanter, à lui seul, était capable de régénérer l'essentiel d'une patte, du trochanter lui-même jusqu'à l'extrémité du tarse. Par des régénérations à partir de trochanter isolé ou à partir d'associations coxo-trochantériennes chimères (par exemple : coxa métathoracique + trochanter prothoracique), il a été établi que la coxa n'influencait pas du tout la morphogenèse issue du trochanter.

Par ailleurs, la croissance des régénérats, les rapports régénération - cycle de mue, l'organisation des régénérats ont été abordés chez les Insectes (VOY, 1951 ; BODENSTEIN, 1937, 1955 ; O'FARREL et STOCK, 1958 ; URVOY, 1963 ; BULLIERE, 1967, 1968). Chez la blatte, deux hypothèses ont été émises quant à l'origine du régénérat après autotomie : soit le régénérat est issu de la prolifération des cellules épidermiques situées au voisinage immédiat de la plaie (PENZLIN, 1963), soit le régénérat est issu du remodelage de l'épiderme du trochanter et de l'épiderme distal de la coxa (TRUBY, 1983). Quant au sens de différenciation des articles, O'FARREL et STOCK (1954) le considèrent proximo-distal tandis que, dernièrement, TRUBY (1983) parle d'une différenciation disto-proximale.

D'après ses études sur les pattes larvaires de blattes, BOHN (1967, 1970, 1971) a conclu à l'existence d'un gradient épidermique segmentaire. Des associations de niveaux différents du même segment ou de segments différents déclenchent une morphogenèse. Chez *Carausius*, BART (1969), en s'appuyant sur des résultats expérimentaux, pense que la formation du régénérat après autotomie peut être considérée comme la restitution par toute génératrice du trochanter de la génératrice correspondante. Plus récemment, un autre modèle a été proposé, celui des coordonnées polaires (BRYANT et col., 1981). Pour ces auteurs, des discontinuités dans la suite des valeurs de position provoquent une croissance locale, les cellules néoformées prennent des valeurs intermédiaires de l'information de position de façon à rétablir la continuité

de la distribution. Au cours de ce processus d'intercalation, si la valeur de position est identique à celle d'une cellule adjacente préexistante, la nouvelle cellule adoptera une valeur de position plus distale. Il s'agit d'une intercalation à deux dimensions : dans les sens transversal et proximo-distal.

Chez *Carausius*, la mise en place et le développement d'un régénérat n'ont pas été décrits de façon approfondie, en particulier des confirmations histologiques manquent pour étayer les hypothèses avancées chez les Insectes. Nous avons donc repris ce travail en essayant de répondre de façon plus précise aux questions essentielles que pose la régénération d'un appendice articulé :

- 1 - Quelle est l'origine du régénérat ?
- 2 - Quel est le sens de différenciation des articles ?

Après autotomie, l'épiderme se rétracte dans le moignon coxo-trochantérien, ce qui fait apparaître un espace : la chambre de régénération, remplie de matériel et dans laquelle le régénérat se forme. Au niveau du sac péripodial des disques imaginaires qui est l'homologue de la chambre de régénération des Hétérométaboles, existe également du matériel considéré par FRISTROM et RICKOLL (1982) comme étant de la matrice extracellulaire. Entre les faces épidermiques des disques imaginaires, NARDI et col. (1985) ont mis en évidence non seulement des glycoprotéines mais également des glycosaminoglycannes non sulfatés, principalement de l'acide hyaluronique. Chez *Porcellio* (Crustacé Isopode), de la chitine et un glycosaminoglycanne non sulfaté, probablement de l'acide hyaluronique, ont été mis en évidence dans la chambre de régénération (NOULIN, 1979). Par ailleurs, les recherches sur les tissus conjonctifs des Insectes ont montré que leur composition est très proche de celle des autres animaux, y compris les Mammifères (ASHHURST, 1985). D'autre part, chez les Vertébrés, la matrice extracellulaire joue un rôle de charpente et régule le comportement des cellules qui sont à son contact. Elle joue un rôle essentiel dans la prolifération, la migration, la forme et les fonctions métaboliques de ces cellules (HAY, 1984 ; WATT, 1986). Chez les Hétérométaboles, seul le travail de MARKS et LEOPOLD (1971) consacré à la régénération de la patte de blatte a abordé le problème de la composition du matériel qui entoure le régénérat. Pour ces auteurs, deux couches successives sont sécrétées : la première est dépourvue de chitine, la seconde contient de la chitine et constitue la cuticule. Nous avons donc envisagé d'étudier chez *Carausius* les surfaces épidermiques et leur environnement à l'aide de : colorations histochimiques associées ou non à des traitements enzymatiques, de lectines et d'anticorps couplés à la fluorescéine et de techniques de microscopie électronique.

Chez *Carausius*, seules les cellules épidermiques sont responsables de la morphogenèse régénératrice (BART 1969). Ceci implique des contacts entre les cellules au cours de la

formation du régénérat. Chaque cellule possède une information de position (WOLPERT 1971, 1978). Selon la règle de l'intercalation (BRYANT et col., 1981), qui s'applique à différents modèles animaux : pattes de blatte, disques imaginaux de drosophile et membres d'amphibiens, des discontinuités dans les valeurs de l'information de position des cellules épidermiques provoquent une croissance locale. Les cellules néoformées prennent des valeurs intermédiaires de façon à rétablir la continuité de la distribution. Aussi, l'information de position semble-t-elle se situer au niveau des membranes plasmiques des cellules épidermiques. Chez la drosophile, des différences dans les propriétés des surfaces cellulaires sont responsables de la ségrégation des cellules qui appartiennent à différents compartiments du disque imaginal (MORATA et LAWRENCE, 1975) et de l'établissement du patron du disque (REINHARDT et col., 1977). Des différences antigéniques, corrélées avec la position ont été trouvées dans les disques imaginaux de drosophile (WILCOX et col., 1981, 1984 ; BROWER et col., 1981, 1984, 1985) et chez les blattes (BULLIERE et col., 1981, 1982 ; DE REGGI et col., 1986; GHARIB et col., 1987). Des changements dans la distribution de ces antigènes correspondent à des événements morphogénétiques (WILCOX et LEPTIN, 1985 ; LEPTIN et WILCOX, 1986). Ces antigènes de position sont des complexes de glycoprotéines (WILCOX et col., 1984) et plus précisément des homologues de récepteurs de vertébrés à la fibronectine (LEPTIN et col., 1987). Cependant, il n'a pas été établi que ces molécules soient responsables du déclenchement de la morphogenèse. Nous avons donc recherché des déterminants antigéniques impliqués dans l'expression de l'information de position au cours de la mise en place du régénérat. Pour cela nous avons cherché à fabriquer des anticorps monoclonaux dirigés contre les membranes plasmiques des cellules épidermiques. D'autre part, nous rapporterons les résultats obtenus sur notre matériel avec des anticorps monoclonaux dirigés contre les membranes des cellules épidermiques de *Blaberus craniifer* (DE REGGI et col., 1986).

L'étude cytochimique étant réalisée, nous avons tenté de perturber la morphogenèse régénératrice. Après l'autotomie, les interactions qui s'établissent entre les cellules épidermiques au moment de la cicatrisation sont décisives pour enclencher la régénération (BRYANT et col., 1981 ; DALE et BOWNES, 1985). La cicatrisation est donc la première étape du processus de déclenchement de la morphogenèse et selon FAIN et SCHNEIDERMAN (1973), l'étape la plus cruciale. La seconde étape étant celle de la mise en contact des surfaces des cellules épidermiques qui possèdent une information de position. Nous avons donc entrepris deux types d'actions : l'une sur la cicatrisation, l'autre sur les surfaces épidermiques du régénérat et leur environnement.

1 - Action sur la cicatrisation

L'étude de la cicatrisation d'une plaie chez les Insectes a fait l'objet de nombreux travaux. Nous savons que :

a - la présence d'hémocytes est indispensable pour que la cicatrisation puisse avoir lieu chez les blattes (DAY, 1952 ; DAY et BENNETTS, 1953 ; BRAEMER, 1956 ; BOHN, 1975, 1976, 1977). A la suite d'une blessure, la plaie est obturée par un caillot dont la formation est liée à la présence de deux protéines (BARWIG et BOHN, 1980 ; BOHN, 1986). L'une résulte de la rupture des hémocytes et constitue un gel. L'autre, d'origine plasmatique, rigidifie le gel qui se transforme en caillot ferme. La face interne de ce caillot est formée de plusieurs couches d'hémocytes aplatis et vivants.

b - la fermeture définitive de la plaie s'établit par la migration des cellules épidermiques. Pour WIGGLESWORTH (1937), cette migration est une réponse chimiotactique aux protéines résultant de l'autolyse des cellules blessées, tant épidermiques que sanguines. Pour BOHN (1975), les hémocytes ont un rôle de support mais servent aussi de guide chimique en libérant une substance attractive pour les cellules épidermiques.

Les propriétés coagulatrices des hémocytes d'Insectes sont modifiées par l'héparine (GREGOIRE, 1953). Celle-ci retarde la migration des cellules épidermiques et par là même, la cicatrisation d'une blessure provoquée dans la coxa de *Leucophaea maderae* (BOHN, 1976). Nous avons donc procédé à l'injection d'héparine chez nos animaux et nous avons observé les conséquences éventuelles de ces injections sur la cicatrisation et la morphogenèse du régénérat. Au cours de ce travail, nous avons noté une relation entre l'injection d'héparine et la durée de l'intermue. En complément, nous avons donc réalisé une étude des ecdystéroïdes.

2 - Action sur les surfaces cellulaires épidermiques et leur environnement.

Dans ce but, plusieurs tentatives de perturbation ont été réalisées :

a - L'étude du matériel de la chambre de régénération et de la surface apicale des cellules épidermiques du régénérat a montré que de nombreux sites anioniques sont présents en particulier au niveau des glycosaminoglycannes. Or, dans les matrices extracellulaires, les glycosaminoglycannes chargés négativement et les protéines qui leur sont associées sont précipités par le rouge de ruthénium (HAY, 1981). Par ailleurs, l'injection de cette substance dans la chambre de régénération renforce la densité aux électrons du matériel de la chambre de régénération. Nous l'avons injecté dans la chambre de régénération où, tout au moins momentanément, il doit neutraliser les charges négatives et, peut-être, modifier l'information de position des cellules.

b - Chez les Insectes, l'association de faces opposées provoque la formation de membres surnuméraires (BART, 1965 ; BOHN, 1965 ; BULLIERE, 1971 ; FRENCH, 1976 ; LENOIR-ROUSSEAU, 1981 ; TRUBY, 1986). Après avoir isolé des membranes plasmiques de cellules épidermiques de différents niveaux, tergites, sternites et différentes faces de fémur, nous les avons injectées dans la chambre de régénération de façon à créer des dysharmonies

entre le régénérat et les membranes injectées et déclencher ainsi des morphogenèses surnuméraires.

c - Nous avons démontré la présence de glycoprotéines dans le contenu de la chambre de régénération et à la surface des cellules épidermiques du régénérat. Nous avons tenté de modifier ces glycoprotéines de façon à perturber la morphogenèse régénératrice. Pour cela, nous avons procédé de deux façons :

- nous avons essayé de bloquer les sucres par des lectines qui ont la propriété de se lier spécifiquement à un sucre (GOLDSTEIN et col., 1980). Le choix des lectines injectées : Concanavaleine A, lectines d'*Helix pomatia* et de germe de blé, a été guidé par la présence dans notre matériel de mannose, N-acétyl -D-galactosamine et N-acétyl-D-glucosamine.

- nous avons tenté de provoquer une surabondance de N-acétyl-D-galactosamine en injectant ce sucre. Ce sucre a été choisi car la lectine d'*Helix pomatia* couplée à la fluorescéine a révélé son abondance naturelle dans le matériel de la chambre de régénération et à la surface des cellules épidermiques du régénérat. Nous espérons, de cette façon, modifier la synthèse de la partie glucidique des glycoprotéines.

MATERIEL ET TECHNIQUES

I - MATERIEL BIOLOGIQUE

Notre étude a été réalisée sur le phasme *Carausius morosus* Br. Cet Insecte Chéleutoptère aptère se reproduit toute l'année par parthénogenèse thélytoque.

Le développement post-embryonnaire s'effectue en 6 mues ; on y distingue deux périodes :

a - la période larvaire qui s'étend du stade I (naissance) au stade VI inclus. Le passage d'un stade au suivant est marqué par une exuviation. La durée de l'intermue est de 20 jours \pm 5 jours en fonction de la température. La taille des animaux croît régulièrement à chaque stade.

b - la période adulte qui débute après la sixième et dernière exuviation. Elle comprend uniquement le stade VII qui dure plusieurs mois. Dès la fin du premier mois de ce stade, l'animal, sexuellement mûr, pond journalièrement de 2 à 5 oeufs.

II - TECHNIQUES

A. Techniques d'élevage

Les animaux élevés à la température du laboratoire sont nourris de lierre.

A partir du stade I, les animaux atteignant un même stade sont recueillis quotidiennement et placés par groupes de 20 à 25 dans des récipients dont le fond est recouvert d'un papier filtre légèrement humecté.

B. Techniques opératoires

1. Anesthésie

Elle est assurée par un court séjour dans de l'eau additionnée d'un produit mouillant (teepol). Un rinçage dans de l'eau distillée débarrasse la cuticule des traces de mouillant.

2. Injections

Nous avons réalisé :

- soit des injections directement dans le corps de l'animal à l'aide d'une seringue Hamilton
- soit des microinjections. Elles se pratiquent, sous la loupe binoculaire, à travers la membrane articulaire coxo-trochantérienne dorsale ou ventrale à l'aide de micropipettes. Celles-ci sont

fabriquées à partir de tubes capillaires en verre de 5 μ l effilés par un étireur de microélectrodes. Un tube souple adapté sur l'extrémité non effilée nous permet de souffler avec la bouche la quantité de produit désirée. Les produits ont été injectés soit dans l'hémolymphe du moignon, soit dans la chambre de régénération.

3. Observations

Les observations sont faites à la loupe binoculaire après chaque exuviation et éventuellement en cours d'intermue. Dans ce cas, il faut rendre la cuticule du moignon coxo-trochantérien transparente en y déposant une goutte d'eau. Des dessins sont pris si nécessaire.

C - Techniques histologiques

Toutes les coupes ont été débitées parallèlement au plan dorso-ventral du moignon coxo-trochantérien et selon son axe proximo-distal.

1- Histologie classique

• Coupes

Les pièces sont fixées au Bouin-Hollande, déshydratées par l'alcool éthylique et imprégnées par l'alcool butylique qui évite un durcissement supplémentaire de la pièce, la cuticule étant déjà difficile à couper. Après inclusion dans la cytoparaffine (54-56°), des coupes de 6 μ m d'épaisseur sont débitées.

• Colorations

Des techniques de colorations classiques comme l'hématoxyline de Groat-éosine ont été utilisées. Des traitements particuliers : colorations cytochimiques, traitements enzymatiques, marquages fluorescents ont également été réalisés et les données techniques seront précisées dans les chapitres les concernant.

• Observations et photographies

Les observations sont effectuées à l'aide d'un microscope photonique Olympus BH2 RFL, soit en lumière blanche, soit en épifluorescence. Les photographies, pour la microscopie photonique, sont réalisées avec des films Kodak 50 Asa. Pour la fluorescence, nous avons

utilisé des films Kodak triX 400 Asa pour le noir et blanc et Kodak ektachrome 400 Asa pour la couleur.

2 - Coupes semi-fines

Les pièces sont fixées et incluses selon les techniques de la microscopie électronique. Les coupes de 2 μm d'épaisseur sont colorées au bleu de toluidine.

D - Techniques de microscopie électronique

1. Microscopie à transmission.

Les pièces sont fixées au glutaraldéhyde 2,5% dans du tampon cacodylate (0,1M;pH 7,4) pendant 2 à 3 heures à 4°C. Après lavage dans le même tampon, elles sont post-fixées pendant 1h30 à 4°C au tétr oxyde d'osmium à 1% dans le tampon cacodylate. Les pièces, déshydratées dans des concentrations croissantes d'éthanol et deux bains d'oxyde de propylène, sont incluses dans le mélange de SPURR (1969) en raison de sa très grande fluidité et donc de sa meilleure pénétration.

Les coupes sont contrastées par l'acétate d'uranyle à 2% dans l'alcool et le citrate de plomb (REYNOLDS, 1963) et observées au microscope électronique JEOL JEM 120 cx.

2. Microscopie à balayage

Les pièces fixées comme pour la microscopie électronique à transmission subissent deux déshydratations : la première dans l'alcool (30 à 100%), la seconde dans l'acétone (30 à 100%). Puis sont ensuite séchées dans un appareil à point critique. Le procédé de séchage est le suivant:

- 1 - les pièces sont introduites dans une chambre dont la température est de 10°C ;
- 2 - elles sont recouvertes par du CO₂ liquide lorsque la température de la chambre atteint 5°C. La pression doit être d'environ 50 bars ;
- 3 - la température de la chambre est amenée doucement à 40°C et à une pression de 100 bars. A ce moment, les conditions sont telles qu'on dépasse le point critique, 31°C et 72,9 atm pour le CO₂ ;
- 4 - avant de décompresser la chambre, la température est amenée à 45°C afin d'éviter toute condensation.

Ensuite, elles sont métallisées à l'or palladium dans un évaporateur sous vide. Les observations et les prises de vues sont effectuées au moyen d'un microscope électronique JEOL 120 cx équipé en balayage d'un système ASID 4D.

E - Autres techniques

D'autres techniques, en particulier des techniques immunologiques et d'électrophorèse, ont été utilisées. Celles-ci seront décrites dans les chapitres les concernant. Nous signalerons uniquement ici que, pour les techniques immunologiques, les témoins sont des sérums de souris non immunisées que nous avons appelé : sérum de souris témoin.

F - Produits et milieux utilisés

- Liquide physiologique de BART (non publié), pH 6,5 po 250

Na ₂ H PO ₄ ,2H ₂ O	1,51 g/l
KH ₂ PO ₄	0,98 g/l
KCl	3,27 g/l
Ca Cl ₂	0,95 g/l
Mg Cl ₂	11,45 g/l
MgSO ₄	1,90 g/l
Eau distillée qsp	1 l

- Tampon PBS

Na ₂ H PO ₄ , 2H ₂ O	1,3 g/l
Na ₂ H PO ₄ ,H ₂ O	0,3 g/l
Na Cl	9 g/l
Eau distillée qsp	1 l

- Tampon de transfert (western blot) , pH 8,35

Tris	20 mM
Glycine	150 mM
Méthanol	20%
Eau distillée qsp	1 l

- Milieux de culture

Milieu de culture tissulaire (TCM), pH 7,3

Dulbecco's modified Eagle medium avec glucose (1000 mg/l)

L-glutamine et pyruvate de sodium : 10 g (GIBCO)

Hepes : 5,9 g (SIGMA)

NaCl : 1,74 g

NaHCO₃ : 0,35 g (MERCK)

Eau distillée qsp 1 l

Dulbecco

Dulbecco's modified Eagle medium avec glucose (4500 mg/l) et L-glutamine : 500 ml (GIBCO)

NaHCO₃ : 37 g (MERCK)

HCl : 6 ml (MERCK)

Péni-strepto

Eau distillée qsp 10 l

Milieu A

Dulbecco : 500 ml

Sérum de veau foetal décomplémenté : 100 ml

Acides aminés non essentiels (NEA) : 6 ml (SEROMED)

Milieu HT

Milieu A : 500 ml

Hypoxanthine : 30 ml (SIGMA) (1,4 mg Hypoxanthine dans 100 ml de Dulbecco)

Thymidine : 6 ml (SIGMA) (3 mg Thymidine dans 1 l H₂O)

Milieu HAT

Milieu HT : 500 ml

Aminoptérine : 6 ml (SIGMA) (0,22 mg Aminoptérine dans 1 l de Dulbecco)

G - Liste des abréviations utilisées dans la légende des figures et des planches

AT :	apodème trochantérien
C :	coxa
Ca :	caillot
Cc :	cuticuline
CE :	cellules épidermiques
CG :	coagulum
CI :	couche interne du caillot
CM :	couche moyenne du caillot
CR :	chambre de régénération
Cu :	cuticule
D ou d :	face dorsale
DD :	diaphragme distal
DP :	diaphragme proximal
E :	épiderme
E ex :	espace exuvial
Ed :	ecdysial droplet
En :	endocuticule
Ep :	épicuticule
Ex :	exocuticule
F :	fémur
G :	appareil de Golgi
g :	griffe
Hc :	hémocyte
Hd :	hémidesmosome
He :	hémolymphe
LB :	lame basale
LE :	ligne extérieure du décollement de l'épiderme
LI :	ligne intérieure du décollement de l'épiderme
M :	muscles
Ma :	membrane articulaire
Mad :	membrane articulaire dorsale
Mav :	membrane articulaire ventrale

N :	nerf
N :	noyau
NC :	nouvelle cuticule
o :	onychium
oc :	grain d'ommochrome
p :	face postérieure
PC :	procuticule
pc :	pore canal
Pt :	prétarse
pt :	grain de ptérine
R :	régénérat
RER :	réticulum endoplasmique
T :	trachée
Ta :	tarse
Ti :	Tibia
Tr :	trochanter
V ou v :	face ventrale
ZA :	zone d'assemblage
Za :	zonula adhaerens

PREMIERE PARTIE

**ETUDE DE LA MISE EN PLACE
ET DU DEVELOPPEMENT D'UN REGENERAT
DE PATTE APRES AUTOTOMIE**

CHAPITRE I
ETUDE STRUCTURALE

Chez le phasme *Carausius morosus*, l'autotomie d'une patte est suivie d'une régénération. La mise en place et le développement du régénérat n'ont pas été étudiés de façon approfondie. Aussi avons-nous repris ce travail à la fois en histologie et en ultrastructure. Avant d'aborder l'étude du régénérat, nous rappellerons la structure d'une patte normale de phasme. Parallèlement à l'étude de la formation du régénérat, nous avons suivi l'évolution du tégument coxo-trochantérien au cours d'une intermue normale.

I - STRUCTURE D'UNE PATTE DE PHASME

Depuis le corps de l'animal jusqu'à l'extrémité distale d'une patte différenciée, on distingue cinq subdivisions : la coxa, le trochanter, le fémur, le tibia et le tarse pluriarticulé. Ce dernier comprend cinq articles et se termine par l'onychium constitué d'une pelote adhésive axiale encadrée par deux griffes, extrémité tarsale dénommée prétarse par FOURNIER (1971) pour les pattes embryonnaires (Fig. 1).

L'autotomie d'une patte s'effectue toujours à la limite trochanter-fémur marquée par un liseré cuticulaire brun sombre. Aussi, après autotomie, il ne persiste sur l'animal que le moignon coxo-trochantérien. Pour l'interprétation de l'articulation trochanter-fémur, Pl II, 3, nous nous sommes référés à la description de POSSOMPES (1966).

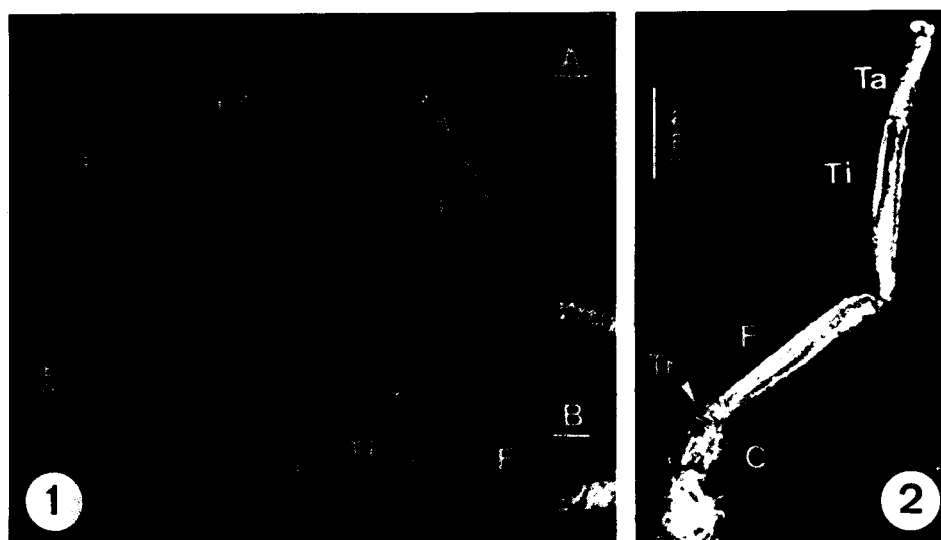


Fig. 1 : Aspect morphologique d'une patte mésothoracique normale (1A) et régénérée (1B et 2) chez un animal en stade V. Régénérat obtenu après autotomie dans les premiers jours du stade IV. Le tarse de la patte normale possède 5 articles, celui de la patte régénérée n'en possède que 4. C, coxa ; F, fémur ; Ta, tarse ; Ti, tibia ; Tr, trochanter.

II - ETUDE DU REGENERAT

Pour cette étude, nous avons provoqué l'autotomie par pression au niveau proximal du fémur. La durée d'une intermue varie en fonction de la température et par ailleurs, malgré des conditions homogènes d'élevage et d'expérimentation, les variations de durées de l'intermue sont parfois importantes. Plutôt que de nous référer à la durée dans l'intermue, nous avons établi une table de développement fondée sur l'évolution morphologique du régénérat. Dans un premier temps, nous rappellerons la structure d'une patte régénérée. Dans un deuxième temps, nous présenterons notre table de développement et dans un troisième temps, nous décrirons les aspects du moignon coxo-trochantérien au cours de l'intermue.

A - Structure d'une patte régénérée

Elle diffère d'une patte normale par son tarse qui est toujours hypotypique et qui, dans les meilleurs cas, possède quatre articles (Fig. 1).

Plus l'autotomie est pratiquée tôt dans la phase larvaire, plus la taille des régénérats chez l'adulte est grande (VOY, 1952). Lorsque l'autotomie a lieu en fin de stade V ou en début de stade VI, on obtient chez l'adulte un bourgeon peu différencié avec parfois les griffes du tarse.



Fig. 2: Régénérats obtenus chez l'adulte après une autotomie pratiquée en fin de stade V (1) ou en début de stade VI (2). Les régénérats sont petits et seul l'onychium est discernable. Même échelle. C, coxa ; ma, membrane articulaire coxo-trochantérienne ; o, onychium ; R, régénérat.

B - Table de développement du régénérat (Fig 3, Pl.I,Pl.II)

L'épiderme se décolle progressivement de la cuticule en direction basipète et laisse apparaître la chambre de régénération.

La présence, à la limite coxa-trochanter, de deux apodèmes, qui se prolongent dans la coxa, fait qu'on observe deux niveaux :

- le niveau de décollement de l'épiderme et que nous appellerons ligne extérieure,
- le niveau qui marque la limite trochantéro-coxale que nous dénommerons ligne intérieure.

La table de développement du régénérat a été établie d'après une étude à la loupe binoculaire de son aspect à l'intérieur du moignon coxo-trochantérien et de la position de la ligne extérieure.

Les autres observations découlent d'une étude histologique.

Depuis le moment de l'autotomie, 1 jour après le passage en stade IV, huit phases ont été définies. Pour une durée d'intermue de 20 jours, chaque phase dure environ 2 à 3 jours excepté la phase 8 dont la durée moyenne est de 4 jours.

Phase 1

Après l'autotomie, la plaie est obturée par un caillot qui prend rapidement une coloration noirâtre. Le moignon coxo-trochantérien n'est pas modifié.

Phase 2

L'épiderme se décolle de la cuticule du trochanter et migre sous le caillot. A la fin de la phase 2, la cicatrisation est terminée. Le blastème de régénération est mis en place.

Phase 3

La ligne extérieure atteint le bas du trochanter et la ligne intérieure le niveau proximal des membranes articulaires. Le régénérat ressemble à une petite tige dont l'extrémité distale est aplatie parallèlement au caillot. Entre la cuticule et le régénérat, la chambre de régénération est apparue.

Phase 4

La ligne de rétraction extérieure atteint la partie distale de la coxa et intérieurement la moitié de la coxa. Le régénérat a l'aspect d'un cylindre. Deux constriction sont présentes, l'une distale qui préfigure le prétarse visible principalement en microscopie photonique et l'autre proximo-ventrale qui sépare le régénérat en deux zones qui préfigurent le fémur et le tibio-tarse.

caillot cicatrisation

niveau de rétraction de l'épiderme

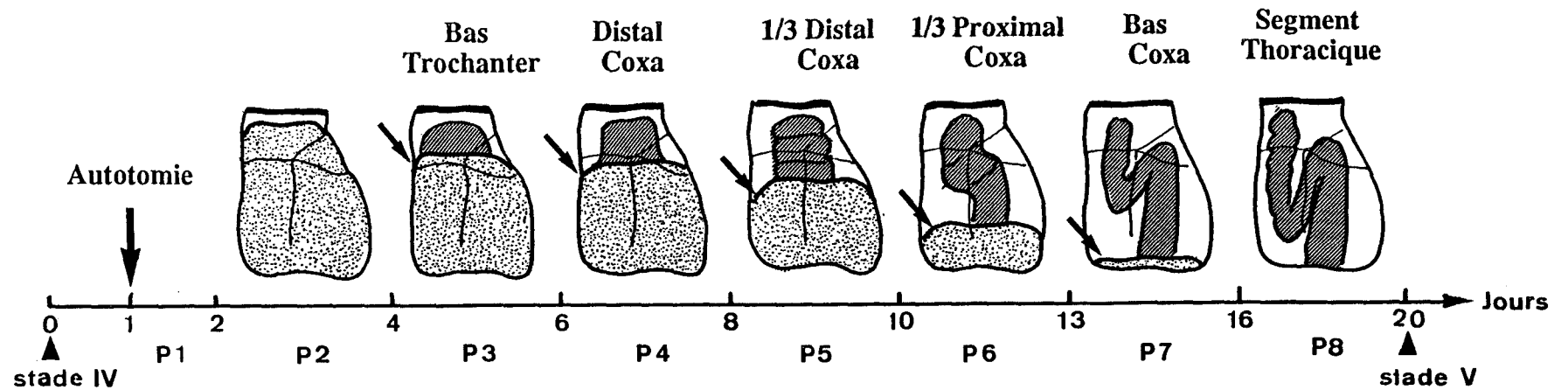


Fig. 3 : Table de développement d'un régénérat de patte dont l'autotomie a été provoquée 1 jour après le passage du phasme en stade IV. L'observation du moignon coxo-trochantérien à la loupe binoculaire permet de définir 8 phases. Les schémas représentent la limite apparente de décollement de l'épiderme (→) et l'aspect morphologique du régénérat (▨) au cours des différentes phases.

Phase 5

La ligne de rétraction atteint le 1/3 distal de la coxa. La base du régénérat est située au bas de la coxa. Extérieurement, le régénérat semble formé de 3 segments. En histologie, quatre constrictions séparent le régénérat en cinq segments : trochanter, fémur, tibia, tarse et prétarse. Le prétarse est bien visible ainsi que l'apodème prétarsal.

Phase 6

Il semble que le décalage entre la ligne extérieure de rétraction située au 1/3 proximal de la coxa et la ligne intérieure qui atteint le segment thoracique soit moins important. Le régénérat, qui semble ne posséder que trois subdivisions, grandit et se replie du côté ventral. L'étude histologique nous révèle qu'en fait, tous les articles sont présents et la segmentation du tarse s'ébauche.

Phase 7

La ligne de rétraction extérieure atteint le bas de la coxa ; intérieurement la rétraction se poursuit dans le segment thoracique. Le régénérat est replié en S, tous les articles sont visibles. L'histologie montre que les quatre articles du tarse sont présents et que la limite tibio-tarse atteint la moitié du fémur.

Phase 8

La ligne extérieure atteint le segment thoracique. Le régénérat, dont le repliement est terminé, augmente de taille jusqu'à occuper, juste avant la mue, presque toute la chambre de régénération. La limite tibio-tarse atteint le bas de la coxa.

C. Aspects du moignon coxo-trochantérien au cours de l'intermue (PL.I à VIII)

Nous étudierons successivement le caillot, la chambre de régénération et l'épiderme.

1. Le caillot

Les hémocytes qui s'agglutinent contre la membrane hémostatique constituent très rapidement une croûte mince et jaunâtre qui brunit puis devient noire et s'épaissit jusqu'en phase 3. Pendant les deux premières phases, le caillot présente, en microscopie électronique à transmission, trois zones (Pl.VI, 1) :

1 - une zone externe, le coagulum dépourvu de cellules ou d'éléments cellulaires.

2 - une zone moyenne où les cellules, bien que discernables, sont en pycnose. Ces cellules très allongées sont plaquées contre la première zone.

3 - une zone interne où les cellules sont vivantes. Ces cellules très allongées peuvent constituer des couches lâches, parallèles au caillot également observables en microscopie photonique. En phase 2, cette couche est constituée essentiellement de granulocytes. Ceux-ci montrent de grands prolongements entre lesquels du matériel fibrillaire est visible (Pl. VI, 2). Ils possèdent un réticulum endoplasmique rugueux très abondant et des vacuoles remplies d'un matériel floconneux dont l'aspect diffère de celui de l'hémolymphe coagulée.

En microscopie électronique à balayage (Pl. IV, 1), on retrouve à la face interne du caillot des cellules avec de grands prolongements, des cellules aux formes pointues qui semblent parfois fichées dans le caillot et du matériel d'aspect fibrillaire d'environ 0,5 μm de largeur.

2. La chambre de régénération

L'épiderme en se séparant de la cuticule et en se rétractant en direction proximale laisse apparaître le régénérat et la chambre de régénération. La chambre de régénération est donc l'espace compris entre la cuticule du moignon coxo-trochantérien, le caillot, l'épiderme en rétraction et l'épiderme du régénérat. Elle est présente dès la phase 3.

Le régénérat extrait du moignon coxo-trochantérien est entouré d'une gangue transparente à aspect gélinifé qui remplit la chambre de régénération.

Le matériel de la chambre de régénération se présente toujours sous deux aspects : fibrillaire et granulaire. En microscopie photonique, les fibres sont orientées proximo-distalement (Pl. I, 5). Dans la zone proche de l'épiderme du régénérat, les fibres constituent parfois une sorte de réseau qui délimite des zones apparemment dépourvues de matériel et d'aspect bulleux. Le matériel granulaire est visible principalement dans la partie proximale de la chambre et ce dès la phase 3. La taille des grains est de 1,5 à 2 μm . Des cellules sont présentes en nombre parfois important même avant l'exuviation (Pl. II, 1).

En microscopie électronique à balayage, la gangue observée après l'extraction du régénérat n'est pas toujours retrouvée. Lorsque du matériel est présent, il est constitué de fibres et de granules. Au cours de la phase de déshydratation que comporte la préparation de l'échantillon, il y a affaissement du matériel qui forme le gel hydraté. Ceci a été signalé également par TRELSTAD et BIRK (1984) pour la matrice extracellulaire de la cornée chez l'embryon de poulet. Les fibres dont l'épaisseur varie de 15 à 160 nm sont agencées de façon variable. Elles

peuvent constituer des lames dans lesquelles on retrouve une orientation proximo-distale (Pl. IV, 2), ce matériel semble entourer des zones dépourvues de matériel (Pl. IV, 4). A la surface du régénérat, de nombreux grains, de toutes tailles (0,5 à 4,5 μm) sont observables (Pl. IV, 5). Ces granules principalement abondants en phase 4 et 5 semblent expulsés à la surface de l'épiderme (Pl. IV, 6). Ils peuvent correspondre à ceux observés en microscopie photonique. Des mamelons sont visibles à la surface du régénérat, leur taille et leur forme suggèrent qu'il s'agit de cellules en division faisant saillie (Pl. III, 4). Sur la surface du régénérat, on observe des cellules arrondies ou aplaties et avec de grands prolongements qui correspondent vraisemblablement aux cellules visibles, en microscopie photonique, dans la chambre de régénération. En phase 8, ce sont principalement des débris cellulaires qui se retrouvent sur la surface épidermique (Pl. III, 6). En microscopie électronique à transmission, le matériel d'aspect floconneux est organisé en fibrilles (Pl. VII, 2). En phase 3, sous le caillot, des fibres d'environ 5 nm sont regroupées et disposées parallèlement à l'épiderme (Pl. VII, 1). En phase 8, une couche continue constitue un front au-dessus de l'épiderme qui sécrète son épicuticule (Pl. VIII, 3). Une étude plus détaillée du matériel de la chambre de régénération sera faite avec la mise en évidence des composés contenus dans ce matériel. Certaines des cellules, présentes dans la chambre de régénération, semblent être des granulocytes (Pl. VII, 3). En fin d'intermue, la membrane plasmique de ces cellules disparaît et seules de nombreuses vésicules et des granules plus ou moins denses aux électrons sont présents.

3. L'épiderme

Chez les Insectes, l'épiderme, constitué d'une seule couche de cellules, est limité extérieurement par la cuticule qu'il sécrète et qui lui sert d'exosquelette et, intérieurement, par une membrane basale qui le sépare de l'hémocoèle. Nous comparerons, au cours du stade IV, l'évolution de l'épiderme coxo-trochantérien d'une patte normale et celle de l'épiderme d'un moignon pour lequel l'autotomie a été provoquée en début de stade. Pour cela, nous étudierons la cohésion des cellules épidermiques, c'est-à-dire : les relations entre les cellules épidermiques, les relations cellules épidermiques - cuticule, cellules épidermiques - lame basale et les modifications des cellules épidermiques.

a. Cohésion des cellules épidermiques

1. Relation entre les cellules épidermiques

Les cellules épidermiques d'une structure coxo-trochantérienne normale, dont le nombre augmente, passent d'un aspect cubique à un aspect en colonne. Ces cellules contiguës sont plus ou moins imbriquées et connectées dans leur partie circumapicale par des jonctions spécialisées dont les plus fréquentes sont les zonula adherens et les jonctions septées. En début d'intermue, les membranes plasmiques latérales sont interdigitées dans la partie apicale et ont une imbrication plus lâche dans la partie basale (Pl.V, 1 et 2). En fin d'intermue, les cellules ne sont plus imbriquées, de façon assez lâche, que dans les parties apicales.

L'autotomie provoque la rupture de l'épiderme. Un jour après cette autotomie, dans la partie distale du trochanter, l'épiderme se décolle de la cuticule et commence sa migration vers l'axe du moignon. Les cellules épidermiques s'allongent considérablement et s'insinuent entre la croûte et les hémocytes qui se sont accumulés au centre du moignon. Ces cellules sont discernables en microscopie électronique à transmission grâce aux vésicules claires qui correspondent aux ptérines. L'épiderme cicatriciel gagne l'axe du moignon et constitue un feuillet parallèle au caillot (Pl.VI, 1). En fin de phase 2, la plaie est totalement obturée. L'épiderme continue sa rétraction en direction proximale et les cellules épidermiques qui se décollent de la cuticule prennent un aspect en colonne. Les cellules épidermiques du régénérat demeurent très accolées dans leur partie apicale mais sont très espacées et présentent de grandes digitations dans leur partie basale. Dès la phase 4, les espaces intercellulaires s'estompent. En phase 5, les cellules sont grandes, serrées les unes contre les autres mais en phase 7 de grands espaces réapparaissent entre les parties basales des cellules qui sont alors très allongées dans le sens apex-base (Pl.VIII, 1). Juste avant la mue, l'épiderme est très plissé.

2. Relations cellules épidermiques-cuticule

Dans la structure coxo-trochantérienne normale, la membrane plasmique apicale présente des villosités et est surmontée d'une cuticule dont l'épaisseur augmente jusqu'au moment de l'apolyse qui a lieu à la fin du deuxième tiers de l'intermue. En microscopie photonique, cette cuticule semble formée de deux couches (Pl. I et II) : une couche externe, d'environ 4 μm d'épaisseur, et une couche interne qui peut atteindre 10 μm et qui seule est colorable par les

colorants histologiques. En microscopie électronique, on retrouve les couches décrites chez l'embryon de *Carausius* prêt à éclore (LOUVET, 1974). Chez cet embryon, la troisième couche cuticulaire qui correspond à la première couche de la larve, se compose d'une épicuticule externe encore appelée cuticuline par LOCKE (1966), d'une épicuticule interne et d'une procuticule (Pl.V, 1). Chez nos animaux, l'épaisseur de l'épicuticule est de 0,5 μm , la procuticule se compose d'une exocuticule (3,5 μm d'épaisseur), présente à l'exuviation, et d'une endocuticule déposée pendant l'intermue et dont l'épaisseur peut atteindre 10 μm . Entre l'endocuticule et la membrane plasmique, il existe une couche mince qui semble constituer de matériel fibrillaire appelée "subcuticular layer" par SCHMIDT (1956) et zone d'assemblage par DELBECQUE et col. (1978). Au niveau des membranes articulaires, on ne distingue qu'une seule couche, colorable par les colorants histologiques, dense aux électrons mais non lamellée. Au moment de l'apolyse, l'épiderme se décolle de la cuticule puis le fluide exuvial est sécrété. Au début du dernier tiers de l'intermue, la nouvelle cuticule est déposée. En microscopie électronique, la membrane plasmique apicale présente de nombreuses et grandes digitations. La sécrétion cuticulaire ne s'effectue pas partout au même moment puisque, dans une même zone, on peut trouver une couche d'épicuticule externe continue ou discontinue ou une couche d'épicuticule externe et interne (Pl.V, 3 et 4). La digestion de l'endocuticule se poursuit, l'espace exuvial est plus grand. Cet espace exuvial est rempli d'un matériel fibrillaire et granulaire. Les fibrilles peuvent avoir une épaisseur d'environ 5 nm et les granules ressemblent aux "ecdysial droplets" décrits par LOCKE et KRISHNAN (1973) chez *Calpodes*. Comme pour ces auteurs, les granules sont visibles également dans l'endocuticule en cours de digestion (Pl. V, 4). Mais, contrairement à ces auteurs et à d'autres (MALEK, 1958 ; RINTERKNECHT et LEVI, 1966), nous n'avons pas noté la présence de membrane ecdysiale.

Dans le moignon coxo-trochantérien, lorsque l'épiderme se détache de la cuticule, la membrane plasmique apicale présente de grandes digitations dont l'extrémité est coiffée d'un matériel dense aux électrons. Bien que ce phénomène se produise rapidement après l'autotomie, il évoque l'apolyse d'une structure coxo-trochantérienne non autotomisée. La cuticule, quant à elle, semble moins structurée et en partie digérée (Pl.VI, 3.). Les digitations s'éloignent plus ou moins de cette cuticule et la chambre de régénération se constitue.

En histologie classique, l'épaisseur de la cuticule du moignon coxo-trochantérien ne varie pas.

3. Relation cellules épidermiques - lame basale

L'épiderme des Insectes est séparé de l'hémolymphe par la membrane basale qui est constituée d'un matériel amorphe. Cependant, chez les Insectes, entre l'épiderme et la membrane basale, se trouve une couche fibrillaire constituée de fibrilles de collagène striées de type collagène I (ASHHURST, 1985 ; FRANÇOIS, 1985).

Au cours de la formation du régénérat, la lame basale a disparu sous l'épiderme en migration et sous les cellules épidermiques très espacées. Ces cellules en contact avec l'hémolymphe présentent de grandes digitations. De nombreux hémocytes et en particulier des granulocytes en sont proches. A partir de la phase 5, des zones denses aux électrons apparaissent de proche en proche au niveau de la membrane plasmique basale (Pl. VIII, 1) et du matériel se condense à proximité de ces zones. Il semble s'agir de la mise en place des hémidesmosomes et de la lame basale. En phase 6, le nombre des hémidesmosomes augmente et à partir de la phase 7, la lame basale est présente mais très discrète.

Sous l'épiderme du régénérat, les fibres de collagène sont absentes. En revanche, sous l'épiderme coxo-trochantérien d'une patte non autotomisée, la couche de tissu conjonctif, dont l'épaisseur varie de 0,2 à 2 μm , est constituée d'un matériel qui revêt des aspects différents (Fig. 4). Ce matériel est constitué de fibres plus ou moins enchevêtrées observables sous différentes sections. Celles qui apparaissent striées ont une périodicité d'environ 60 nm. De nombreux hémidesmosomes sont présents à la face basale des cellules épidermiques en contact avec la couche fibrillaire.

Des fibres de collagène striées ont été observées dans la couche basale située sous l'épiderme de sternites. Il faut cependant remarquer que, paradoxalement, c'est après action de la collagénase que les fibres ont pu être observées convenablement. Ces sternites fixés ou non au paraformaldéhyde étaient restés 30 minutes ou 2 heures à la température de la pièce (environ 20°C) dans du liquide physiologique de BART contenant 0,5 ou 1 mg/ml de collagénase. Une partie du matériel a disparu et les fibres de collagène très nettes montrent une périodicité bien marquée d'environ 60 nm (Fig. 4). Les mêmes traitements à 37°C ont fait disparaître presque totalement la couche basale. Chez des sternites non soumis au traitement, les fibres de collagène ne sont pas visibles. Selon ASHHURST, 1985, dans beaucoup de tissus, les fibres de collagène sont masquées par d'autres composants matriciels qui se condensent sur elles, vraisemblablement au cours de la préparation du matériel. Il est également possible que, n'étant pas pure, la collagénase ait d'abord enlevé des composants autres que le collagène. Sous cette

couche de matériel fibrillaire, juste en bordure de l'hémolymphe, on distingue une couche dense aux électrons, d'environ 50 nm d'épaisseur qui semble correspondre à la membrane basale décrite par ASHHURST, 1985 et FRANÇOIS, 1985.

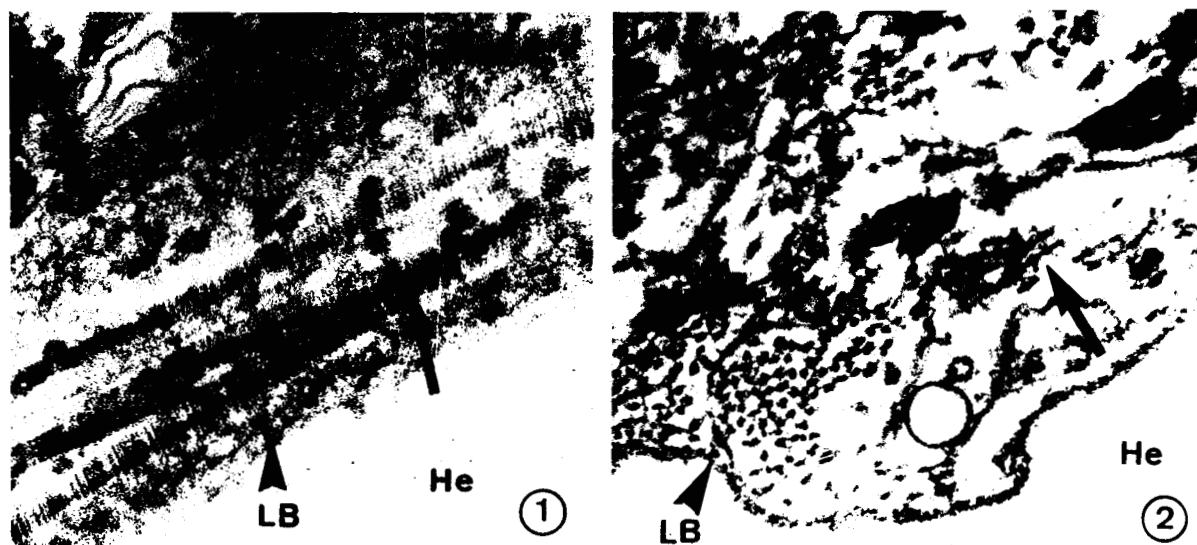


Fig. 4 : Aspects ultrastructuraux de la membrane basale située sous l'épiderme du sternite (1) ou d'une structure coxo-trochantérienne (2). Une couche fibrillaire est présente entre l'épiderme et la lame basale.

1. Après un traitement partiel à la collagénase, les fibres de collagène sont parfaitement observables (—→). x 108000.

2. Du matériel fibrillaire (—→) est également présent entre l'épiderme coxo-trochantérien et la lame basale qui est plus mince que celle du sternite. x 38000.

E, épiderme ; He, hémolymphe ; LB, lame basale.

b. Modification des cellules épidermiques

1. Les noyaux

En phase 1, les noyaux du trochanter ont une forme plus ou moins régulière, parfois lobée, ceux de la coxa sont arrondis. Ces noyaux apparaissent assez clairs, l'hétérochromatine étant soit plaquée contre la face interne de l'enveloppe nucléaire, soit associée au nucléole qui est le plus souvent excentré. Au cours de la migration des cellules épidermiques, les noyaux gardent cet aspect. Dès la phase 3, la taille des noyaux du régénérat est plus importante que celle des noyaux de la coxa. Ces noyaux s'allongent jusqu'à ce que leur grand axe occupe celui de la

cellule. La chromatine y est finement dispersée. A partir de la phase 7, ils sont très nombreux, s'arrondissent et la chromatine se condense. En phase 8, ils sont plaqués contre la face apicale des cellules. Il faut également souligner l'abondance des pores nucléaires en phases 5 et 6. Les mitoses apparaissent dès la phase 2 et sont visibles jusqu'à la mue. Toutefois, c'est pendant les phases 4, 5 et 6 qu'elles sont les plus abondantes. Elles se situent d'abord au niveau dorsal du trochanter (phase 2), puis à l'apex et au niveau moyen du régénérat, principalement du côté ventral (phase 3), ensuite sur toute la hauteur du régénérat.

En même temps que se produisent des mitoses, des cellules dégénèrent et ce plus particulièrement pendant les phases 6 et 7 (Pl. VIII, 2). Au cours de nos observations, nous n'avons jamais vu le rejet de ces cellules dans la chambre de régénération et leur disparition semble plutôt résulter d'une phagocytose par les cellules voisines où des hétérophagosomes ont été observés.

2. La membrane plasmique

La membrane plasmique basale ayant déjà été évoquée dans les relations cellules épidermiques-lame basale, nous ne parlerons ici que de la membrane plasmique des faces apicales et latérales.

- Surface apicale

Au niveau des cellules en migration, la membrane plasmique apicale est pratiquement dépourvue de microvillosités. Lorsqu'elle se détache de la cuticule, elle présente des digitations assez grandes et espacées. Les extrémités de ces digitations sont recouvertes d'un matériel dense aux électrons et parfois aussi de cuticule. Entre ces digitations, on peut voir des vésicules revêtues. Là où elle est encore attachée à la cuticule, son aspect est semblable à celui de la membrane plasmique apicale d'un témoin. Lorsque le régénérat se forme, la membrane qui s'est éloignée de la cuticule présente des digitations dont le nombre et la taille augmentent en même temps que le régénérat grandit.

Ces digitations ne ressemblent pas aux villosités que présente une membrane plasmique avant la sécrétion de cuticule puisqu'elles n'ont pas d'orientation particulière et ne sont pas toutes de même taille. On peut observer à leur base des vésicules revêtues et à leur extrémité du matériel dense aux électrons (Pl. VII, 4). La sécrétion d'épicuticule externe commence à la fin de la phase 7. En phase 8, le dépôt de l'épicuticule externe se termine (Pl. VIII, 3) et les autres couches cuticulaires sont sécrétées.

- Surfaces latérales

Dans le régénérat, l'aspect interdigité des membranes plasmiques latérales apparaît uniquement en phase 8.

3. Le cytoplasme

Dans le cytoplasme des cellules épidermiques de *Carausius*, trois types de grains de pigments ont été décrits par BERTHOLD et SEIFERT, 1977. Il s'agit de granules de ptérides, d'ommochromes et de caroténoïdes. Les granules de ptérides sont situés principalement dans la zone apicale (Pl. V, 1 et 2) et permettent le repérage des cellules épidermiques en migration sous le caillot.

De la phase 1 à la phase 6 du régénérat, les granules pigmentaires sont peu nombreux voire même inexistantes. Dans le régénérat, les granules de ptérides apparaissent en phase 7. Les granules d'ommochromes normalement très abondants sont peu nombreux même en phase 8 et les régénérats libérés à l'exuviation sont peu pigmentés. Les grains de caroténoïdes qu'on peut observer dans l'épiderme sternal sont absents du régénérat et du reste du moignon coxo-trochantérien.

Dans les cellules du régénérat, les microtubules et les ribosomes sont très nombreux. Les microtubules n'ont pas d'orientation particulière et ne constituent pas de gros faisceaux comme chez les témoins. Toutefois, dans la partie basale des cellules, à partir de la phase 3, on trouve de grands microtubules orientés selon l'axe apex-base. Le réticulum endoplasmique n'est jamais très abondant. L'appareil de Golgi, très important en phase 5, est réparti dans toute la cellule. Pendant la phase 5 et principalement en phase 6, on remarque la présence de nombreuses petites vésicules revêtues près de la membrane plasmique apicale et de nombreux corps multivésiculaires clairs dans la zone apicale des cellules.

4. L'intérieur du régénérat

La microscopie électronique à balayage montre que les extrémités distales des trachées sont comblées par des hémocytes pendant la phase 1. En phase 2, ces extrémités se nécrosent et se ferment. Au fur et à mesure que le régénérat grandit, les trachées du moignon se rétractent (Pl. I et II) et atteignent le bas de la coxa à la fin de la phase 6. La trachée est entraînée avec le nerf. En phase 7, l'ensemble du régénérat est à nouveau parcouru par des trachées et des nerfs .

Pendant les phases 1 et 2, les hémocytes sont agglutinés sous la croûte et les cellules épidermiques s'insinuent entre la croûte et le massif cellulaire hémocytaire (Pl. VI, 1). On note la présence de phagocytes qui vraisemblablement ont ingéré des cellules épidermiques puisque des granules de ptérines sont présents à l'intérieur de ces hémocytes. A partir de la phase 3, on ne trouve plus que des hémocytes circulants ou plaqués contre la partie basale des cellules épidermiques du régénérat.

Le muscle transversal du trochanter disparaît pendant la phase 2. Dans la coxa, on observe une diminution progressive de la masse musculaire depuis la phase 2 jusqu'à la phase 7 (Pl. I et II). Dès les premières phases, de grandes travées conjonctives constituent des lames qui, en microscopie électronique à balayage, délimitent des espaces à l'intérieur desquels se trouvent des fibres. Les cellules mésodermiques se divisent dès la phase 3 et en phase 5 le nombre des mitoses est important. Un massif cellulaire apparaît contre la face basale des cellules épidermiques du 1/3 disto-ventral du régénérat en phase 4. Ce massif va constituer l'apodème tendineux (Pl. I, 4). En phase 5, des massifs mésodermiques se mettent en place à la limite fémur-tibia du côté dorsal et ventral. En phase 6, ces massifs sont plus grands et s'insèrent sur les apodèmes fémoro-tibiaux qui sont apparus. Les trois apodèmes tibio-tarsaux (dorsal, ventral et postérieur) apparaissent en phase 7.

III . DISCUSSION et CONCLUSION

La régénération d'une patte de phasme après autotomie s'effectue en trois étapes qui englobent chacune plusieurs phases de notre table de développement :

- 1 - la fermeture de la plaie (P1 et P2)
- 2 - la morphogenèse du régénérat (P3, P4, P5 et P6)
- 3 - la croissance du régénérat (P7 et P8)

Dans un premier temps, le caillot se forme et l'épiderme trochantérien migre vers l'axe du moignon coxo-trochantérien. Dès que la plaie est obturée, les premières mitoses apparaissent dans l'épiderme du trochanter et le blastème de régénération se constitue. Dans un deuxième temps, l'épiderme se sépare de la cuticule en direction basipète, donne naissance à la chambre de régénération et simultanément le régénérat s'élabore. Comme pour les pattes embryonnaires de phasme (FOURNIER, 1971), les articles du régénérat se mettent en place progressivement. En phase 4, deux strictections séparent le prétarse du tibio-tarse et le tibio-tarse du fémur. En

phase 5, deux nouvelles constrictionns séparent le tibia et le tarse, le fémur et le trochanter . En phase 6, tous les articles sont présents et le régénérat se replie en S. Dans un troisième temps, le régénérat croît jusqu'à occuper la presque totalité du moignon coxo-trochantérien. Chez la *Drosophile*, l'apparition des articles est également progressive puisque ce n'est qu'au moment de l'évagination que tous les segments correspondant aux différents articles sont présents (FRISTROM,1974).

Les modalités de fermeture de la plaie et la mise en place du régénérat sont analogues à celles décrites chez les blattes *Periplaneta* après autotomie (TRUBY, 1983) ou *Blabera* après amputation du tarse (BULLIERE, 1972b) et chez le Crustacé Isopode *Helleria* (HOARAU, 1973). Contrairement à ce dernier cas, il n'y a pas de période de latence après la cicatrisation puisque chez *Carausius*, l'activité mitotique débute au moment de la fermeture de la plaie. Les mitoses ne se produisent pas dans l'épiderme en migration mais dans l'épiderme qui se sépare de la cuticule. La formation du blastème implique la dédifférenciation des cellules environnantes qui se manifeste essentiellement par une dépigmentation. Ces résultats sont en accord avec ceux de TRUBY (1983). Le blastème ne se forme pas uniquement à partir des cellules immédiatement au voisinage de la blessure comme l'a suggéré PENZLIN (1963). Quant à la séquence de reconstitution des articles, elle se fait en direction basipète: les articles distaux apparaissent avant les proximaux. Il s'agit donc d'une différenciation disto-proximale comme pour TRUBY(1983) plutôt que proximo-distale comme pour O'FARREL et STOCK (1954). Par ailleurs, elle est comparable à la ségrégation des articles au cours du développement d'une patte embryonnaire de *Carausius* (FOURNIER, 1971).

La lame basale, présente sous l'épiderme coxal et trochantérien, disparaît au moment de la cicatrisation sous les cellules en migration. Elle apparaît, de façon discrète, dans le régénérat en fin d'intermue. La lame basale n'est donc pas indispensable à la migration des cellules épidermiques et à la mise en place du régénérat. Chez les Insectes, une controverse existe quant à la formation de cette lame basale qui, selon ASHHURST (1979, 1982, 1985) serait sécrétée par les tissus auxquels elle est associée et, selon d'autres auteurs (WIGGLESWORTH, 1956, 1973 ; BALL et col., 1987 ; KNIBIEHLER et col. 1987) par les hémocytes. CECCHINI et col (1987) ont montré que les hémocytes participent au dépôt de matériel extracellulaire et plus particulièrement du collagène IV qui est le collagène des lames basales. Dans les régénérats en formation, nous avons observé des hémocytes présentant un réticulum endoplasmique

abondant et des vésicules remplies d'un matériel d'aspect fibreux à proximité des membranes plasmiques basales. Entre ces membranes et ces hémocytes, du matériel se condense ; mais notre étude est insuffisante pour affirmer que ces hémocytes sont à l'origine de la lame basale. Il faut également souligner la présence de cellules et de débris cellulaires dans la chambre de régénération. Il s'agit vraisemblablement d'hémocytes puisqu'ils contiennent des granules semblables à ceux des granulocytes. Mais contrairement à BULLIERE (1972) et HOARAU (1973), nous n'avons pas observé le passage d'hémocytes à travers l'épiderme. Il est peu vraisemblable que ces cellules correspondent à des hémocytes emprisonnés au moment de la cicatrisation puisque ces cellules se trouvent également dans la partie proximale de la chambre de régénération et qu'elles sont encore présentes peu de temps avant la mue. Quelle que soit l'origine de ces cellules, il nous semble possible qu'elles participent à l'élaboration du matériel de la chambre de régénération et servent à maintenir la surface externe du régénérat dans un milieu adéquat.

Dans le régénérat en formation, principalement pendant les phases 6 et 7, on observe d'assez nombreuses cellules en dégénérescence. Nous n'avons jamais observé l'extrusion de ces cellules dans la chambre de régénération. La mort cellulaire est un phénomène normal au cours de la morphogenèse, de la croissance et du développement des Métozoaires (BEAULATON et LOCKSHIN, 1982). Il s'agit selon KERR et col. (1972) d'un phénomène complémentaire de la division cellulaire. Aucun hémocyte de type phagocyte n'est visible dans l'épiderme du régénérat. Il semble que les cellules épidermiques phagocytent les cellules voisines en dégénérescence. Ce phénomène a déjà été rapporté pour l'épithélium d'Insectes en métamorphose (ANDRIES, 1977 ; FRISTROM, 1968).

CHAPITRE II

CARACTERISATION DU MATERIEL DE LA CHAMBRE DE REGENERATION ET DES MEMBRANES PLASMIQUES DE L'EPIDERME D'UN REGENERAT

Notre but était de perturber la morphogenèse régénératrice en tentant d'intervenir sur l'information de position des cellules épidermiques. Pour cela, il était indispensable de caractériser le matériel de la chambre de régénération et les membranes plasmiques de l'épiderme du régénérat. Deux études ont été réalisées :

1. une étude cytochimique à l'aide de colorations histochimiques associées ou non à des traitements enzymatiques, de lectines fluorescentes, d'anticorps et de techniques de microscopie électronique.

2. une étude des antigènes de surface de l'épiderme du régénérat. Pour cela, nous avons cherché à fabriquer des anticorps monoclonaux dirigés contre les membranes plasmiques des cellules épidermiques d'articles de pattes voire de faces d'articles. Etant donné la petitesse des articles, il était difficile d'obtenir de grandes quantités de protéines. Aussi, avons-nous éprouvé la technique des anticorps monoclonaux avec des tergites et des sternites plus faciles à préparer. Par ailleurs, nous avons testé sur notre matériel des anticorps monoclonaux dirigés contre les membranes des cellules épidermiques de *Blaberus craniifer* (DE REGGI et col., 1986) et nous rapporterons ici les résultats.

ETUDE CYTOCHIMIQUE

I - MATERIEL ET METHODE

A - Techniques histologiques

1. Colorations histochimiques

a. Préparation des échantillons

Les moignons coxo-trochantériens sont fixés dans des mélanges fixateurs à base d'acide picrique et de formol (Bouin, Duboscq-Brasil, Bouin-Hollande) ou dans du formol 10% contenant 0,5% de chlorure de cétypyridinium (CPC) qui forme des précipités insolubles et stables avec les polysaccharides acides.

Après inclusion dans la paraffine, des coupes de 6 μm sont débitées parallèlement au plan dorso-ventral des moignons. Les coupes sériées d'un même bourgeon sont déposées par groupes de deux coupes successives sur les lames. L'un des groupes sert de témoin et les autres groupes reçoivent un traitement spécifique.

b. Colorations

Les colorations histochimiques utilisées sont celles qui permettent de mettre en évidence : les protéines, les sucres et les glycosaminoglycannes (GAGs).

Pour chaque technique, les colorations caractéristiques d'une réaction positive et les substances ou groupements susceptibles d'être mis en évidence sont récapitulés dans le tableau II.

Afin de ne pas perturber les résultats obtenus, aucune coloration complémentaire n'est réalisée. Pour chaque technique, des réactions de contrôle sont effectuées. La plupart des techniques utilisées ici sont exposées dans les livres de MARTOJA (1967), GABE (1968) et PEARSE (1968).

1. Méthode à la chloramine T-Schiff

Cette méthode de détection des protéines est basée sur une désamination oxydative avec

libération d'aldéhydes révélés par le réactif de Schiff. Les protéines se colorent en rouge violacé. Les coupes témoins sont traitées uniquement par le réactif de Schiff, ce qui permet de repérer les aldéhydes non issus de l'oxydation.

2. Méthode à la fuschine paraldéhyde

Pratiquée sans oxydation préalable, cette méthode colore en violet les groupements électro-négatifs et les fibres élastiques.

3. Méthode à l'acide périodique-Schiff (APS)

L'acide périodique coupe la liaison entre les carbones d'un α -glycol et libère ainsi 2 aldéhydes colorables par le réactif de Schiff. Une coloration rouge Magenta révèle les groupements vic-glycols. Cependant, la réaction est faible avec les GAGs acides, voire nulle avec l'acide hyaluronique et les chondroïtines-sulfates.

Trois lots complémentaires ont été réalisés :

1er lot : le réactif de Schiff a été utilisé seul afin de détecter la présence éventuelle d'aldéhydes ;

2ème lot : une acétylation réversible qui a pour but de bloquer les fonctions 1-2 glycol est pratiquée avant la coloration à l'APS ;

3ème lot : après l'acétylation, une saponification qui doit rétablir les fonctions 1-2 glycol est réalisée avant la coloration à l'APS.

4. Méthode au bleu alcian

Le bleu alcian est un polycation qui se lie aux groupes anioniques des GAGs acides. A pH 2,5, il révèle les GAGs carboxylés et sulfatés ; à pH 0,5, il ne colore que les GAGs sulfatés (LEV et SPICER, 1964). Dans les deux cas, la coloration est bleu turquoise.

Si la coloration au bleu alcian pH 0,5 est suivie d'une coloration au jaune alcian pH 2,5, trois résultats sont possibles :

- une coloration jaune met en évidence les groupements carboxyles,
- une coloration bleue met en évidence les groupements sulfates,
- une coloration verte met en évidence les groupements carboxyles et sulfates.

Si la coloration au bleu alcian pH 2,5 est associée à l'APS :

- une coloration rouge met en évidence les GAGs neutres,
- une coloration turquoise met en évidence les GAGs acides
- une coloration violette met en évidence les GAGs acides et neutres.

5. Réaction métachromatique

Cette réaction n'est pas véritablement une réaction histochimique, mais un indice de l'existence de GAGs acides qui se colorent en rouge pourpre.

La métachromasie ne résiste pas toujours à la déshydratation par l'alcool éthylique aussi les coupes sont-elles observées directement après la coloration ou sont déshydratées par l'alcool butylique.

Des variations de pH permettent de distinguer les radicaux, pour un $\text{pH} \leq 3,4$ les groupements carboxyles ne sont plus colorés.

Deux types de réactions complémentaires sont réalisés :

1. une réaction de méthylation qui bloque les groupements acides et qui n'est réversible que pour les groupements carboxyles ;

2. une réaction de méthylation suivie d'une réaction de saponification qui rétablit la métachromasie des groupements carboxyles.

6. Méthode HID (high iron diamine)

Cette méthode révèle les groupements sulfatés des GAGs par une coloration pourpre noire. Lorsqu'elle est associée au bleu alcian pH 2,5, les groupes sulfatés sont colorés en pourpre noir, les mucosubstances contenant de l'acide uronique et les sialomucines sont colorées en bleu turquoise.

7. Coloration au rouge Sirius

La coloration au micro-Sirius (SWEAT et col., 1964) est spécifique du collagène chez les Vertébrés (JUNQUEIRA et col., 1979). Les coupes sont immergées dans une solution de rouge Sirius à 0,1% dans de l'acide picrique à saturation pendant 15 minutes. Elles sont ensuite lavées dans une solution d'HCl à 0,01 N pendant 15 minutes.

8. Coloration de Van Gieson

Le colorant nucléaire est l'hématoxyline de Groat et le colorant de fond la picrofuschine. Dans ce cas, noyaux et ergastoplasme se colorent en noir, les fibres collagènes et réticulées en rouge.

2. Traitements enzymatiques

Les enzymes utilisées sont la chitinase, les hyaluronidases testiculaire bovine et de *Streptomyces*, la neuraminidase, la collagénase. Parallèlement, des coupes témoins sont traitées uniquement avec les tampons appropriés. Les lames sont placées dans des chambres humides afin d'éviter toute dessiccation et sont colorées simultanément.

a. Chitinase

Chitinase de *Streptomyces griseus* (Sigma C1525), 0,5 et 1 U/ml dans du tampon phosphate 0,1 M pH6, 12 h et 18 h à 25°C. Les coupes sont ensuite colorées à l'APS. La chitinase hydrolyse la chitine en libérant de la Glc Nac.

b. hyaluronidases

. Hyaluronidase testiculaire bovine (Sigma, Type 1-S). 0,1% dans du tampon phosphate 0,1 M pH6 et pH4,4; 6 h à 37°C. Elle hydrolyse l'acide hyaluronique, la chondroïtine, les chondroïtines-sulfates

. Hyaluronidase de *Streptomyces griseus* (Calbiochem, 389561), 50 et 100 Tru/ml dans du tampon acétate de sodium 0,01 M, NaCl 0,14 M (pH5) pendant 12 h et 24 h à 37°C. Elle dégrade uniquement l'acide hyaluronique.

Quelle que soit la hyaluronidase utilisée, les coupes sont colorées au bleu alcian (pH 2,5).

c. Neuraminidase

Neuraminidase de *Clostridium perfringens* (Sigma, type V), 1, 2 et 4 U/ml dans un tampon acétate pH 5, 6 h ou 18 h à 37°C. La neuraminidase détache spécifiquement l'acide neuraminique. Les acides sialiques sont des produits de substitution de l'acide neuraminique et sont les principaux responsables des charges négatives. En parallèle, des coupes subissent une hydrolyse acide à pH 1,4 (H₂SO₄) pendant 2 h à 60°C dont l'effet est identique à celui de la neuraminidase (PEARSE, 1968). Toutes les coupes sont colorées au bleu alcian (pH 2,5) ou au bleu alcian-APS.

d. Collagénase

Collagénase (Whorthington) 0,1 ou 0,5 mg/ml dans du tampon Tris-Hcl 0,5 M ; 0,036 mM CaCl₂ pendant 1, 2 ou 6 heures à 37°C.

3. Lectines fluorescentes

Les lectines, conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) proviennent de chez IBF, excepté la PNA obtenue chez EY. Elles sont toutes utilisées à la concentration de 250 µg/ml dans du tampon phosphate salin (PBS, pH 7,4). Pour la Con A, au PBS sont ajoutés du CaCl₂ (1mM) et du MnCl₂ (1mM).

Les différentes lectines utilisées ainsi que les résidus glucidiques qu'elles reconnaissent sont répertoriés dans le tableau I. Les sucres inhibiteurs, soulignés dans le tableau I, ont été utilisés à la concentration 0,2 M.

Les coupes sont déparaffinées, hydratées et passées dans le PBS. Sur une même lame, trois groupes de coupes sont traités de la façon suivante :

groupe 1 : 50 µl de PBS;

groupe 2 : 50 µl de lectine - FITC;

groupe 3 : 50 µl de lectine - FITC préincubée pendant 1/4 d'heure avec son sucre spécifique.

Après 30 minutes d'incubation, les coupes subissent trois rinçages de 10 minutes chacun, puis sont recouvertes pendant 10 minutes de bleu Evans (1/10000e). Elles sont ensuite montées dans la glycérine (50% dans PBS) et observées en épifluorescence.

Lectines		Spécificité
Dénomination	Abréviation	
Concanavaline A (haricot, <i>Canavalia ensiformis</i>)	Con A	<u>Glucose (α-Glc)</u> <u>Mannose (α-Man)</u>
Lectine de germe de blé (wheat germ agglutinin)	WGA	<u>N-acétyl glucosamine (GlcNac)</u> Acide neuraminique (Neu Ac)
Lectine d' <i>Helix pomatia</i>	HPA	<u>N-acétyl galactosamine (α-GalNac)</u>
Lectine de soja (Soja bean agglutinin)	SBA	<u>α-Gal Nac</u>
Phytohemagglutinine (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	PHA-els	<u>α-Gal Nac</u> Gal-GlcNac-Man
Lectine de l'ajonc (<i>Ulex europaeus</i>)	UEA	<u>Fucose (α-L-Fuc)</u>
Lectine d'arachide (Peanut agglutinin)	PNA	<u>Galactose (Gal)</u> Gal β -1,3 Gal Nac

Tableau I : Lectines utilisées et leurs cibles glucidiques. Les sucres soulignés sont ceux qui ont servi pour vérifier la spécificité des réactions.

4. Anticorps

La technique d'immunofluorescence a été utilisée sur des coupes de moignons coxo-trochantériens en phase 6. Il s'agit de coupes à la cytoparaffine réalisées à partir de tissus fixés au Bouin-Hollande ou de coupes à congélation (les pièces sont débitées à l'aide d'un cryostat Reichert Jung après avoir été incluses dans un milieu d'emballage spécifique à ce type de cryostat).

a. Anticorps utilisés.

Les anticorps fabriqués chez le lapin sont dirigés contre :

- du collagène IV humain (Institut Pasteur de Lyon), dilution au 1/100e.

- du collagène I et III de poulet (Institut Pasteur de Lyon), dilution au 1/20e.
- de la laminine (dilution au 1/50e).
- de la fibronectine humaine (Institut Pasteur de Lille), dilution au 1/50e.

b. Traitement des coupes.

- Lavage des coupes au PBS ;
- incubation avec les immuns-sérums (50 µl) 30 mn à la température de la pièce ;
- rinçage des coupes au PBS (3 fois 10 minutes) ;
- incubation pendant 30 minutes avec du sérum de mouton anti-IgG lapin - FITC (50 µl, dilution 1/50e, Institut Pasteur) ;
- rinçage, bleu Evans et montage à la glycérine.

Toutes les dilutions ont lieu dans du tampon PBS, 0,5% BSA (Sigma).

Les coupes témoins reçoivent du sérum de lapin sain ou du tampon avant d'être incubées avec du sérum de mouton anti-lapin - FITC.

B - Techniques ultrastructurales

1. Technique acide périodique-thiocarbohydrazide-protéinate d'argent

Cette technique dérivée de l'APS permet de détecter les polysaccharides. Les coupes ultrafines réalisées après double fixation et inclusion dans le mélange de SPURR (1969) sont recueillies sur des grilles en or et traitées selon la technique de THIERRY (1967) dérivée de la technique de SELIGMAN et col. (1965). L'oxydation par l'acide périodique libère des aldéhydes sur lesquels se fixent le thiocarbohydrazide. Les produits insolubles obtenus s'opacifient avec le protéinate d'argent.

Les coupes ont été réalisées sur des moignons en phases 5 et 8. L'incubation dans le thiocarbohydrazide est de 24 heures.

2. Colorants cationiques

Ces colorants permettent la détection ultrastructurale des charges négatives des GAGs.

a. le rouge de ruthénium (RR)

Le rouge de ruthénium fut introduit en cytochimie par LUFT (1964, 1971a et b).

Le RR (Merck) est ajouté aux fixateurs (glutaraldéhyde, OsO₄) à une concentration de 0,5%. L'augmentation de contraste qu'il produit serait due soit à l'association RR-OsO₄ (LUFT, 1971 a et b ; BLANQUET, 1976), soit à une liaison RR-groupements carboxyles (YAMADA, 1970). Le traitement a été appliqué à des régénérats en phases 3 et 6.

b. Acide tannique

L'acide tannique introduit comme fixateur en microscopie électronique par FUTAESAKU et col. (1972) agit comme mordant pour l'osmium (SIMIONESCU et SIMIONESCU, 1976 ; SINGLEY et SOLURSH, 1980). Cependant, utilisé avec l'osmium, il met en évidence différents composants extracellulaires comme les fibres élastiques du tissu conjonctif d'Insectes (LOCKE et HUIE, 1975), des composants du "cell coat" (CHEW, 1980), l'acide hyaluronique (SOLURSH et col., 1979 ; SINGLEY et SOLURSH, 1980).

L'acide tannique est ajouté uniquement au glutaraldéhyde. Nous l'avons utilisé à la concentration de 5% dans le tampon cacodylate sur des moignons coxo-trochantériens en phases 3, 5, 6, 7 et 8.

3. Hyaluronidase testiculaire bovine

Les moignons coxo-trochantériens (P5) sont exposés à la hyaluronidase testiculaire (0,1% dans tampon phosphate) pendant 2 heures à 37°C. Ils sont ensuite fixés pour la microscopie électronique en ajoutant du rouge de ruthénium ou de l'acide tannique.

C - Immunostransfert ou Western blot

Du matériel de la chambre de régénération prélevé avec un tube capillaire sur des stades 4 et 5 a été soumis à une séparation sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (gel homogène 10%) dont la technique est décrite dans la deuxième partie de ce chapitre. Les protéines sont transférées, sous l'action d'un champ électrique, des gels sur une feuille de nitrocellulose où elles se fixent (TOWBIN et col, 1979). La feuille de nitrocellulose est incubée avec un anticorps anti-fibronectine bovine et anti-fibronectine humaine (dilution 1/100e) puis lavée (4x10 mn) dans du PBS 0,1% NP 40 (nonidet P40), les complexes Ag-Ac sont révélés par un sérum anti-IgG lapin conjugué à la peroxidase (dilution : 1/1000e). Après lavage dans le PBS, 0,1% NP40 puis dans le PBS seul, le blot est révélé par la diaminobenzidine 0,1% dans du

PBS auquel on ajoute 0,1% H₂O₂ 30%. L'échantillon de référence est de la fibronectine bovine.

II - RESULTATS

Les résultats concernent principalement la phase 5 d'un moignon coxo-trochantérien en cours de régénération.

A - COLORATIONS HISTOCHIMIQUES

Le tableau II récapitule les résultats obtenus. Quelle que soit la coloration utilisée, de grands alvéoles sont visibles dans la chambre de régénération, à proximité du régénérat (Pl. IX, 1). Quel que soit le fixateur utilisé, les affinités tinctoriales sont les mêmes.

Le réactif de Schiff seul ne colore pas la chambre de régénération mais confère à l'épiderme une coloration rouge discrète et homogène.

La méthode à la chloramine T-Schiff colore le contenu de la chambre de régénération qui est rose violacé (Pl. IX, 1) ; on y distingue des fibres disposées parallèlement au grand axe du régénérat et de nombreux petits granules. L'épiderme a une coloration homogène plus intense que celle de la chambre de régénération. Le caillot est également coloré.

La fuschine paraldéhyde sans oxydation préalable colore assez fortement le matériel de la chambre de régénération et un liseré plus coloré borde la surface apicale des cellules épidermiques.

La réaction à l'APS est positive pour le contenu de la chambre de régénération, l'épiderme, l'hémolymphe et les membranes articulaires. La zone interne de la cuticule, en contact avec le matériel de la chambre est colorée ; la surface basale des cellules épidermiques, quant à elle, est colorée de façon discontinue (Pl. IX, 3). L'acétylation fait disparaître la coloration qui est rétablie après saponification. Des groupements vic-glycols sont donc présents.

Techniques de coloration	Éléments décelables	Résultats			
		Chambre de régénération	entier	Epiderme surface	Cuticule face interne
Réactif de Schiff	aldéhydes		+		
Chloramine T- Schiff	protéines	+	++		
Fuschine paraldéhyde sans oxydation	groupes électronégatifs fibres élastiques	++		+	
APS	vic-glycols	+	+		+
APS après acétylation	-				
APS après acétylation + saponification	vic-glycols	+	+		+
Bleu alcian pH2,5 pH0,5	GAGs acides GAGs sulfatés	++ ±	+	+	+
pH 0,5 + jaune alcian pH 2,5	GAGs carboxylés GAGs sulfatés GAGs acides	++ - -			
pH 2,5 + APS	GAGs neutres GAGs acides	- ++			
Bleu de toluidine pH 4,2 pH 1,5 pH 4,2 après méthy- lation	GA Gs acides GAGs sulfatés -	++ -	++		
pH 4,2 après méthy- lation + saponification	GAGs carboxylés	++	++		
HID HID + bleu alcian pH 2,5	GAGs sulfatés GAGs sulfatés et carboxylés		+		
Rouge Sirius	collagène	+			+
Van Gleson	collagène fibres réticulées	+			+

Tableau II. Techniques de colorations utilisées, éléments décelables et résultats obtenus au niveau de la chambre de régénération, de l'épiderme du régénérat et de la face interne de la cuticule d'un moignon coxo-trochantérien en phase 5. (coloration : - absente ; ± très faible ; + moyenne ; ++ forte).

Le bleu alcian à pH 2,5 colore assez intensément le contenu de la chambre, l'épiderme et plus particulièrement les noyaux. Un liseré bleu turquoise est visible à la face apicale des cellules épidermiques et à la face interne de la cuticule (Pl. IX, 4). L'hémolymphe est légèrement teintée. Si la méthylation, qui fait disparaître la coloration, est suivie d'une saponification, la coloration est rétablie avec une intensité moindre. Le bleu alcian à pH 0,5 donne une très faible coloration bleue ; associée au jaune alcian à pH 2,5, la coloration jaune prédomine. Une coloration au bleu alcian à pH 2,5 suivie d'un APS donne une coloration bleue dans la chambre. Ces résultats révèlent la présence de groupements carboxyles, celle de groupements sulfates est par contre incertaine.

Avec le bleu de toluidine à pH 4,2, le contenu de la chambre et l'épiderme présentent une forte métachromasie qui demeure après méthylation et saponification. A pH 1,5, la réaction est négative. Ceci tend à montrer que seuls des groupements carboxyles sont contenus dans la chambre de régénération.

Avec le HID, le contenu de la chambre de régénération reste incolore, en revanche, l'épiderme, et plus particulièrement le cytoplasme, est coloré (Pl. IX, 2). Si on l'associe au bleu alcian à pH 2,5, la chambre se colore en bleu, ce qui tend à confirmer uniquement la présence de GAGs non sulfatés.

Avec le rouge Sirius, une coloration de fond est présente, sur des bourgeons en phase 7 et 8, dans la chambre de régénération, à la surface apicale des cellules épidermiques et la membrane basale est très nette. Sur des régénérats plus jeunes (phase 4 et 5), la surface apicale et la membrane basale sont moins nettes. Dans tous les cas, l'endocuticule est colorée ainsi que les membranes articulaires qui, elles, sont très intensément marquées.

Avec la coloration de Van Gieson, le résultat est semblable à celui obtenu pour le rouge Sirius.

B - TRAITEMENTS ENZYMATIQUES

Les traitements enzymatiques ont été réalisés sur des moignons coxo-trochantériens en phase 5 et agissent à différents niveaux (Tableau III).

1. Chitinase

Après action de la chitinase, la coloration à l'APS du matériel de la chambre est moins intense que pour les coupes témoins. Les membranes articulaires perdent de leur colorabilité et la face interne de la cuticule n'est plus colorée (Pl. IX, 5).

2. Hyaluronidases

Les hyaluronidases testiculaire bovine et de *Streptomyces* atténuent fortement et apparemment avec la même efficacité la coloration de la chambre de régénération par le bleu alcian pH 2,5 ainsi que les lignes colorées en bordure de la cuticule et de l'épiderme (Pl. IX, 6).

3. Neuraminidase

La neuraminidase est sans effet au niveau de la chambre de régénération. En revanche, la colorabilité de l'épiderme au bleu alcian est fortement atténuée.

L'hydrolyse acide atténue la coloration de la chambre par le bleu alcian. Toutefois, un traitement témoin par l'eau distillée ou le PBS, dans les mêmes conditions, donne le même résultat.

4. Collagénase

Les doses de 0,1 ou 0,5 mg/ml ne modifient pas la coloration obtenue avec le rouge Sirius et des doses plus fortes décollent les coupes. Par ailleurs, l'observation en microscopie électronique de la membrane basale de sternite fixé au PAF et ayant subi un traitement à la collagénase (2 h à 37°C) nous a donné les résultats suivants : les fibres sont encore très nettes avec la dose de 0,5 mg/ml et toutes ne disparaissent pas avec la dose de 1 mg/ml.

Enzymes	Matériel de la chambre	Epiderme	Face interne de la cuticule
Chitinase	+	-	+
Hyaluronidase testiculaire ou de <i>Streptomyces</i>	++	++ (face apicale)	++
Neuraminidase	-	++	-
Collagénase	-	-	-

Tableau III - Résultats des traitements enzymatiques sur les colorations histochimiques des moignons coxo-trochantériens en phase 5 (- pas d'action ; + action moyenne ; ++ action forte)

C . LECTINES FLUORESCENTES

Préalablement à l'utilisation de lectines fluorescentes, nous avons recherché l'existence d'une autofluorescence naturelle, signalée dans la cuticule des Arthropodes et liée à la présence de composés aromatiques (NEVILLE, 1967 ; WEISS-FOGH, 1970). Chez *Carausius*, elle est observable et ne sera pas prise en considération pour la description de nos résultats.

Les coupes de moignons coxo-trochantériens en phase 5 traitées avec les lectines PNA-FITC, PHA-els-FITC et UEA-FITC ne présentent aucune fluorescence. Les résultats obtenus avec les autres lectines sont récapitulés dans le tableau IV.

Les quatre lectines : ConA-FITC, WGA-FITC, SBA-FITC et HPA-FITC, testées sur des moignons coxo-trochantériens en phase 3, 5, 6 et 7, donnent une fluorescence à la face apicale des cellules épidermiques du régénérat, au niveau du contenu de la chambre de régénération, autour des cellules présentes dans cette chambre ainsi qu'à la face interne de la cuticule. L'intensité de cette fluorescence est faible pour la SBA-FITC, assez intense pour la ConA-FITC et la WGA-FITC, très forte pour la HPA-FITC (Pl. X, 2, 3, 4). Le contour des

cellules épidermiques et des hémocytes, l'hémolymphe fluorescent également avec la ConA-FITC, ainsi que le contenu de certaines cellules de l'épiderme du régénérat avec la HPA-FITC.

Nous n'avons pas observé de régionalisation du marquage, ni de différences en fonction du développement du régénérat (Pl. XI, 1 et 2).

Lectines	Sucres reconnus	Epiderme		Chambre de régénération		cuticule face interne	hémolymphe et hémocytes
		cellules épidermiques	face apicale	matériel	cellules		
ConA	Man Glc	++ (contour)	+++	+++	++	+	+
WGA	Glc Nac Ac Neu	-	+++	+++	++	+	-
SBA	Gal Nac	-	+	+	+	+	-
HPA	Gal Nac	certaines	++++	++++	+++	+	-

Tableau IV : Répartition et intensité de la fluorescence due à la fixation de lectines fluorescentes.
Fluorescence : - absente ; +, faible ; ++ moyenne ; +++ forte ; ++++ très forte.

D - ANTICORPS

De tous les anticorps dirigés contre les constituants matriciels de vertébrés et testés sur des moignons coxo-trochantériens en phase 6, seul l'anti-collagène IV et l'anti-fibronectine plasmatique humaine donne une réaction positive (Tableau V, Pl. X, 5 et 6). Avec l'anti-collagène IV, les faces apicale et basale de l'épiderme, le matériel de la chambre de régénération et la face interne de la cuticule sont révélés. Avec l'anti-fibronectine plasmatique

humaine, la réaction moins forte se situe plus particulièrement à la face apicale de l'épiderme et au niveau de la chambre de régénération.

Anticorps	Epiderme		Chambre de régénération		
	face apicale	face basale	matériel	cellules	face interne de la cuticule
Anti-collagène I	-	-	-	-	-
Anti-collagène III	-	-	-	-	-
Anti-collagène IV	++	+	+++	++	++
Anti-laminine	-	-	-	-	-
Anti-fibronectine plasmatisque humaine	+	±	+	+	-

Tableau V : Résultats de la fixation de différents anticorps sur des moignons coxo-trochantériens en phase 6. (Pas de fixation (-) ; fixation : très faible (±), faible (+), moyenne (++), forte (+++)

E - RESULTATS ULTRASTRUCTURAUX

1. Technique de THIERRY

Cette technique contraste légèrement le matériel de la chambre de régénération et révèle la présence de polysaccharides, ce qui est en accord avec la réaction obtenue par l'APS.

2. Rouge de ruthénium

Ce colorant cationique renforce l'aspect fibrillaire du matériel de la chambre de régénération. Sur des bourgeons en phase 3, certaines zones apicales sont considérablement renforcées (Pl. XII,6). Sur des bourgeons en phase 6, les membranes plasmiques latérales sont intensément

soulignées (Pl. XII, 10). Notons que pour les sternites, le rouge de ruthénium se dépose au niveau de la lame basale qui est très épaisse (250 nm) et entre les membranes plasmiques basales et latérales et ce uniquement dans la partie inférieure (Pl. XII, 1 et 2).

Notre travail expérimental nous a conduit à injecter du rouge de ruthénium directement dans la chambre de régénération. 0,2 µg de ruthénium ont été injectés dans la chambre de régénération de moignons coxo-trochantériens en début de phase 4. Lorsque la fixation a lieu juste après l'injection, le matériel de la chambre apparaît très nettement par rapport aux témoins (Pl. XII, 4). Il est constitué d'un réseau fibrillaire de taille très variable, les plus grosses fibres peuvent atteindre 50 nm (Pl. XII, 5).

3. Acide tannique (Pl. XIII)

C'est sur des régénérats en phase 5 que nous avons observé le plus de zones denses par rapport aux témoins (Pl. XIII, 1). Il s'agit :

- des membranes plasmiques des hémocytes non nécrosés du caillot,
- des membranes plasmiques et des espaces intercellulaires, mais ce de façon discontinue (Pl. XIII, 4),
- de l'hémolymphe qui se trouve contre la membrane plasmique basale des cellules épidermiques,
- du matériel de la chambre de régénération constitué de fibres de diamètre très variable (3 à 50 nm) (Pl. XIII, 3).

Le matériel de la chambre, sous le caillot, semble constitué de deux couches d'épaisseur et d'aspect différents (Pl. XIII, 1). Les fibres de la couche proche de l'épiderme sont plus fines. Les deux couches sont traversées par de grosses fibres dont le diamètre est difficilement appréciable car de forme très variable. Par ailleurs, on peut également observer des zones plus ou moins denses aux électrons bien que le matériel ait sensiblement le même aspect (Pl. XIII, 2). Ces zones semblent correspondre aux espaces observés en microscopie photonique, espaces délimités par un réseau fibreux à proximité de la surface apicale du régénérat.

4. Action de la hyaluronidase testiculaire bovine

Si avec le rouge de ruthénium, nous n'observons pas de différence au niveau de la chambre de régénération, le rouge de ruthénium étant simplement ajouté aux fixateurs, en revanche, avec l'acide tannique, nous observons une disparition importante du matériel fibrillaire (Fig. 5).

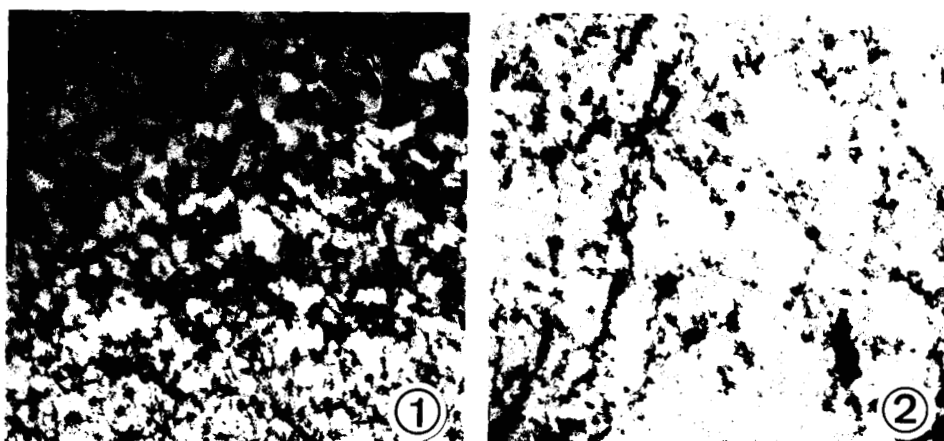


Fig. 5 : Aspects ultrastructuraux du matériel de la chambre de régénération avant (1) et après traitement (2) à la hyaluronidase testiculaire bovine qui fait disparaître une partie du matériel. x10440.

F - CARACTERISATION D'UNE SUBSTANCE APPARENTEE A LA FIBRONECTINE

En Western blot, nous n'avons pas retrouvé dans le matériel de la chambre de régénération de bandes correspondant à la fibronectine. Ce résultat négatif peut être lié à un mauvais prélèvement du matériel. Par ailleurs, la fibronectine est très sensible aux dégradations protéolytiques et donc fortement instable (GRATECOS et col., 1988). En utilisant des anti-protéases et non plus de la peroxydase mais un anticorps marqué à l'iode 125, nous avons un faible résultat. Pour plus de certitude, nous avons cherché un témoin "fibronectine *Carausius*" dans l'hémolymphe. La technique de "dot" révèle la présence d'une substance apparentée à la fibronectine dans l'hémolymphe de *Carausius* substance qui se lie à des anticorps anti-fibronectine murin. Il nous faudra reprendre ce problème en se référant à la substance trouvée dans l'hémolymphe.

ANTIGENES DE SURFACE

I . OBTENTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

A - Technique

1. Antigène

La technique de préparation de l'antigène est la même quel que soit le tissu prélevé.

L'immunisation de souris nécessite une quantité assez importante de protéines, aussi avons-nous choisi d'effectuer nos prélèvements sur des animaux en début de stade V. A ce stade, l'animal est encore capable de régénération et la grande taille des animaux permet de diminuer le nombre des prélèvements.

Toutes les opérations sont effectuées à 4°C. Des morceaux de tergites ou de sternites méso et métathoraciques, dépourvus de muscles, sont prélevés et débarassés du corps gras et des trachées. Au moment du prélèvement, la cuticule sécrétée par les cellules épidermiques, est attenante à la face apicale de ces cellules. Différents procédés ont été essayés pour récupérer essentiellement les membranes plasmiques des cellules épidermiques.

La teneur en protéines des échantillons est dosée par le réactif Bio-Rad (Protein Assay) (BRADFORD,1976) ; Bio Rad laboratories (1979).

a. Recherche d'une technique d'isolement des membranes plasmiques

1. Choc osmotique

Les fragments tissulaires sont immergés pendant 5 minutes dans l'eau distillée de façon à provoquer un choc osmotique. Contrairement à ce qui a été décrit chez la blatte (BULLIERE et col., 1982), chez le phasme, les cellules ne se vident pas de leur contenu. Dans l'eau distillée, la concentration protéique est faible : 5 µg, pour un tergite dont la concentration protéique est de 60 µg et l'examen des fragments après fixation et coloration à l'hématoxyline de Groat montre que les noyaux demeurent en place. Une immersion plus longue, accompagnée d'une agitation, ne modifie pas les résultats.

2. Sonication

Les fragments tissulaires sont traités par les ultrasons sur un générateur MSE 150 watts ultrasonic désintégrator.

3. Homogénéisation

Les fragments tissulaires sont broyés avec un homogénéiseur de Potter.

L'ultrasonication et l'homogénéisation permettent de séparer la cuticule de l'épiderme. Des contrôles en microscopie électronique nous ont permis de voir qu'avec la sonication, toutes les structures sont éclatées alors qu'avec l'homogénéiseur de Potter, bien que les cellules soient éclatées, les noyaux restent intacts. Nous avons donc retenu la technique de l'homogénéisation.

b. Isolement des membranes plasmiques

Les fragments tissulaires, placés dans du tampon Tris-Hcl 50 mM pH 7,6 ; Kcl 25 mM; sucrose 0,25 M, PMSF 0,4 mM (phényl méthyl sulfoxy fluoride) sont broyés avec un homogénéiseur de Potter. Des centrifugations successives dans le même tampon permettent de séparer les constituants (ultracentrifugeuse BECKMAN, rotor SW 40). L'observation des culots de centrifugation en microscopie électronique nous ont permis de vérifier leur contenu. Dans un premier temps, nous avons réalisé trois centrifugations successives (Fig. 6).

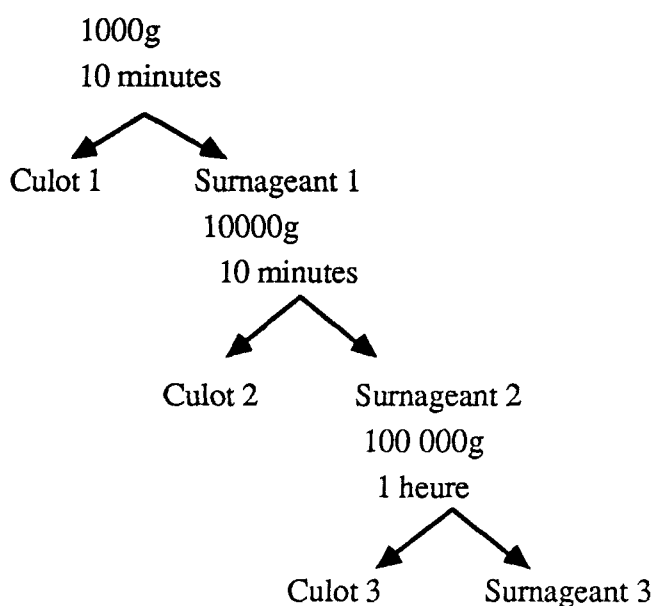


Fig. 6. Représentation schématisée des centrifugations réalisées pour l'isolement de membranes plasmiques de cellules épidermiques.

Le culot 1 contient essentiellement des noyaux et des grains de pigments. Dans le culot 2, de grands morceaux de membranes plasmiques, facilement repérables, en particulier grâce aux jonctions intercellulaires septées, sont présents (Pl. XIV, 1). Dans le culot 3, on récupère essentiellement des vésicules dont la taille varie entre 0,1 et 0,6 μm . L'aspect de ces vésicules diffère, il s'agit : soit de vésicules à membrane mince, peu contrastée, portant le plus souvent des grains, vésicules qui évoquent le complexe membranaire interne et qui sont les plus nombreuses ; soit des vésicules à membrane plus épaisse, contrastée et qui rappelle la membrane plasmique (Pl. XIV, 2). Nous avons donc limité notre manipulation à deux centrifugations. La technique d'isolement utilisée est récapitulée dans la figure 7.

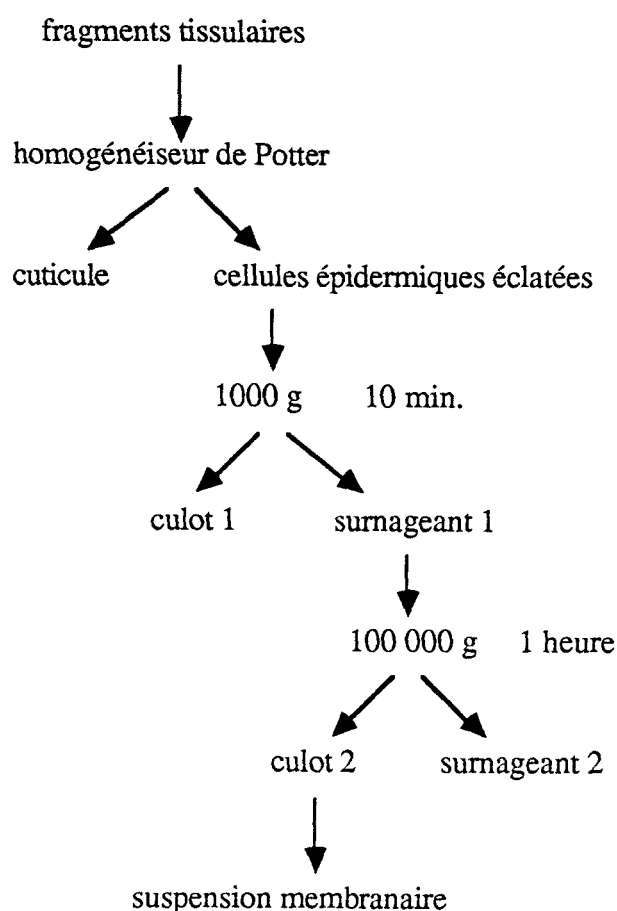


Figure 7. Diagramme qui récapitule la méthode utilisée pour l'obtention de suspensions membranaires d'épiderme.

c. Electrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS

1. Electrophorèse

La composition en protéines est analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dissociant selon LAEMMLI (1970).

La teneur en protéines de chaque échantillon est dosée par le réactif Bio-Rad.

Le gel de séparation est un gradient continu 10 - 18% de polyacrylamide contenant 0,1% de dodécyl sulfate de sodium (SDS) dans du tampon Tris-HCl 375 mM à pH 8,8.

Le gel de concentration est à 5% d'acrylamide dans du Tris-HCl 125 mM à pH 6,8 contenant 0,1% de SDS.

Les échantillons sont repris dans le tampon d'électrophorèse : tampon Tris - HCl 62,5 mM, pH 6,8 ; SDS 1% ; mercapto-éthanol 5% ; bleu de bromophénol 0,2%.

Les échantillons et les marqueurs de poids moléculaires (Pharmacia) subissent simultanément un traitement par la chaleur de 3 minutes à 100°C avant leur dépôt.

La migration dure 16 heures à 4mA dans le tampon Tris 25mM, glycine 192 mM, pH 8,3 contenant du SDS à 0,1%.

2. Coloration des gels

- Coloration au bleu de Coomassie.

Le gel est coloré pendant 2 heures sous agitation dans une solution de bleu de Coomassie R à 0,02% dans l'isopropanol 25%, acide acétique 10% puis séché par évaporation sous vide dans un sécheur de gel (Pharmacia) (WEBER et OSBORN, 1969).

- Coloration à l'argent.

La technique de coloration à l'argent est 50 à 100 fois plus sensible que celle au bleu de Coomassie. Nous avons utilisé la méthode de MERRIL et col., (1981).

Le gel est préfixé dans du méthanol 50% - acide acétique 12% pendant 20 minutes. L'excès de SDS est enlevé du gel par 3 lavages, de 10 minutes chacun, dans l'éthanol 20% - acide acétique 5%. Après incubation dans le bichromate de potassium 0,0034 M en milieu acide (acide nitrique 0,032 M) pendant 5 minutes sous agitation, le gel est lavé 4 fois à l'eau distillée puis incubé dans une solution de nitrate d'argent 0,012 M pendant 30 minutes sous lumière fluorescente. Deux rinçages rapides dans une solution de carbonate de sodium 0,28 M, formaldéhyde commercial 0,5 ml/l précèdent une troisième incubation dans cette solution, sous éclairage, jusqu'à obtention de la teinte désirée. La coloration est arrêtée en remplaçant le

bain précédant par l'acide acétique à 1%, ce dernier est éliminé par deux bains d'eau distillée avant le stockage des gels. Pour la différenciation, le gel est incubé dans une solution ammoniacale contenant : 0,37% de chlorure de sodium, 0,037% de sulfate de cuivre et 4,37% de thiosulfate de sodium.

2. Anticorps

Nous avons cherché à fabriquer des anticorps monoclonaux selon la méthode suivante :

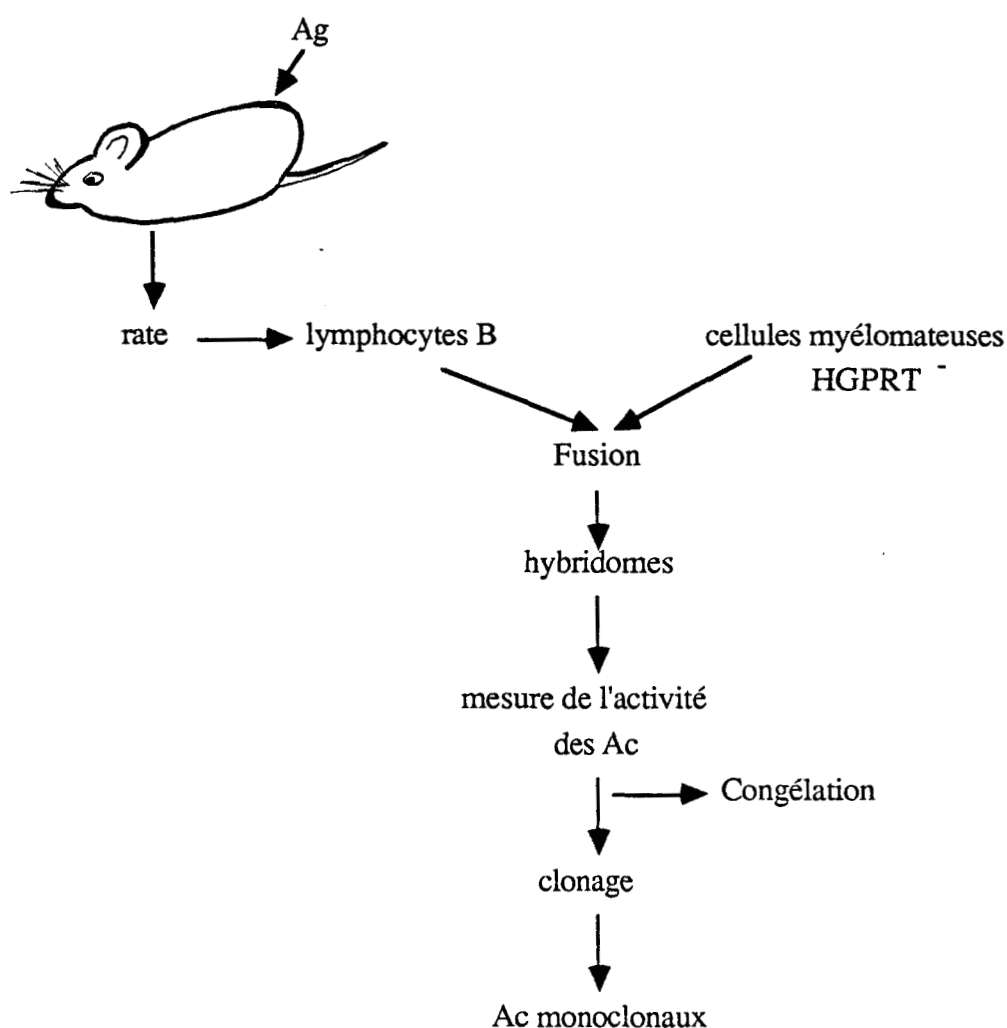


Fig. 8.Représentation schématique du procédé d'obtention d'anticorps monoclonaux.

a. Immunisation

Le dernier culot de centrifugation qui contient les membranes plasmiques des cellules épidermiques est repris dans du tampon PBS (pH 7,2) et sert à l'immunisation de souris Balb /C ♀. 7 souris ont reçu des membranes plasmiques de cellules épidermiques de tergites (3) ou de sternites (4).

Chaque souris reçoit, à 15 jours d'intervalle, 3 injections d'une solution de suspension membranaire et d'adjuvant complet de Freund :

1ère : injection sous-cutanée de 50 µg de protéines .

2ème : injection intrapéritonéale de 100 µg de protéines .

3ème : injection intrapéritonéale de 75 µg de protéines.

Une injection de rappel (100 µg de protéines) sans adjuvant de Freund est pratiquée dans la veine caudale 3 jours avant le prélèvement de la rate.

b. Production d'hybridomes

Lorsque le taux d'anticorps circulants dans le sérum des souris immunisées est jugé suffisant, les rates sont prélevées et les lymphocytes B qu'elles contiennent sont fusionnés avec des cellules de myélome Sp 2/0.

1. Isolement des lymphocytes B

La technique est récapitulée dans la figure 9

2. Cellules myélomateuses

Les cellules de la lignée Sp 2/0 sont faciles à cultiver, ne sécrètent pas d'immunoglobulines, sont sensibles à l'aminoptérine et sont dépourvues d'hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT⁻)

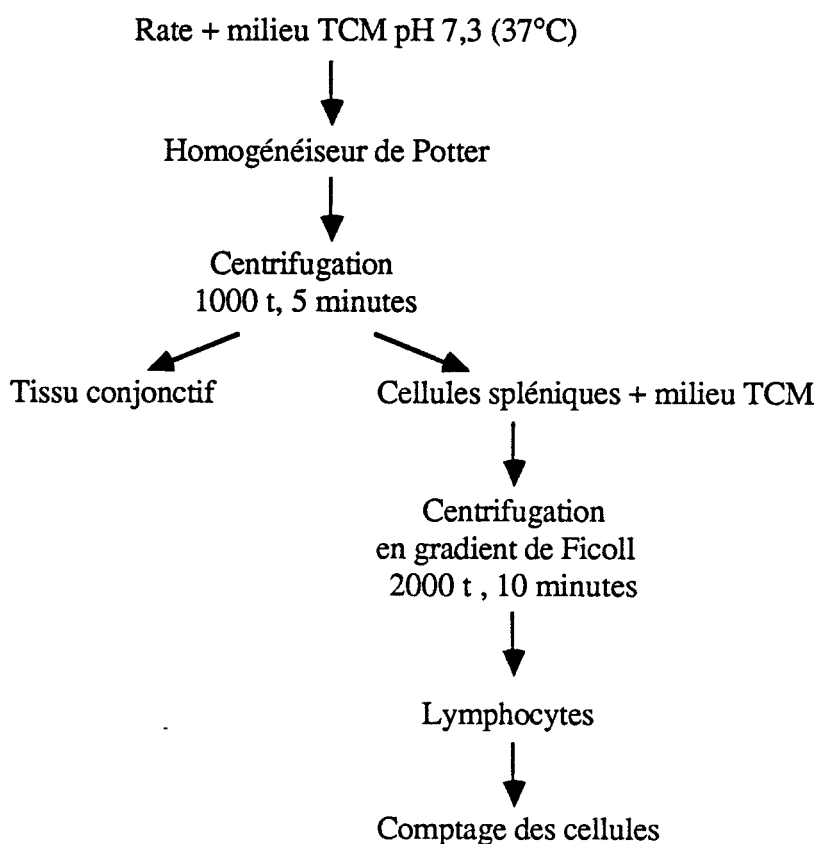


Fig. 9. Représentation schématique de l'isolement des lymphocytes B.

3. Fusion et clonage

La méthode de fusion utilisée est celle décrite par KÖHLER et MILSTEIN (1975). Pour faciliter la culture des cellules, les plaques de culture sont préparées de la façon suivante : le milieu A injecté dans la cavité péritonéale d'une souris est immédiatement repris et réparti dans les puits de la plaque. Le liquide recueilli contient des macrophages, des fibroblastes et des hématies. Les hématies n'adhèrent pas au fond du puits et sont éliminées par pompage. Les macrophages phagocytent les déchets et les fibroblastes rejettent dans le milieu des substances qui facilitent le démarrage de la culture.

La fusion des lymphocytes et des cellules de myélome est réalisée dans du polyéthylène glycol

(PEG). Nous avons choisi un rapport de 5 lymphocytes pour 1 cellule de myélome. Après centrifugation, les cellules sont cultivées sur le milieu A et les lymphocytes, qui sont incapables de se multiplier en culture, meurent.

La sélection des hybridomes se fait en milieu HAT. Dans ce milieu, seules les cellules hybrides sont capables de se multiplier, les cellules de myélomes meurent. Les hybridomes sont ensuite cultivés en milieu HT avant de repasser dans le milieu A qui sera le milieu de culture définitif. Après analyse des surnageants de cultures, les cellules qui produisent des anticorps intéressants sont clonées à raison d'une cellule par puits. Les cultures cellulaires sont laissées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂.

Les opérations d'obtention des hybridomes sont récapitulées dans la figure 10.

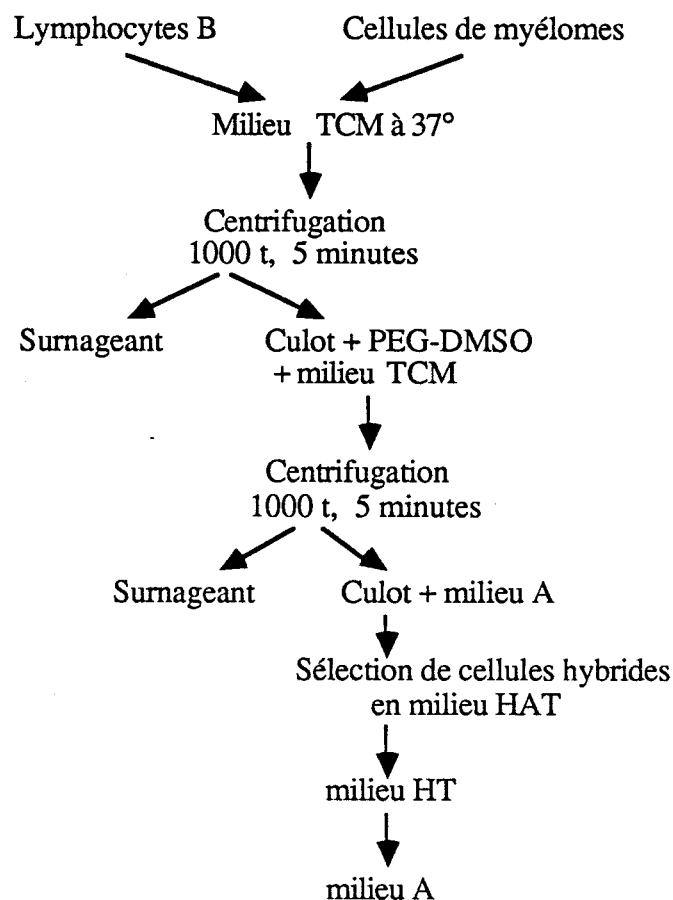


Fig 10 : Récapitulation des opérations d'obtention des hybridomes.

c. Contrôle de l'activité des anticorps

Les sérums de souris (le sang étant recueilli dans le sinus orbitaire), les surnageants de culture sont dosés en anticorps et utilisés pour des tests d'immunofluorescence indirecte. Les anticorps ont été caractérisés.

Des sérums de souris témoins et le surnageant des cultures de cellules de myélomes servent de témoins.

1. Dosage radio-immunologique (RIA)

Ces tests réalisés en phase solide permettent d'apprécier l'apparition et la quantité d'anticorps produits. La méthode est la suivante :

1. 100 μ l d'Ag en solution dans du PBS (5 μ g/ml) sont déposés dans chaque puits d'une plaque de microtitration en vinyl flexible. Les Ag s'adsorbent à la surface des puits (2h, 20°C).

2. la solution antigénique est éliminée par aspiration.

3. 200 μ l de PBS - BSA 2% sont déposés dans chaque puits de façon à prévenir la fixation ultérieure de protéines non spécifiques (30 mn, 20°C).

4. les puits sont lavés avec du PBS.

5. 100 μ l de solution contenant les Ac sont déposés dans chaque puits (2 h, 37°C). Il y a formation d'immuns-complexes.

6. les puits sont lavés avec du PBS-BSA 0,1%.

7. des anticorps anti-souris marqués à l'iode 125 sont déposés dans chaque puits et se fixent sur les immuns-complexes préalablement formés (1 h, 20°C).

8. les puits sont lavés (PBS-BSA 0,1%) et séchés.

9. chaque puits est découpé et déposé dans un tube. Les tubes sont ensuite passés dans un compteur qui nous donne le taux de radioactivité et par là même détecte les Ac qui étaient présents dans les milieux testés.

2. Immunofluorescence indirecte

Les Ac présents dans les milieux sont révélés par la technique classique d'immunofluorescence indirecte sur coupes histologiques décrite précédemment. Il s'agit de coupes transversales de segments méso et métathoraciques de stade V en début d'intermue.

3. Caractérisation des anticorps

La méthode d'Ouchterlony en gel d'agarose a été utilisée pour étudier la spécificité des Ac produits par les hybridomes

B - Résultats

1. Analyse électrophorétique

Les différences observées entre des sternites ou des tergites (Pl. XIV, 4, B et C) entiers portent essentiellement sur les bandes 43 Kd, 94 Kd et plus, qui correspondent aux bandes majeures des muscles (Pl. XIV, 4, G) et qui ne se retrouvent qu'au niveau des tergites, c'est pourquoi nous avons prélevé pour nos immunisations uniquement des zones de tergites dépourvues de muscles. La bande majeure de l'hémolymphe, 25 Kd, (Pl. XIV, 4, F) se retrouve aussi bien dans les tergites que les sternites. Lorsqu'on sépare l'épiderme d'un tergite de sa cuticule, la bande majeure de l'hémolymphe se retrouve au niveau de la cuticule (Pl. XIV, 4, E) alors que les bandes majeures des muscles se retrouvent dans l'épiderme (Pl. XIV, 4, D).

L'analyse électrophorétique des suspensions membranaires d'épiderme montrent des différences quantitatives, en particulier, pour la bande 19 Kd plus importante dans le tergite et la bande 83 Kd plus importante dans le sternite (Pl. XIV, 3).

2. Hybridomes

a. Résultats des RIA et de l'immunofluorescence indirecte

Des RIA ont été effectués après chacune des trois injections afin d'évaluer le taux d'anticorps circulants et pour chaque surnageant de cultures lors de la sélection d'hybridomes. Quelques uns des résultats sont exposés dans le tableau VI.

La quantité d'Ac circulants augmente après chaque injection et est plus importante encore après la fusion cellulaire (Tableau VI). Cependant, le taux de radioactivité est sensiblement le même lorsque les Ac "anti-tergites" sont testés avec des Ag "tergites" ou "sternites". Les résultats sont semblables lorsque des Ac "anti-sternites" sont testés avec des Ag "tergites" ou "sternites" (Tableau VI).

Ac \ Ag		I		II	
		T	S	T	S
"Anti-T"	Souris n° 1	3744	4292	5898	5188
	Souris n° 2	3010	3586		
	Souris n° 3	4001	4294		
"Anti-S"	Souris n° 4	3841	3976	6186	5821
	Souris n° 5	3026	3457		
	Souris n° 6	3735	3803		
	Souris n° 7	2408	2544		
Témoins					
Sp 2/0		307	377		
SST		1023	1241		

Tableau VI : Comparaison des taux d'anticorps (dosage RIA exprimé en cpm) circulants chez les souris immunisées (I) et dans les surnageants de cultures d'hybridomes (II). Les anticorps "anti T" et "anti-S" ont été obtenus par injection de suspensions membranaires respectivement de tergites (T) ou de sternites (S). Les séries témoins ont été faites avec du surnageant de cellules de myélome (Sp 2/0) et du sérum de souris témoin (SST).

Les tests d'immunofluorescence indirecte confirment dans l'ensemble les résultats obtenus en RIA. Toute la coupe histologique est fluorescente, l'épiderme comme les structures internes : intestin, muscles, corps gras, bien qu'elles n'aient pas servi pour l'immunisation.

Deux souris ont été sélectionnées pour la fabrication des hybridomes, l'une immunisée contre une préparation antigénique de tergites (souris n°1) et l'autre immunisée contre une préparation antigénique de sternites (souris n°5). Ces souris ont été sélectionnées après la 3ème injection car c'est avec le sérum de ces souris que nous avons observé le moins de réactions croisées ("anti-tergite"/sternite et "anti-sternite"/tergite) en immunofluorescence indirecte.

b. Analyse des surnageants d'hybridomes "anti-sternites"

144 puits ont été testés. En immunofluorescence indirecte, 22 donnent une fluorescence qui n'est pas toujours spécifique. En RIA, seulement 5 de ces 22 surnageants présentent un taux de radioactivité supérieur aux témoins.

c. Analyse des surnageants d'hybridomes "anti-tergites"

Sur 149 puits testés, seuls 3 se révèlent positifs en RIA. Deux de ces hybridomes ont été clonés. Pour l'un, sur 46 puits examinés en immunofluorescence indirecte, 2 se sont révélés positifs ; pour l'autre, 12 des 48 testés étaient positifs. Pratiquement, dans tous les cas, le tergite et le sternite réagissent avec les surnageants de culture. Aussi, étant donné le peu de spécificité de nos résultats, nous n'avons pas continué la recherche d'anticorps monoclonaux.

d. Classe des immunoglobulines des hybridomes

Les surnageants de 11 clones testés en immunodiffusion montrent que les Ac obtenus sont en général de type IgG (10) : IgG1 (9), IgG3 (1). Dans un cas, il s'agit d'une IgM.

II - ANTICORPS MONOCLONAUX TOPOSPECIFIQUES DIRIGES CONTRE LES MEMBRANES DES CELLULES DE LA BLATTE : *Blaberus craniifer*

Ces anticorps ont été testés par DE REGGI sur des préparations membranaires de cellules épidermiques ou des coupes histologiques de Phasmes.

A - Suspensions membranaires de cellules épidermiques

1. Technique

Des membranes de cellules épidermiques d'origine régionale différente ont été préparées selon la technique précédemment décrite (Fig.7). Il s'agit de :

- tergites thoraciques
- sternites thoraciques
- faces ventrales de fémurs
- fémurs dont la face ventrale a été enlevée (il reste donc les faces dorsale, antérieure et postérieure).

Tergites, sternites, fémurs ventraux sont totalement dépourvus de muscles. En revanche, pour les fémurs sans faces ventrales, il est impossible d'enlever tous les muscles.

Les derniers culots de centrifugation sont repris dans de l'eau pure, soniqués et les protéines sont dosées. Les quatre suspensions membranaires sont amenées à la concentration de 1 mg/ml. Quatre gouttes de 0,2 µl chacune sont déposées côte à côte dans des cercles de 8 mm sur des lames de 10 cercles (Bio Mérieux). Les dépôts sont rapidement séchés à l'air chaud. Après incubation avec les Ac monoclonaux, les complexes immuns sont révélés par un deuxième anticorps (anti-souris) conjugué à la fluorescéine. Les lames sont ensuite observées au microscope à fluorescence.

2 . Résultats

Les résultats sont récapitulés dans le tableau VII.

Les anticorps de référence, 3. 4. C2, non spécifique donnent une fluorescence faible avec tous les extraits.

Désignation de l'Ac	3. 4. C2	3.6.B1	F 9. 2. C5
Spécificité de l'Ac	non spécifique	Tibia	Fémur
Dépôts Ag			

Tableau VII : Résultats du marquage des suspensions membranaires d'épiderme de phasmes par des Ac monoclonaux dirigés contre des membranes des cellules épidermiques de blatte.

F : Fémurs dépourvus de faces ventrales ; FV: Faces ventrales de fémurs ; S : Sternites ; T : Tergites

(intensité de la fluorescence : -, pas de fluorescence ; ±, faible ; +, moyenne ; ++, forte)

Les anticorps, 3. 6. B1, spécifiques du tibia ne montrent pas de spécificité avec notre matériel. Les anticorps, F9. 2. C5, spécifiques du fémur semblent plus spécifiques bien qu'ils ne réagissent qu'avec les suspensions de fémurs ventraux.

B - Coupes histologiques

Deux types d'anticorps monoclonaux ont été testés en immunofluorescence indirecte sur des coupes transversales de fémur et de mésothorax. Le tableau VIII récapitule les résultats. Avec du sérum de souris saine, aucune fluorescence n'est observée.

Solutions testées	Coupes histologiques	Epiderme	Muscles	Corps gras Trachées
sérum de souris témoin	M, F	-	-	-
Ac. anti-Tibia 3. 6. B1	M	+++ (faces basales) ± (faces apicales latérales)	++ (contour)	++ (contour)
	F	++ (contour cellules)	++ (contours striés)	++
Ac anti-Fémur F. 9. 2. C5	M	± (faces basales)	-	-
	F	±	+ Contour (intérieur : diffus)	-

Tableau VIII : Résultats de l'incubation de coupes histologiques de fémur (F) ou de mésothorax (M) avec des anticorps dirigés contre des suspensions membranaires d'épiderme de blatte et révélés par un deuxième anticorps conjugué à la fluorescéine.
Intensité de la fluorescence : - pas de fluorescence ; ± faible ; + moyenne ; ++ forte ; +++ très forte.

Les anticorps, 3. 6. B1, dirigés contre des suspensions membranaires de tibias réagissent fortement avec les deux types de coupes. Toutefois, l'intensité des marquages diffère. Le contour des cellules épidermiques de fémur fluoresce alors qu'au niveau de l'épiderme du mésothorax, seules les faces basales présentent une forte fluorescence. Ces anticorps se fixent également au niveau des muscles et du corps gras, principalement à leur périphérie.

Avec les anticorps, F. 9. 2. C5, dirigés contre des suspensions membranaires de fémurs, l'épiderme fémoral fluoresce, au niveau du mésothorax seules les faces basales de l'épiderme montrent une fluorescence. Les muscles mésothoraciques ne fluorescent pas.

C - Conclusion

Les résultats obtenus avec les préparations membranaires et les coupes histologiques sont dans l'ensemble cohérents. Cependant, les anticorps "anti-fémur" qui réagissent faiblement avec l'épiderme du mésothorax ne donnent pas de réactions avec les suspensions membranaires de tergites ou de sternites. Avec les anticorps "anti-tibia", la réaction est plus forte avec le fémur sur les coupes histologiques que sur les suspensions membranaires de fémur. Alors que chez *Blaberus*, il y a un marquage de l'intérieur même des fibres musculaires et de la limite cuticule-épiderme (DE REGGI et col, 1986), chez *Carausius*, le marquage est observé sur tout l'épiderme (y compris la lame basale) et à la périphérie seulement des muscles (lame basale). La préparation antigénique qui a servi à l'immunisation contient des membranes plasmiques qui sont attachées à la lame basale, aussi est-il peu surprenant d'observer une fluorescence au niveau de la lame basale. Nos suspensions membranaires, F (fémurs dépourvus de faces ventrales), contiennent peu de muscles puisque, contrairement aux coupes histologiques, la fluorescence est très faible avec les "anti-tibia" et absente avec les "anti-fémur".

DISCUSSION ET CONCLUSION

Chez les Insectes, la caractérisation du matériel extracellulaire et des antigènes présents à la surface des cellules épidermiques concerne essentiellement les Holométaboles. Les résultats que nous avons obtenus chez le phasme, qui est un Hétérométabole, seront discutés en trois temps :

1er temps: les composés chimiques mis en évidence dans le moignon coxo-trochantérien et leur localisation.

2ème temps: origine et rôle du matériel contenu dans la chambre de régénération.

3ème temps: antigénicité des membranes plasmiques des cellules épidermiques.

I - Les composés chimiques mis en évidence et leur localisation dans le moignon coxo-trochantérien.

Les différentes techniques utilisées ont révélé la présence de protéines et de sucres. Certains sucres n'ont pas été mis en évidence par les lectines qui leur sont spécifiques, tels le galactose avec la PNA-FITC et le L-Fucose avec l'UEA-FITC. L'absence de fucose a déjà été signalée par WYATT (1967) dans l'hémolymphe de *Periplaneta* ainsi que dans la cuticule et le corps gras. En revanche, cet auteur a noté la présence de galactose dans l'hémolymphe. D'autres lectines comme la ConA-FITC, la WGA-FITC, la SBA-FITC et la HPA-FITC donnent une fluorescence avec notre matériel. Les sucres mis en évidence par ces lectines nous indiquent la présence éventuelle de polymères de sucres, chitine, GAGs ou encore de glycoprotéines.

Les différents composés révélés sont récapitulés sur la figure 11.

1 - La chitine

La chitine est un polymère de la GlcNac. La chitinase enlève en partie la colorabilité du contenu de la chambre de régénération à l'APS. La réaction de la chitine à l'APS a été très discutée: positive pour certains auteurs (HALE, 1957, GABE, 1968) ; négative pour d'autres (LISON, 1960 ; PEARSE, 1961 ; DELACHAMBRE, 1969). Pour ce dernier auteur, si la chitine est liée aux protéines comme dans les cuticules stabilisées d'insectes, elle est APS-négative, par contre, lorsque les liaisons sont faibles ou absentes, la chitine est APS-positive. MAUCHAMP et SCHREVEL (1977) ont utilisé la WGA-FITC comme marqueur spécifique de la chitine.

Pour ces auteurs, les composés qui se trouvent dans l'espace compris entre l'ébauche alaire et le sac péripodial de disque imaginal alaire de *Pieris brassicae* pourraient être de la chitine "colloïdale". Avec cette lectine, nous observons une fluorescence à la surface apicale des cellules épidermiques du régénérat et dans la chambre de régénération. Ces deux données nous permettent de penser que le matériel contenu dans la chambre de régénération renferme de la chitine sous forme "libre". La coloration résiduelle observée après action de la chitinase peut être due à la présence de protéines puisque celles-ci réagissent faiblement à l'APS (BARKA et ANDERSON, 1983). Nos résultats concordent avec ceux de NOULIN (1979) qui parle de chitine "jeune" chez *Porcellio*, mais différent de ceux de MARKS et LEOPOLD (1971), chez la blatte bien que le dépôt de matériel soit comparable. Ces auteurs, après un test à la chitinase fluorescente (BENJAMINSON, 1969), ont déduit que la première couche, d'aspect gélatineux déposée autour du régénérat de patte, était dépourvue de chitine, contrairement à la seconde qui est déposée plus tardivement.

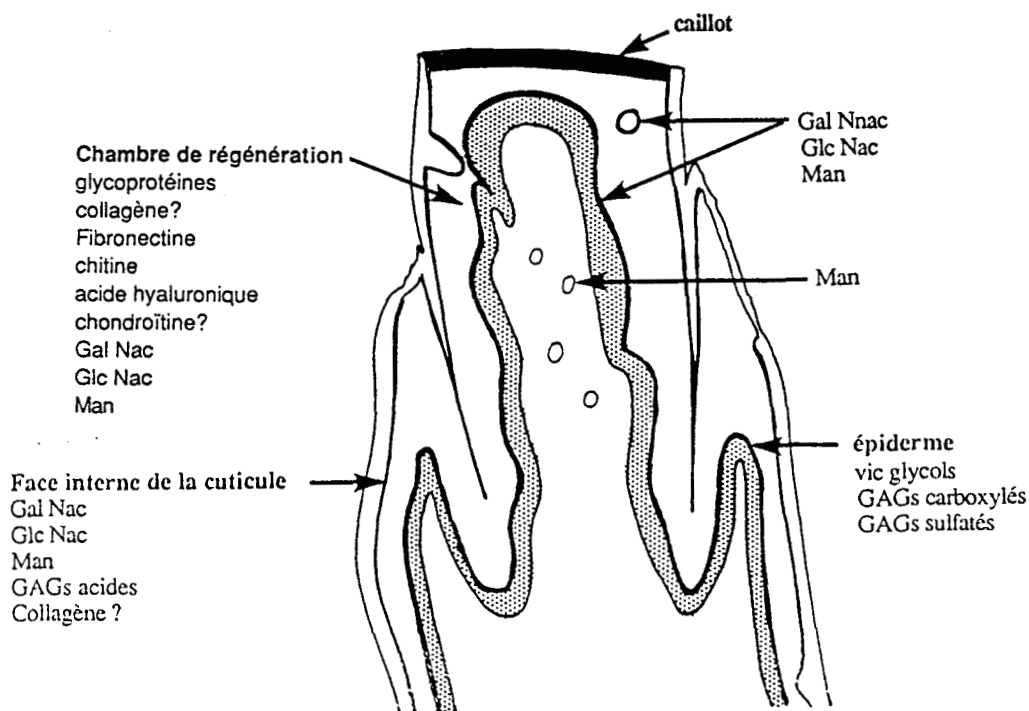


Fig.11. Substances détectées à l'aide de colorations histochimiques et d'enzymes dans le moignon coxo-trochantérien.

2 - Les GAGs

La coloration obtenue avec la fuschine paraldéhyde sans oxydation préalable révèle la présence de groupements électronégatifs. Le bleu alcian, colorant cationique, donne des résultats concordants et signale la présence de GAGs. Pour ces GAGs, seuls des groupements carboxyles sont présents puisque la présence éventuelle de groupements sulfatés, signalée par une faible coloration avec le bleu alcian pH 0,5, n'a pas été confirmée par les méthodes HID et bleu de toluidine. Il peut donc s'agir d'acide hyaluronique et/ou de chondroïtine.

La hyaluronidase de *Streptomyces* qui hydrolyse uniquement l'acide hyaluronique diminue l'intensité de la coloration au bleu alcian. La hyaluronidase testiculaire, qui hydrolyse l'acide hyaluronique, la chondroïtine et les chondroïtine-sulfates, ne provoque pas de diminution plus importante de la coloration. L'acide hyaluronique est donc vraisemblablement présent tandis que la présence de la chondroïtine est plus problématique. Chez le crustacé *Porcellio*, NOULIN (1979), à l'aide de tests histochimiques des GAGs, met en évidence la présence possible d'acide hyaluronique et de chondroïtine. Il considère plus probable qu'il s'agisse de l'acide hyaluronique sans toutefois avoir soumis son matériel à l'action spécifique de la hyaluronidase de *Streptomyces*.

En revanche, chez les Insectes, la présence d'acide hyaluronique est bien connue. Il est un des composants du tissu conjonctif (ASHHURST, 1982) et de la matrice extracellulaire située entre les faces épidermiques supérieure et inférieure du disque imaginal alaire de *Manduca* (NARDI et col., 1985). Une substance "hyaluronique-like" a été signalée dans le tissu cicatriciel d'épiderme de blatte par SANNASI, (1968). Avec les lectines spécifiques de la Gal Nac, nous obtenons une réaction fortement positive avec la HPA, faible avec la SBA et nulle avec la PHA-els. Ces différences ne semblent pas imputables aux fixateurs utilisés puisque des études comparatives de fixateurs en vue de l'utilisation de lectines montrent que le mélange fixateur de Bouin est un bon fixateur (TAKAI et col., 1986), voire même qu'il renforce la fluorescence (SODERSTRÖM et col, 1984). Ces différences d'affinités pour les lectines ont déjà été signalées chez les Vertébrés (WATANABE et col., 1982 ; KIVELÄ et TARKKANEN, 1987), et chez les Insectes (PERRONE et col., 1986). Ceci laisse supposer que les sites récepteurs de ces lectines ont une accessibilité différente. Toutefois, WU (1984) a montré que les carbohydrates d'un même glycoconjugué ou d'un glycoconjugué adjacent

peuvent augmenter ou inhiber la liaison des lectines et, de ce fait, des lectines qui ont les mêmes spécificités ne donnent pas nécessairement les mêmes résultats. La chondroïtine diffère de l'acide hyaluronique par la présence de galactosamine au lieu de glucosamine. Il ne peut s'agir de la forme sulfatée de la chondroïtine puisque les tests ne mettent en évidence que des groupements carboxyles. L'existence de la chondroïtine sous sa forme non sulfatée ne peut donc pas être totalement exclue.

En microscopie électronique, le rouge de ruthénium et l'acide tannique qui révèlent la présence de GAGs chargés négativement permettent de mieux visualiser le matériel de la chambre de régénération. Avec l'acide tannique, deux couches sont visibles autour d'un régénérat en phase 5. La hyaluronidase testiculaire élimine une partie importante de ce matériel.

Nos résultats sont en accord avec ceux de THEOCHARIS et col (1985) qui ont montré, qu'au cours du développement de *Ceratitis capitata* les GAGS étaient constitués principalement par de l'acide hyaluronique (74%) et de la chondroïtine (12%). La prédominance des GAGs non sulfatés ou très peu sulfatés serait pour ces auteurs caractéristique des tissus en développement.

3 - Protéines et glycoprotéines

La coloration de la chloramine T-Schiff indique la présence de protéines dans le matériel de la chambre de régénération. Ces protéines peuvent être du collagène puisque le rouge Sirius le colore également et que l'anti-collagène IV donne une réaction positive. Cet anti-collagène est le seul des trois anti-collagènes (I, III et IV) testés qui réagisse. La collagénase est restée sans action au niveau de ce matériel. Par ailleurs, NARDI et col, 1985, évoquent la présence éventuelle de collagène dans la matrice extracellulaire des disques imaginaires de *Manduca* sans avoir pu le mettre en évidence puisqu'ils disent ne pas avoir observé de fibres striées et que la collagénase n'a pas modifié la matrice extracellulaire. Le collagène de type IV se présente sous l'aspect d'un réseau et ne forme pas de véritables fibrilles. Ce collagène est décrit comme étant spécifique des membranes basales et les collagénases animales qui dégradent les collagènes intersticiels n'attaquent pas le collagène IV (MARTIN et col, 1985). Pour ces auteurs, ce type de collagène serait attaqué uniquement par une collagénase spécifique du type IV. La présence de collagène IV dans le matériel de la chambre de régénération ne peut donc pas être totalement

exclue. Dans les régénérats, la lame basale est pratiquement inexistante. Elle disparaît dans un premier temps, puis réapparaît avec une faible épaisseur et sans présenter d'aspect fibrillaire. Sur des régénérats en phase 5, avec l'anti-collagène IV, nous observons par endroit une faible fluorescence à la face basale des cellules épidermiques. En revanche, un liseré assez fluorescent se situe à la surface apicale des cellules épidermiques du régénérat. Cependant, dans une structure coxo-trochantérienne de patte non autotomisée, nous avons retrouvé la couche conjonctive fibrillaire décrite par ASHHURST, 1985 et FRANÇOIS, 1985. Pour ces fibres, la périodicité de la striation est la même que celle du collagène I, soit environ 60 nm. Il semble donc que les fibres de collagène apparaîtront au cours des mues suivantes. Ceci est en accord avec les résultats d'ASHHURST et COSTIN (1974) qui ont montré que le diamètre des fibres de collagène était en rapport avec l'âge des tissus.

Des anticorps anti-fibronectine humaine se lient au matériel de la chambre et plus particulièrement à la face apicale des cellules épidermiques du régénérat. Notre étude en western blot devra être poursuivie afin de confirmer la présence ou non de la fibronectine à ce niveau, d'autant que GRATECOS et col (1988) ont mis en évidence à la face apicale des disques imaginaires et dans l'hémolymphe de drosophile l'existence d'une protéine ayant des propriétés semblables à la fibronectine des Vertébrés. Du mannose et du glucose révélés par la ConA-FITC se trouvent dans la chambre de régénération, dans l'hémolymphe, autour des cellules épidermiques et des hémocytes. Autour des cellules, il peut s'agir des glycoprotéines des membranes plasmiques. La WGA est spécifique de la GlcNac et de l'acide neuraminique. L'action de la neuraminidase et l'hydrolyse acide ne révèlent pas la présence d'acide sialique. Différents auteurs ont d'ailleurs signalé son absence chez les Arthropodes (WARREN, 1963 ; WYATT, 1967 ; BUTTERS et HUGUES, 1978, 1981a et b ; NOULIN, 1979). Il semble donc que seule la GlcNac soit présente dans notre matériel. La HPA-FITC et la SBA-FITC révèlent la présence de la GalNac qui peut entrer également dans la composition des glycoprotéines. Les glycoprotéines susceptibles de contenir de la GlcNac et/ou de la GalNac se trouvent dans le matériel de la chambre de régénération, autour des cellules contenues dans cette chambre, à la face interne de la cuticule et à la face apicale des cellules épidermiques. Cependant, quelques cellules épidermiques fluorescent avec la HPA-FITC et semblent donc contenir de la GalNac qui peut soit participer à l'élaboration du matériel de la chambre de régénération, soit provenir de ce matériel.

Avec les lectines conjuguées à la fluorescéine, la fluorescence observée ne diffère pas de façon perceptible d'un endroit à l'autre du régénérat et ne montre donc pas de régionalisation comme on pouvait le présumer. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de fluorescence sous l'épiderme du régénérat. La membrane basale du corps gras des Insectes se lie à des lectines telles la ConA (DUTKOWSKI, 1977) et la WGA (RIZKI et RIZKI, 1983). Notre résultat est peu surprenant dans la mesure où la membrane basale est pratiquement inexistante. En revanche, un liseré fortement fluorescent est visible à la surface apicale des cellules épidermiques du régénérat bien que la sécrétion de cuticule n'ait pas débuté. Y-a-t-il une modification de la polarisation des sites de fixation de la lectine liée à l'absence de membrane basale comme le suggère RIZKI et RIZKI (1983)?

Il semble donc que le matériel contenu dans la chambre de régénération soit composé de protéines noyées dans un gel polysaccharidique hydraté. Les composés mis en évidence sont la "chitine libre", des glycoprotéines et des GAGs non sulfatés en particulier de l'acide hyaluronique et peut-être de la chondroïtine. Ce matériel a une composition apparentée à celui de la cuticule flexible de *Hyalophora cecropia* (WILLIS, 1987). En effet, cette cuticule renferme des protéines liées à du mannose, de la GalNac et parfois de la GlcNac, sucres qui sont pratiquement inexistantes dans la cuticule rigide. Par ailleurs, cet auteur souligne également qu'aucun GAG sulfaté de type mammifère n'a été retrouvé dans cette cuticule flexible. WOLFGANG et col. (1987) ont également montré que le matériel de la zone d'assemblage, situé entre la cuticule et les cellules épidermiques, était constitué d'une matrice extracellulaire amorphe, de nature fibreuse et qu'un antigène spécifique de cette zone se colore avec le bleu alcian, l'APS et contient du mannose, de la GlcNac. Les cellules épidermiques du régénérat sont-elles capables de sécréter ce type de matériel jusqu'à ce que le régénérat ait acquis sa morphologie définitive puis ensuite de sécréter une cuticule "normale" qui sera celle du stade suivant. Notons que RINTERKNECHT (1967) avait constaté qu'au cours de la cicatrisation qui suit l'ablation d'une partie de tégument, l'épiderme était capable de produire une matière cuticulaire en permanence mais incapable d'assurer une combinaison suffisamment rapide des matériaux précurseurs entrant dans la constitution d'une cuticule normale.

Chez les Vertébrés, les glycoprotéines : collagène, fibronectine, laminine, chondronectine, protéoglycannes sont les principaux composants de la matrice extracellulaire (HEWITT et

MARTIN, 1984). Certains de ces composants ont été trouvés dans la lame basale de la drosophile (FESSLER et col, 1984). Selon BROWER et col.(1987), le matériel extracellulaire fibreux qui se trouve à la surface apicale de l'épiderme et entre la lame basale et l'épiderme de disque imaginal de drosophile pourrait contenir un protéoglycane. Dans le matériel de la chambre de régénération et plus particulièrement à la face apicale des cellules épidermiques du régénérat, des substances apparentées au collagène de type IV et à la fibronectine de Vertébrés semblent présents. Ce matériel présent à la face apicale des cellules épidermiques ne peut être confondu avec la cuticule puisque nos observations ultrastructurales nous ont montré que la sécrétion d'épicuticule débutait seulement quelques jours avant le passage au stade suivant. Chez la drosophile la fibronectine est présente à la face apicale des cellules épidermiques (GRATECOS et col., 1988). Quant au collagène de type IV, sa présence n'a pas été démontrée chez les insectes, par ailleurs ce type de collagène serait uniquement un constituant des lames basales. Dans le régénérat de phasme, la lame basale est peu importante.

II - Origine et rôle du matériel contenu dans la chambre de régénération

En se rétractant, l'épiderme laisse un espace entre la cuticule du moignon coxo-trochantérien et lui-même. Cet espace est rempli d'un matériel extracellulaire. La matrice extracellulaire, chez les Vertébrés en particulier, joue un rôle de charpente mais aussi influence le développement, la migration, la prolifération, la forme et les fonctions métaboliques des cellules qui sont à son contact. Chez les Arthropodes, le rôle de soutien est assuré par la cuticule qui est sécrétée par les cellules épidermiques. La face interne de la cuticule du moignon coxo-trochantérien, en contact avec le matériel de la chambre de régénération, est modifiée puisque les lectines conjuguées à la fluorescéine la soulignent et que, par ailleurs, la chitinase et les hyaluronidases suppriment les colorations histochimiques à son niveau. Il semble donc que la chitine qui la compose n'ait plus la même structure que la chitine d'une cuticule normale. De même, la chitine présente dans le matériel de la chambre de régénération ne semble pas liée aux protéines. La chitine présente dans la chambre de régénération peut provenir soit de la digestion partielle de l'endocuticule, soit des cellules épidermiques qui, normalement, sécrètent la cuticule.

Des sucres, autres que la chitine, ont été mis en évidence dans la chambre de régénération. Cette matrice peut avoir comme origine les cellules épidermiques du régénérat ou les cellules de l'épiderme en rétraction mais aussi les hémocytes et l'hémolymphe. WIGGLESWORTH (1937) a montré que chez *Rhodnius*, les hémocytes libéraient des polypeptides au moment de la cicatrisation. DURLIAT (1985) pense que, chez les Crustacés Décapodes, il s'agit de protéines et de glycoprotéines. Chez *Carausius*, les hémocytes peuvent jouer ce rôle tant que le caillot n'est pas complètement mélanisé. Il est possible que les cellules situées dans la chambre de régénération prennent le relais puisque ces cellules sont soulignées par les lectines et les colorations histochimiques alors même que les cellules épidermiques ne le sont pas. Nous savons que les glycoprotéines entrent dans la composition de l'hémolymphe des Insectes (WIGGLESWORTH, 1972). Chez *Periplaneta*, les carbohydrates de l'hémolymphe qui se lient aux protéines pour former des glycoprotéines sont la glucosamine, la galactosamine, le mannose, le galactose et le glucose (WYATT, 1967). Dans un régénérat en début de formation, le filtre que constitue la lame basale est absent. D'autre part, les cellules ne sont accolées que dans leur partie apicale. Aussi, n'est-il pas exclu qu'une partie du contenu de la chambre de régénération provienne des constituants de l'hémolymphe. Par ailleurs, avec les différentes techniques utilisées : colorations histochimiques, lectines et anticorps, un liseré est visible à la surface apicale des cellules épidermiques du régénérat. La membrane basale absente ne peut jouer son rôle de soutien. Dans ce cas, est-ce le matériel situé à la face apicale des cellules qui joue ce rôle ou simplement les carbohydrates qui se trouvent en surface cellulaire qui faciliteraient l'adhésion et la migration des cellules comme cela a été mis en évidence chez l'embryon et dans les cas de tumeurs (OPPEINHEIMER, 1978 ; MILOS et WILSON, 1986) ?

III - L'antigénicité des membranes plasmiques de cellules épidermiques

Les analyses électrophorétiques que nous avons effectuées n'ont révélé que des différences quantitatives. Ce qui peut expliquer la difficulté rencontrée pour l'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques puisque des anticorps "anti-tergites" et/ou "anti-sternites" donnent le même résultat avec des tergites et/ou des sternites. Bien que nous ayons obtenu des membranes plasmiques de cellules épidermiques par des techniques plus fines que celles utilisées par BART et CAPRON (1974), comme ces auteurs, nous avons noté que les muscles et l'hémolymphe étaient fortement contaminants. En électrophorèse, la bande majeure de

l'hémolymphe se retrouve dans les tergites et sternites ; la bande majeure des muscles se retrouve uniquement dans les tergites. Ceci est peu étonnant puisque les morceaux de sternites que nous avons prélevés étaient totalement dépourvus de muscles. Pour les tergites, les insertions musculaires sont assez nombreuses et certaines fibres musculaires sont restées attachées au fragment tergal. Quant à l'hémolymphe, tous les tissus et organes sont baignés par elle et il est impossible de l'éliminer. Cette contamination peut également expliquer les résultats obtenus avec des anticorps dirigés contre les membranes plasmiques d'épiderme de blatte puisqu'aucune spécificité n'a vraiment été observée. Nous rappellerons ici, qu'en ce qui nous concerne, nous n'avons pas réussi par la technique de BULLIERE et col., (1981) à isoler des membranes plasmiques ; le choc osmotique est insuffisant pour détacher les muscles de l'épiderme et vider les cellules de leur contenu. Au niveau du régénérat, la fluorescence observée avec des lectines liées à la fluorescéine ne semble pas différer d'un endroit à l'autre. Chez ces régénérats en formation, il n'y aurait donc pas de régionalisation comme on pouvait le présumer avec les résultats obtenus par BART (1966, 1969 et 1971). Cet auteur a montré que, chez le phasme, la mise en contact d'épiderme de faces opposées de patte provoque le déclenchement de morphogenèse et non une simple cicatrisation, les cellules possèdent donc une information de position. Cependant, des glycoprotéines sont présentes à la surface épidermique du régénérat et chez la drosophile, les antigènes spécifiques de position des surfaces cellulaires sont des glycoprotéines (BROWER et col., 1984 ; WILCOX et col., 1984). Antigènes de position qui ressemblent aux récepteurs à la fibronectine des Vertébrés (LEPTIN et col., 1987). Toutefois, le rôle de ces antigènes de position dans la morphogenèse n'a pas été démontré.

En conclusion, le matériel présent dans la chambre de régénération et à la face apicale des cellules épidermiques du régénérat semble constitué : de chitine non liée à des protéines, de GAGs non sulfatés tels l'acide hyaluronique et/ou la chondroïtine, de sucres tels le mannose, la GlcNac, la GalNac et de glycoprotéines. Parmi ces glycoprotéines, des composés apparentés à la fibronectine et au collagène IV des Vertébrés semblent présents.

DEUXIEME PARTIE

TENTATIVES DE PERTURBATION D'UNE
MORPHOGENESE REGENERATRICE

CHAPITRE III
INJECTION D'HEPARINE

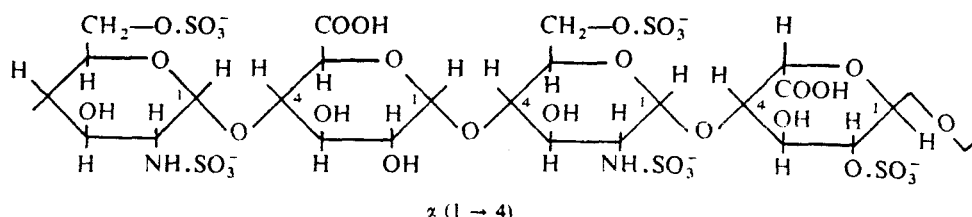
Chez les Insectes, l'héparine modifie les propriétés coagultrices des hémocytes (GREGOIRE, 1953, 1964) et retarde la cicatrisation (BOHN, 1976). En injectant de l'héparine à nos animaux, nous espérons retarder la cicatrisation et par la même perturber les propriétés de surface des cellules épidermiques qui participent à la mise en place du régénérat. Pendant la réalisation de ce travail, nous avons noté des allongements importants des durées de l'intermue. En complément, nous avons donc entrepris une étude des ecdystéroïdes qui sont les hormones de la mue. Dans une première partie, nous exposerons les résultats obtenus après l'injection d'héparine. Dans une deuxième partie, nous évoquerons le problème des ecdystéroïdes. Puis dans une troisième partie, nous discuterons de l'ensemble des résultats obtenus.

ACTION DE L'HEPARINE

I - L'HEPARINE

L'héparine est un glycosaminoglycane acide, polymère d'unités constituées d'acide glucuronique et de N-acétyl glucosamine sulfatés.

Sa structure est la suivante :



Chez les Vertébrés, elle a un rôle anti-thrombine et de ce fait empêche la transformation du fibrinogène en fibrine. L'héparine (Sigma n°H 3125, 168 u/mg) est diluée dans le liquide physiologique de BART.

II - INJECTION DANS LE MOIGNON COXO-TROCHANTERIEN

1 - Méthode

Les injections sont pratiquées sur des moignons d'1 jour (l'autotomie est provoquée le jour du passage en stade IV). L'héparine est injectée directement dans l'hémolymphe du moignon en perçant la membrane articulaire coxo-trochantérienne dorsale.

Chaque moignon reçoit 0,1 μ l de solution d'héparine aux concentrations suivantes :

0,2	mg/ml	soit	0,02	μ g	d'héparine
2	mg/ml	soit	0,2	μ g	d'héparine
20	mg/ml	soit	2	μ g	d'héparine

2 - Résultats

Quelle que soit la dose d'héparine injectée :

- la durée de l'intermue augmente en moyenne de 6 jours
- les régénérats sont normaux sauf dans un cas où la dose est de 2 μ g. Le régénérat atypique présente une déficience ventrale antérieure du tibia ce qui lui donne un aspect enroulé. Chez 2 adultes, on note une déficience de la membrane articulaire située entre les articles tarsaux 2 et 3. Il faut cependant remarquer que ces perturbations sont parfois observées sur des animaux non soumis à expérimentation.

3 - Conclusion

L'héparine injectée directement dans l'hémolymphe du moignon n'a pas engendré de perturbations morphogénétiques. Les concentrations utilisées sont faibles et n'ont pas perturbé la cicatrisation.

III - INJECTION DANS LE CORPS DE L'ANIMAL

Dans un premier temps, afin d'évaluer les perturbations que l'héparine pouvait provoquer, une gamme de concentrations a été injectée. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à déterminer la durée d'action de l'héparine.

Chaque animal reçoit 5 μ l d'une solution d'héparine. Au moment de l'injection, le poids des animaux est en moyenne de 80 mg.

A - Rapport dose-réponse

1 . Méthodes

a . Rapports chronologiques injection-autotomie

Des animaux qui ont mué depuis 1 ou 2 jours reçoivent des solutions d'héparine aux concentrations suivantes :

100 mg/ml soit 0,5 mg d'héparine par animal
 50 mg/ml soit 0,25 mg d'héparine par animal
 30 mg/ml soit 0,15 mg d'héparine par animal
 20 mg/ml soit 0,1 mg d'héparine par animal
 10 mg/ml soit 0,05 mg d'héparine par animal

Puis, pour toutes les doses, 1 à 2 jours après l'injection, nous provoquons l'autotomie de la patte mésothoracique gauche.

Dans une autre série expérimentale, nous avons provoqué l'autotomie 2 jours avant l'injection de 0,1 mg d'héparine par animal.

b . Etude histologique

Elle a été réalisée sur des moignons coxo-trochantériens d'animaux ayant reçu 0,5 ; 0,25 ou 0,1 mg d'héparine. Les moignons ont été prélevés 1, 2, 6, 8 et 12 jours après l'autotomie qui avait été provoquée 1 jour après l'injection. Au-delà de 12 jours, des moignons ont été prélevés sur des animaux dont la survie était problématique. Les coupes ont été colorées au bleu alcian pH 2,5-hématoxyline de Groat ou à l'hématoxyline de Groat-éosine.

2 . Résultats (Tableau IX)

En général, la coxa et le trochanter ressemblent à ceux d'un régénérat de patte normale n'ayant pas reçu d'héparine. Nous ne décrivons donc que la partie du régénérat qui succède à la région coxo-trochantérienne en direction distale.

a. 0,5 mg d'héparine par animal

Les 50 animaux sont morts sans avoir mué parfois après un délai post-injection supérieur à 2 mois .

Sous la cuticule du moignon, aucun régénérat en formation n'est observé. Dans les premiers jours qui suivent l'injection, la croûte qui obture la plaie reste mince, jaunâtre et ne se mélanise que vers le 6^e jour. De très nombreux hémocytes sont accumulés sous cette croûte. Le matériel présent entre ces hémocytes se colore plus intensément avec le bleu alcian pH 2,5 que dans un caillot normal (Pl. XV, 4). Le renforcement de la coloration pourrait être lié directement à la présence d'héparine puisque le bleu alcian colore les GAGs. Cependant, l'hémolymphe qui a reçu l'héparine n'est pas plus colorée. Il semble donc que cette forte coloration soit liée à la

présence d'un matériel sécrété par les hémocytes et non directement à la présence d'héparine. Il faut aussi noter que l'hémolymphe contient de nombreux granules réfringents. Au 8ème jour, la continuité épidermique n'est pas complètement rétablie et les noyaux de l'épiderme trochantérien s'arrondissent.

Interventions au St. IV	Quantité d'héparine par animal	Durée d'intermue (jours)	Nombre d'animaux St. V	Régénération			
				Normale	Anormale	Blastème	Absente
Témoins	-	21,6±1,2	12	12 (100%)			
Injection puis autotomie	0,5 mg	> 60	0				
Injection puis autotomie	0,25 mg	42,7±16,9	7	1 (14,2%)	1 (14,2%)	3 (42,8%)	2 (28,5%)
Injection puis autotomie	0,15 mg	60,8±7,9 *	27		8 (29,6%)	9 (33,3%)	10 (37%)
Injection puis autotomie	0,1 mg	43,8±8,7 55,3±4,1*	19 + 40 21	19 (47,5%)	18 (45%)		3 (7,5%)
Autotomie puis injection	0,1 mg	41±3,6	22	10 (45,4%)	12 (54,5%)		
Injection puis autotomie	0,05 mg	38,5±3	18	16 (88,9%)	2 (11,1%)		

Tableau IX : Potentialités régénératrices exprimées par le moignon coxo-trochantérien mésothoracique gauche après injection dans le corps de l'animal de différentes quantités d'héparine. Chez les témoins, seule une autotomie a été pratiquée. (*: au cours de l'intermue, 1 ou plusieurs pattes ont été autotomisées)

b . 0,25 mg d'héparine par animal.

Ici encore, la mortalité est importante. Sur une quarantaine d'animaux, seulement 7 ont atteint le stade V. La durée moyenne de l'intermue est de 42,7 ± 16,9 jours.

Dans 2 cas, il y a une simple cicatrisation.

Dans les 5 autres cas, une morphogenèse a eu lieu. Nous avons obtenu :

- soit un régénérat normal (1 cas),
- soit un petit régénérat comportant, sans doute, 3 articles atypiques (1 cas),
- soit une petite masse blanchâtre à allure de blastème (3 cas). Malheureusement, ces animaux sont morts avant une nouvelle mue.

En histologie, au 1er jour qui suit l'injection, nous voyons que sous la croûte, qui est très fine, les hémocytes entre lesquels se trouve beaucoup de matériel occupent tout le trochanter. La croûte s'épaissit et se mélanise plus rapidement qu'avec la dose précédente. Au 8ème et 12ème jours qui suivent l'injection, la croûte est beaucoup plus épaisse que chez des animaux témoins et les hémocytes sont encore très nombreux à son contact. L'épiderme situé en bordure de la plaie commence à migrer sous le caillot vers le 6ème jour qui suit l'injection. Vers le 12ème jour (Pl. XV, 5a), la continuité épidermique est rétablie et la partie distale de la trachée commence à se comprimer. A ce moment, l'aspect général est celui d'un blastème de régénération en phase 2. Cependant, de nombreuses différences existent. La croûte est très épaisse et la hauteur de l'épiderme dans le trochanter est moins grande. Lors du rapprochement épidermique, les cellules ne semblent pas s'allonger pour migrer et l'épiderme reste très épais sous le caillot. La rétraction de l'épiderme trochantérien est à peine ébauchée. On note encore la présence d'un important matériel colorable par le bleu alcian entre les hémocytes qui sont très allongés. L'hémolymphe a toujours un aspect très granuleux. Entre l'épiderme et la cuticule et dans la zone cuticulaire la plus interne, de nombreux grains sont présents (Pl. XV, 5b).

c . 0,15 mg d'héparine par animal

Dans cette série expérimentale, l'autotomie de la patte mésothoracique gauche a été provoquée 1 jour après l'injection mais nous avons également provoqué l'autotomie de la patte mésothoracique droite à différents moments dans l'intermue. La durée moyenne de l'intermue est de $60,8 \pm 7,9$ jours. Nous rapportons ici uniquement les résultats de l'autotomie provoquée au début de l'intermue.

27 des cinquante animaux traités parviennent au stade V et 5 d'entre eux atteindront le stade VI. Chez ces animaux, seule la partie distale de la coxa est modifiée. La partie proximale a l'aspect d'une coxa témoin et non d'une coxa de régénérat. Il semble donc que la dédifférenciation épidermique n'atteigne pas la partie proximale de la coxa.

Les résultats obtenus sont les suivants :

* 10 animaux ont simplement cicatrisé.

4 de ces 10 animaux ont un trochanter plus grand que le trochanter d'un régénérat normal.

Des coupes histologiques réalisées dans 6 moignons coxo-trochantériens (4 en stade V et 2 en stade VI) montrent que dans 4 cas une morphogenèse régénératrice a lieu. Un de ces animaux présente deux excroissances peu développées, mais bien visibles. Dans ces derniers cas, les moignons ont gardé leurs potentialités régénératrices puisqu'ils sont capables à la 2ème mue post-opératoire de donner un régénérat. Ceci est analogue aux résultats obtenus lorsque l'autotomie a lieu dans la deuxième moitié de l'intermue.

* 9 animaux possèdent une petite formation à allure de blastème, l'un de ces individus présente un ergot trochantérien ventral.

* 2 animaux ont un régénérat de taille à peine supérieure à celle d'un blastème et où seul l'onychium est reconnaissable (Pl. XV, 2a). Ces 2 animaux ont effectué une 5ème mue larvaire. Au stade VI, tous les articles : fémur, tibia et tarse, sont présents mais anormaux :

- chez l'un, le fémur très court et le tibia présentent une déficience ventrale. De ce fait, le tarse est ventralement en relation avec le trochanter. L'onychium est très développé et un ergot est présent postérieurement sur le trochanter (Pl. XV, 2b).

- chez l'autre, l'ergot trochantérien ventral présent au stade V a grandi mais reste à l'état de tigelle. Le régénérat, quant à lui, présente une déficience ventrale du fémur, du tibia et du tarse (Fig. 12, 4, a et b)

* 6 animaux possèdent un petit régénérat dont la taille est nettement inférieure (1 à 2,5 mm) à celle d'un régénérat normal (6,5 à 7,5 mm). Ces régénérats présentent quelques anomalies :

- le trochanter possède un ergot ventral (2cas) (Pl. XV, 1).
- l'articulation fémur-tibia n'est pas toujours très nette (5 cas).
- le fémur très court par rapport à l'ensemble du régénérat (5 cas) présente dans 3 cas une déficience ventrale. Dans 1 cas, il possède une bosse fortement sclérotisée sur sa face postérieure.

- le tibia présente une déficience ventrale (3 cas) (Fig. 12, 1 et 2) ou dorsale (1 cas) (Fig. 12, 3).

- le tarse n'est pas segmenté dans 1 cas. (Fig. 12, 1) Le nombre de griffes est parfois perturbé : 1 (1 cas) ou 3 (1-cas).

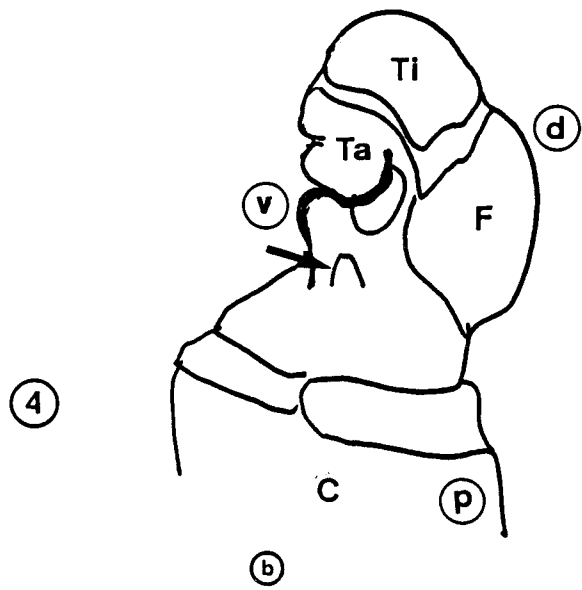
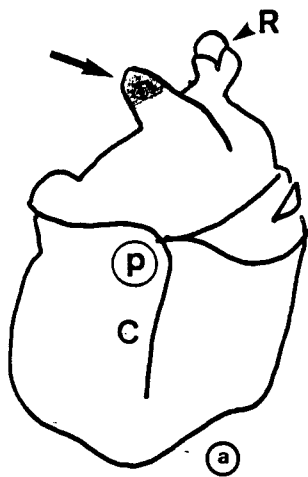
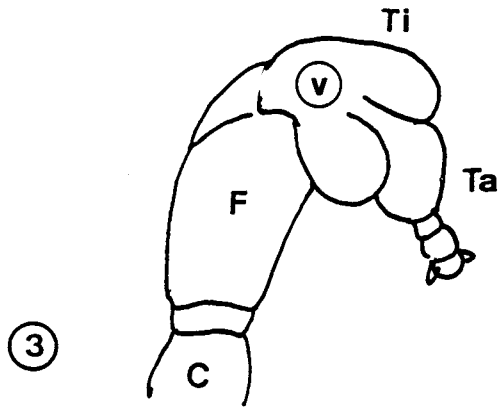
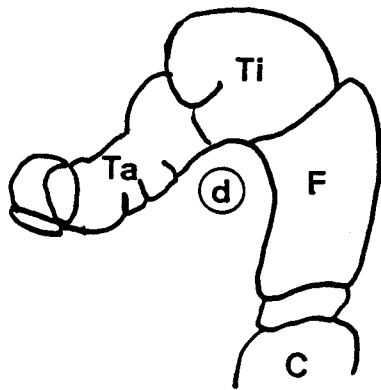
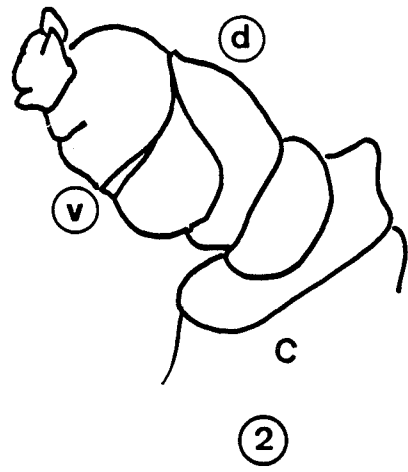
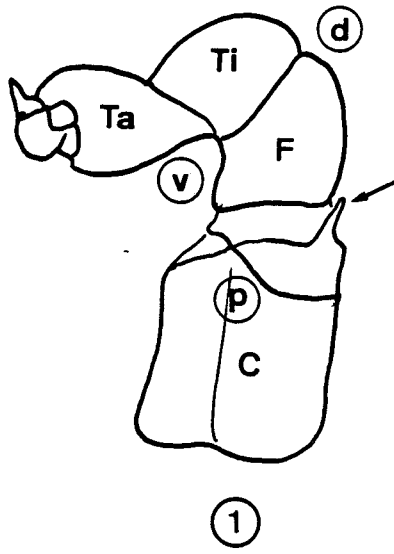
- les membranes articulaires sont parfois modifiées. La membrane articulaire coxo-trochantérienne dorsale a un aspect digité (1 cas) (Fig. 12, 1). Chez un individu, un mamelon dur se trouve dans la membrane articulaire tibio-tarsale ventrale. Les membranes articulaires tarsales sont absentes du côté ventral (2 cas) ou dorsal (1 cas).

Figure 12

**Résultats de l'injection de 0,15 mg d'héparine
1 jour après le passage des animaux en stade IV.
L'autotomie d'une patte est provoquée 1 jour après l'injection.**

1. Le tarse n'est pas segmenté, la face ventrale du tibia est déficiente et la membrane articulaire coxo-trochantérienne dorsale est digitée (←).
2. Les articles du régénérat sont courts et présentent une déficience ventrale.
3. Chez ce régénérat, le tibia présente une déficience dorsale et la limite tibio-tarse est mal définie.
4. Au stade V, une tigelle (➡) est présente près d'un petit régénérat dont l'extrémité distale ressemble à un onychium (a). Au stade VI, la tigelle toujours présente (➡) n'a pas grandi, le régénérat présente une déficience ventrale de tous les articles (b).

C, coxa; d, face dorsale ; F, fémur ; p, face postérieure ; R, régénérat ; Ta, tarse ;
Ti, tibia; v, face ventrale.



Pour l'étude histologique, 3 animaux ont été fixés au cours du stade IV. Dans 2 cas, on distingue nettement un régénérat, dans l'autre cas, une petite excroissance et beaucoup de débris cellulaires sont visibles.

d . 0,1 mg d'héparine par animal

Avec cette dose, l'injection a été faite, soit 1 ou 2 jours avant, soit 1 jour après l'autotomie.

1. L'injection précède l'autotomie.

40 animaux sont entrés en stade V.

a . Durée de l'intermue

Pour le calcul de la durée de l'intermue, nous distinguerons 2 lots :

1 - les animaux dont une seule patte a été enlevée (en l'occurrence la patte mésothoracique gauche). La durée de l'intermue est de $43,8 \pm 8,7$ jours. Seul ce lot sera retenu pour la comparaison des durées de l'intermue en fonction des différentes doses.

2 - les animaux qui en plus de la patte mésothoracique gauche ont perdu d'autres pattes au cours de l'intermue. La durée de l'intermue est de $55,3 \pm 4,1$ jours, allongement significatif pour $p \leq 0,05$.

b . Résultats morphogénétiques.

19 animaux ont un régénérat normal mais de taille légèrement inférieure à celle d'un régénérat témoin.

4 animaux présentent une déficience dorsale du tibia.

1 animal possède à la base du 4^{ème} article tarsal une petite formation supplémentaire à allure de tige avec une griffe à l'extrémité.

12 animaux ont un régénérat très petit, de la taille de la coxa, le plus souvent articulé mais dont les subdivisions sont peu caractérisées.

1 animal ne possède qu'un onychium.

3 animaux n'ont pas de régénérat, il n'y a eu que cicatrisation au niveau du trochanter.

c . Résultats histologiques

Alors que l'épiderme migre, une couche assez importante de matériel colorable par le bleu alcian recouvre sa surface apicale. La cicatrisation a lieu entre le 6^{ème} et le 12^{ème} jour après

l'autotomie. De très nombreux grains, semblables à ceux observés normalement 1 jour après l'autotomie, sont situés entre la cuticule et l'épiderme. 12 jours après l'autotomie, l'épiderme est rétracté dans le trochanter. L'allure générale est celle d'un moignon témoin de 2 à 4 jours après autotomie sans injection, cependant, la hauteur du blastème est moindre. De nombreux hémocytes vivants sont encore présents sous la croûte qui est épaisse. Il faut aussi noter la présence dans l'hémolymphe du moignon de nombreux hémocytes dont le cytoplasme est colorable par le bleu alcian. Ce type d'hémocytes n'a pas été repéré lors de la formation d'un régénérat normal.

L'observation d'un moignon coxo-trochantérien, à la loupe binoculaire, 20 jours après l'autotomie montre que la croûte est peu mélanisée. De plus, la rétraction épidermique ne se situe qu'au niveau distal de la coxa, alors que pour un régénérat normal, elle aurait déjà atteint le mésothorax.

2 . L'injection suit l'autotomie

22 animaux ont mué, la durée moyenne de l'intermue est de $41 \pm 3,6$ jours. Dans tous les cas, nous obtenons un régénérat.

Chez 10 animaux, le régénérat ressemble à un régénérat normal mais est de taille légèrement inférieure.

Dans 4 cas, les régénérats sont presque normaux. Chez l'un d'entre-eux, le fémur présente distalement une petite excroissance à la limite des faces antérieure et dorsale. Le tibia est plus perturbé : dans 1 cas, une excroissance qui n'a pas l'allure d'un blastème est visible au niveau proximal sur la face antérieure ; dans 2 cas, il y a une déficience d'une face du tibia, l'une ventrale faible et l'autre dorso-antérieure importante.

Dans 8 cas, les régénérats sont très petits et les articles à peine discernables. Ces régénérats dont la base est rétrécie se nécrosent au cours de l'intermue suivante.

3 . Conclusion

Que l'autotomie ait lieu avant ou après l'injection, les résultats sont sensiblement identiques.

On observe que :

- la durée de l'intermue est doublée (la différence observée entre les deux séries expérimentales n'est pas significative pour $p \leq 0,05$) ;
- la cicatrisation est retardée ;
- dans la majorité des cas (59 sur 62), il y a régénération. Les régénérats sont normaux (29 cas)

ou petits et parfois difficilement interprétables (30 cas) ;

- les animaux ne survivent pas au stade V ;
- les perturbations engendrées ne sont que des déficiences du régénérat.

e . 0,05 mg d'héparine par animal

La durée moyenne de l'intermue est de $38,5 \pm 3$ jours

16 régénérats sont normaux. 2 régénérats sont très petits, cependant, le fémur, le tibia et le tarse, bien que peu discernables, semblent présents.

3 . Conclusion

Quelle que soit la dose injectée, la durée de l'intermue est augmentée.

Pour la dose la plus forte, la cicatrisation n'a pas lieu et nos animaux meurent au bout de 2 mois sans avoir mué. Ce fait concorde avec les observations de VOY (1951) et RINTERKNECHT (1964) qui ont établi que la continuité épidermique est nécessaire pour que l'exuviation ait lieu, sauf si la blessure intervient peu de temps avant la mue.

Lorsque la dose injectée diminue, le nombre de régénérats normaux augmente :

avec 0,25 mg, très peu d'animaux régénèrent,

avec 0,15 mg, les 2/3 des animaux environ régénèrent mais aucune régénération n'est normale,

avec 0,1 mg, pratiquement tous les animaux régénèrent mais la moitié des régénérats sont anormaux,

enfin avec 0,05 mg, pratiquement tous les régénérats sont normaux.

Les anomalies de régénération se traduisent essentiellement par : une réduction de taille du régénérat, des déficiences au niveau de certaines faces ou des articles peu discernables. Dans

1 cas, un onychium seul est apparu, sans structure intermédiaire entre lui et le trochanter.

Que l'injection ait lieu peu de temps avant ou après l'autotomie (la cicatrisation n'étant pas achevée), les résultats sont identiques.

Pour les doses de 0,25 et 0,1 mg/animal, dans quelques cas, il n'y a pas de régénération à la mue suivante.

B - Influence de l'héparine dans le temps

Dans un premier temps, nous rapporterons les résultats obtenus chez des animaux qui ont reçu 0,1 mg d'héparine 1 jour après leur passage en stade IV et dont deux pattes ont été autotomisées naturellement : la patte mésothoracique gauche 1 jour après l'injection et une deuxième patte dans les périodes de 10 à 15 et 20 à 25 jours après l'injection. Ces résultats nous ont incitée à rechercher plus précisément à partir de quel moment dans l'intermue après l'injection d'héparine, l'autotomie d'une patte est suivie d'une régénération normale. Aussi, dans un deuxième temps, exposerons-nous les résultats obtenus après injection de 0,15 mg d'héparine et autotomie pratiquée 8, 15, 20 et 35 jours après l'injection. Cette dose a été retenue puisqu'elle constitue une dose charnière.

1. 0,1 mg par animal

Les autotomies se sont produites 10 à 15 jours ou 20 à 25 jours après l'injection.

La figure 13 récapitule les périodes d'intervention et les résultats obtenus.

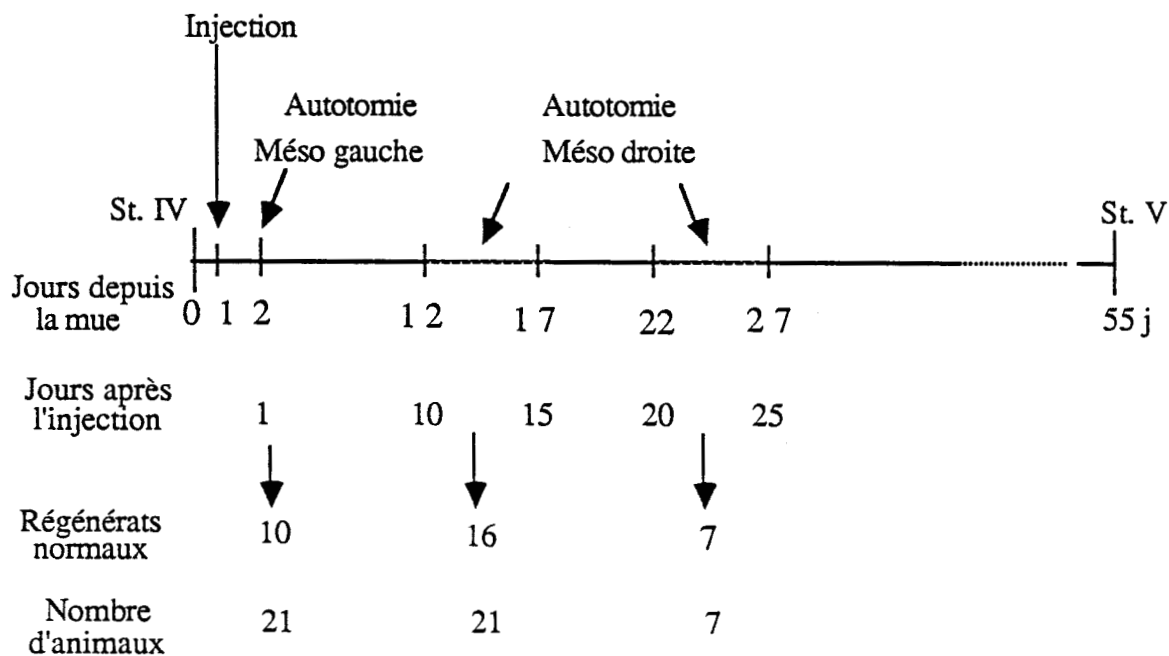


Fig.13. Résultats de l'injection de 0,1 mg d'héparine 1 jour après le passage des animaux en stade IV. La patte mésothoracique gauche a été autotomisée 1 jour après l'injection, une deuxième patte a été autotomisée dans des périodes de 10 à 15 et 20 à 25 jours après l'injection.

Soulignons que, si l'autotomie est provoquée 1 jour après l'injection, le nombre de régénérats anormaux est plus élevé que lorsqu'elle a été provoquée entre 10 et 15 jours après l'injection.

Parmi les 5 animaux qui ne présentent pas de régénération normale lorsque l'autotomie a eu lieu 10 à 15 jours après l'injection :

- 2 ont cicatrisé (l'un n'ayant plus de trochanter) ;
- 1 animal ne possède qu'un onychium en plus de la coxa et du trochanter ;
- 2 ont un régénérat dont le fémur et le tibia ont une face ventrale déficiente.

La durée de l'intermue est considérablement allongée : $55,3 \pm 4,1$ jours. Mais il faut rappeler que ces animaux ont subi 2 autotomies : l'une 1 jour après l'injection et l'autre à un autre moment dans l'intermue.

Il semble que la période "charnière" se situe entre 15 et 20 jours puisque lorsque l'autotomie est provoquée entre 10 et 15 jours après l'injection, les régénérats présentent des anomalies alors que si elle a lieu entre 20 et 25 jours, tous les régénérats sont normaux.

2 . 0,15 mg par animal (Tableau X et XI)

Chez les animaux qui ont reçu 0,15 mg d'héparine et dont la patte mésothoracique gauche a été autotomisée 1 jour après l'injection, nous avons pratiqué l'autotomie de la patte mésothoracique droite 8, 15, 20 ou 35 jours après l'injection.

a . Résultats

1 - Autotomie 8 jours après l'injection

Pour les 7 animaux qui ont atteint le stade V, la durée moyenne de l'intermue est de $61,5 \pm 7,9$ jours

- 1 seul animal présente un régénérat de taille normale (6 mm).
- 1 animal possède un petit régénérat (3 mm) dont le fémur est court par rapport au tibia.
- 2 ont un régénérat anormal. Chez l'un, le régénérat se compose d'une coxa, d'un trochanter et d'une petite prestation qui ressemble à un onychium. Chez l'autre, la prestation mesure 1 mm, présente une déficience postérieure du fémur et du tibia et le tarse n'est pas segmenté (Fig.14,1).
- 3 animaux ont cicatrisé. Chez l'un d'entre eux, le trochanter, bien que de hauteur nettement

supérieure à celle d'un trochanter normal, n'a pas engendré de régénérat au stade suivant.

2 - Autotomie 15 jours après l'injection

La durée moyenne de l'intermue est de $61,8 \pm 10,4$ jours.

- 4 animaux sur 6 présentent un régénérat normal légèrement plus petit (5,5 à 6 mm) qu'un régénérat témoin (6,5 à 7 mm).
- 1 animal a simplement cicatrisé. Au stade VI un régénérat apparaît.
- Dans 1 cas, le régénérat, peu net au stade V (Fig. 14, 2a), donne au stade VI un régénérat complètement anormal (Fig. 14, 2 b et c). La face postérieure est totalement déficiente. Fémur et tibia sont complètement déjetés du côté dorsal. Le tarse est grand, insegmenté et l'arolium est gros et semble segmenté (Fig. 14, 2b et 2c).

Nombre de jours entre injection et autotomie (St. IV)	Nombre d'animaux en St. V	Régénération			
		Normale	Anormale	Blastème	Absente
8	7	1	3		3
15	6	4	1		1
20	8	8			
35	3	1	1		1

Tableau X : Potentialités régénératrices de moignon coxo-trochantérien d'animaux ayant reçu 0,15 mg d'héparine 1 ou 2 jours après leur passage au stade IV. La patte mésothoracique gauche est autotomisée 1 jour après l'injection et la droite 8,15,20,35 jours après l'injection.

3 - Autotomie 20 jours après l'injection

La durée moyenne de l'intermue, pour les 8 animaux qui ont mué, est de $62,1 \pm 5,9$ jours. Tous ont un régénérat normal.

Figure 14

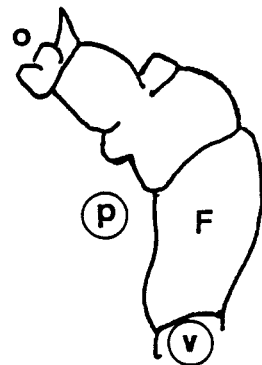
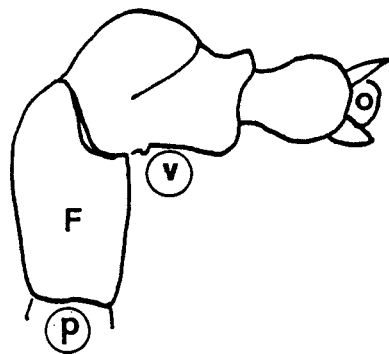
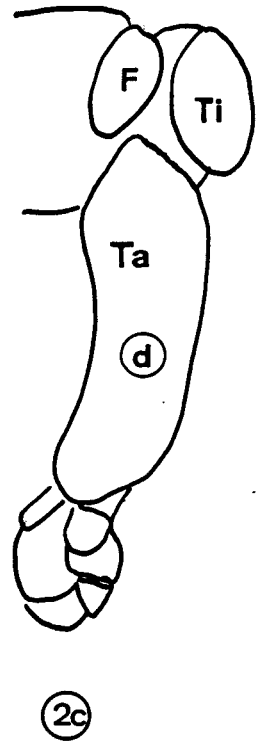
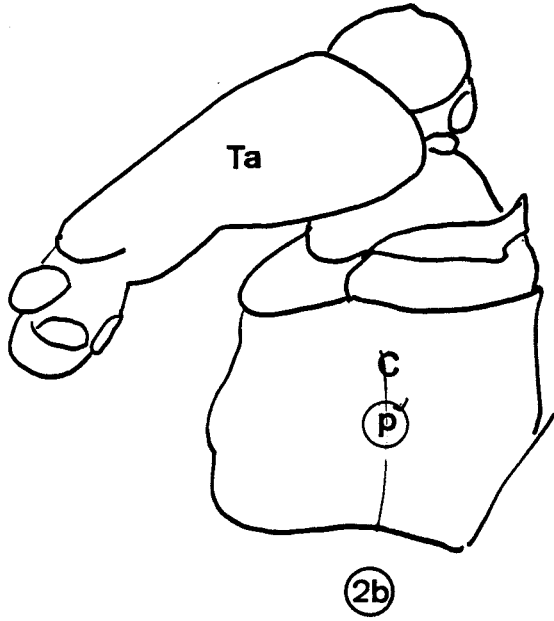
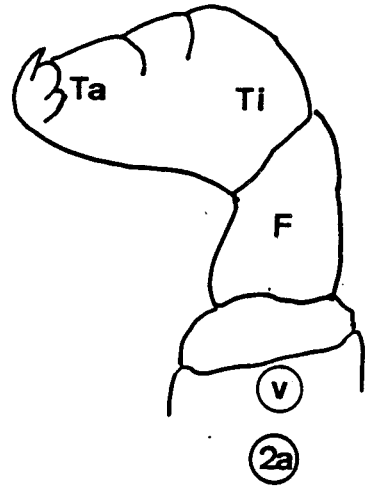
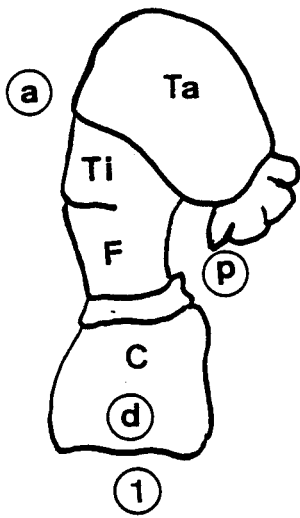
Régénérats obtenus après l'injection au stade IV de 0,15 mg d'héparine et l'autotomie d'une patte provoquée à différents moments dans l'intermue

1 - Régénérat obtenu après autotomie 8 jours après l'injection. Au stade V, ce régénérat présente une déficience postérieure du fémur et du tibia.

2 - Régénérats obtenus après autotomie 15 jours après l'injection. Au stade V, le fémur est bien individualisé, tibia et tarse se succèdent avec une articulation uniquement du côté antérieur (**a**) . Au stade VI, la face postérieure est totalement déficiente (**b**). Fémur et tibia sont complètement déjetés du côté dorsal. Le tarse est grand, insegmenté et l'arolium est gros et semble segmenté (**c**).

3 - Régénérat obtenu après autotomie 35 jours après l'injection. Au stade V, la limite tibio-tarse est peu visible sur la face ventrale. Le régénérat obtenu au stade VI figure sur la planche : XV, 3.

a, face antérieure; C, coxa; d, face dorsale; F, fémur; o, onychium; p, face postérieure; Ta, tarse; Ti, tibia.



4 - Autotomie 35 jours après l'injection

Pour les 3 animaux passés en stade V, la durée moyenne de l'intermue est de $54 \pm 7,2$ jours.

1 animal a cicatrisé, le trochanter est très petit (16 jours séparent l'autotomie de la mue)

1 animal possède un régénérat normal (27 jours entre l'autotomie et la mue)

1 animal a un régénérat de petite taille (13 jours entre l'autotomie et la mue). Le fémur est présent mais la limite tibio-tarse n'est pas visible et l'onychium est perturbé (Fig. 14, 3). Au stade VI, (Pl. XV, 3) le tibia et le tarse ont considérablement grandi par rapport au fémur, les limites entre articles sont nettes. Un petit appendice articulé est apparu dans la membrane articulaire tibio-tarsale dorso-postérieure. Dans la membrane articulaire fémoro-tibiale, qui est grande du côté ventral, un mamelon à cuticule sclérotisée est présent. La partie proximo-dorsale du tibia est large et déformée. Une verrue est présente au niveau ventral du trochanter.

Nombre de jours entre l'injection et la 2 ^{ème} autotomie	Nombre d'animaux	Durée de l'intermue (jours)	Nombre de jours entre la 2 ^{ème} autotomie et la mue
8	7	$61,5 \pm 7,9$	53,5
15	6	$61,8 \pm 10$	46,8
20	8	$62,1 \pm 5,9$	32,1
35	3	$54 \pm 7,2$	19

Tableau XI : Durée de l'intermue et nombre de jours écoulés entre l'autotomie et la mue chez des animaux ayant reçu 0,15 mg d'héparine. La patte mésothoracique gauche a été autotomisée 1 jour après l'injection (1^{ère} autotomie) et la droite 8, 15, 20 ou 35 jours après l'injection (2^{ème} autotomie). (Différences non significatives $p < 0,05$)

b • Conclusion

La figure 15 récapitule nos interventions pendant le stade IV et les résultats obtenus au stade V. Sur un même animal, la patte mésothoracique est autotomisée 1 jour après l'injection et la droite 8, 15, 20, 35 jours après l'injection.

Les moignons nécrosés en cours d'intermue ne sont pas pris en compte.

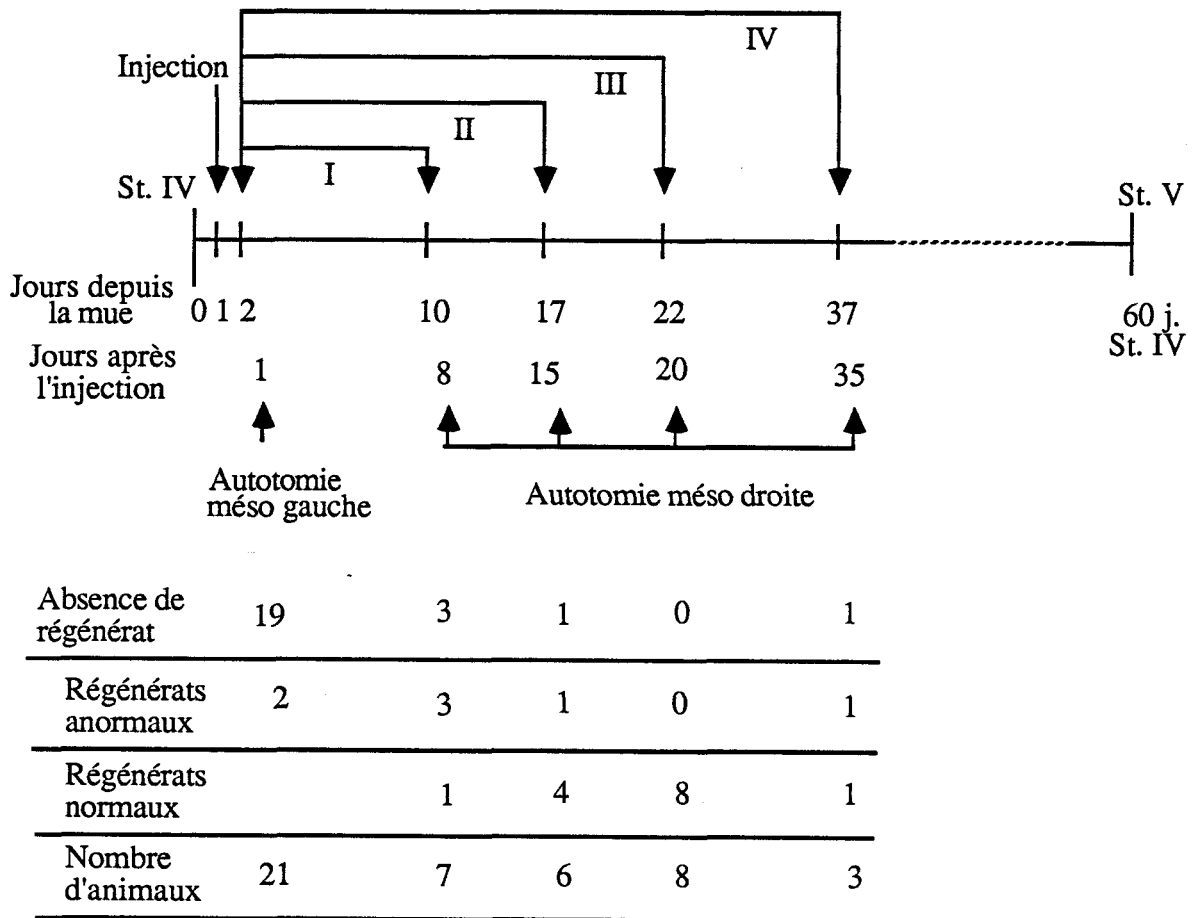


Fig.15. Résultats de l'injection de 0,15 mg d'héparine 1 jour après le passage des animaux en stade IV. Deux autotomies ont été provoquées: celle de la patte mésothoracique gauche, 1 jour après l'injection; celle de la patte mésothoracique droite, 8, 15, 20 et 35 jours après l'injection.

La durée de l'intermue est triplée quel que soit le moment de la deuxième autotomie (Tabl. XI). Si l'autotomie est provoquée 20 jours après l'injection, tous les régénérats sont normaux. Si elle est provoquée 1, 8, 15 jours après l'injection, plus elle est proche de l'injection, moins les régénérats sont normaux (Tabl. X). La durée d'action de l'héparine, comme pour la série précédente, se situe entre 15 et 20 jours. Cependant, si l'autotomie est provoquée 35 jours après l'injection, nous n'avons plus comme à 20 jours 100% de régénérats normaux.

Lorsque la régénération n'a pas eu lieu au stade V, généralement, un petit régénérat apparaît au stade VI.

3 . Conclusion

En conclusion, il apparaît que :

- la durée de l'intermue est allongée.
- plus l'autotomie est proche de l'injection, moins les régénérats sont normaux. Les effets de l'héparine sont observés au niveau de la cicatrisation mais aussi de la formation du régénérat.
- un seuil se situe entre 15 et 20 jours puisque si les autotomies sont pratiquées 15 jours après l'injection, les régénérats ne sont pas tous normaux alors que 20 jours après l'injection, tous les régénérats sont normaux.

IV - DISCUSSION et CONCLUSION

Des deux types d'injections pratiquées, dans le moignon coxo-trochantérien et dans le corps de l'animal, seule l'injection dans le corps de l'animal a une action sur la cicatrisation et la régénération.

Dans un premier temps, nous discuterons de l'efficacité de l'héparine, dans un deuxième temps de son action sur la durée de l'intermue, puis dans un troisième temps de son action sur la morphogenèse régénératrice.

1. Efficacité de l'héparine

L'injection de 2 µg d'héparine dans le moignon coxo-trochantérien a été sans effet sur la cicatrisation et la morphologie du régénérat. Les différentes doses injectées dans le corps de l'animal ont entraîné peu de perturbations. Chez les Vertébrés, l'héparine a une action anticoagulante tant *in vivo*, qu'*in vitro* et la posologie quotidienne est de 500u/Kg (LECHAT et col, 1982). Comparativement, nos doses sont énormes : 100 000 u/Kg (0,05 mg/animal) à 1.000.000 u/Kg (0,5 mg/animal). Il nous est malheureusement impossible de comparer avec la dose de 8 mg/animal utilisée par BOHN (1976), puisque ce dernier ne précise pas le poids des blattes injectées.

2. Action de l'héparine sur la durée de l'intermue

Des autotomies naturelles allongent la durée de l'intermue de façon discrète et sans commune mesure avec les allongements provoqués par l'injection. En effet, la dose la plus forte perturbe

complètement le cycle de mue puisque tous les animaux meurent deux mois après l'injection sans avoir mué. Avec les autres doses, la durée de l'intermue est doublée lorsqu'une seule patte est autotomisée et triplée lorsque plusieurs pattes sont enlevées. Injectée dans la circulation générale, l'héparine perturbe donc la physiologie des animaux en cours d'intermue. Chez les Insectes, certains organes sont directement baignés par l'hémolymphe dont un des rôles est de transporter les hormones. L'héparine peut donc agir à différents niveaux : sur les organes en empêchant l'élaboration de certaines substances, sur le transport de ces substances, sur la réceptivité de certains tissus et sur l'action même des substances transportées. Nous reviendrons ultérieurement sur le problème du niveau d'action de l'héparine.

3. Action de l'héparine sur la morphogenèse régénératrice

L'injection d'héparine perturbe la cicatrisation et la formation du régénérat.

a. Effets sur la cicatrisation

En fonction des doses utilisées, l'aspect extérieur et l'aspect histologique du caillot diffèrent. Celui-ci se mélanise moins rapidement qu'un caillot normal. Il est très épais et les hémocytes restent vivants plus longtemps sous la croûte.

Plus la dose injectée est forte, plus la cicatrisation est retardée.

Les bords de l'épiderme qui vont se rejoindre n'ont pas l'aspect d'un épiderme en migration, les cellules ne sont pas aplaties. Les hémocytes situés dans l'axe médian du moignon coxo-trochantérien demeurent arrondis très longtemps ; beaucoup de matériel colorable par le bleu alcian se trouve entre eux.

Nos observations, comme celles de BOHN (1976), montrent un effet inhibiteur sur la cicatrisation. Il faut cependant souligner que nous n'avons pas, à différents moments après l'injection, dosé l'héparine dans le sang et par conséquent, nous ne savons pas combien de temps l'héparine peut agir.

b. Effets sur la morphogenèse régénératrice

A la première mue post-opératoire, les anomalies de régénération observées se manifestent essentiellement par des déficiences :

- soit une déficience totale. Seule la cicatrisation a lieu. Le trochanter garde ses potentialités régénératrices puisque dans la majorité des cas, un régénérat normal apparaît à la 2ème mue post-opératoire ;
- soit une déficience partielle qui se traduit de différentes façons :

. tous les articles d'une patte sont présents, les déficiences se situent principalement au niveau du tibia, soit dorsalement, soit ventralement. Dans quelques cas, le tarse est perturbé.

. les régénérats obtenus sont très petits. Les parties distales sont les seules repérables, parfois même seul l'onychium est présent.

Dans certains cas, alors qu'au stade V, seule la partie distale était apparente, au stade VI, les faces ventrales du tibia et du fémur sont totalement absentes et le tarse est articulé sur le trochanter.

Ces cas semblent montrer que les parties distales apparaissent en premier, phénomène que nous avons mentionné lors de l'étude de la formation du régénérat. Pendant le stade V, première intermue post-opératoire, une régénération intercalaire proximo-distale se produit puisque au stade VI, les régénérats sont plus grands et les articles sont différenciés. Il faut cependant remarquer que certaines faces, en particulier les faces ventrales du fémur et du tibia, sont absentes ou déficientes et que par conséquent, la régénération est incomplète dans le sens transversal.

Des petites formations supplémentaires sont parfois apparues au niveau du trochanter, de l'extrémité tarsale ou dans la membrane articulaire tibio-tarsale. Ces formations n'ont pas évolué en appendice articulé; il nous est donc difficile d'affirmer qu'elles provenaient de véritables centres morphogénétiques surnuméraires.

Dans de nombreux cas, les régénérats ont une base de faible diamètre. De ce fait, la pression hémolympatique n'est pas suffisante pour un déploiement correct et une bonne irrigation de ces appendices.

Dans une intermue normale, d'environ 20 jours, si l'autotomie est pratiquée :

- dans le premier tiers de l'intermue, le régénérat est normal ;
- dans le dernier tiers, il n'y a pas de régénération ;
- dans le tiers central, le régénérat a une hauteur et un degré de différenciation variables compris entre le blastème et celui du régénérat différencié, cette dernière période est appelée période critique. Lorsqu'on injecte de l'héparine, la durée de l'intermue est d'environ 60 jours et la période critique semble reportée au delà du 20e jour. En effet, lorsque la patte est autotomisée à 20 jours, la régénération est normale tandis qu'à 35 jours, les régénérats ne sont pas tous normaux.

Dans la majorité des cas, la régénération a lieu normalement. Il semble donc que les potentialités des cellules ne soient pas perturbées au moment de la cicatrisation. Cependant, alors que la durée d'action de l'héparine se situe entre 15 et 20 jours, on remarque que plus l'autotomie est proche de l'injection, donc en début d'intermue, plus on note l'absence de régénération à la première mue post-opératoire.

Par conséquent, nous constatons que l'héparine inhibe momentanément la régénération d'une patte autotomisée en début d'intermue. Quels sont les mécanismes qui empêchent la régénération? est-ce une action sur les surfaces cellulaires, le métabolisme cellulaire, la physiologie de l'animal ?

L'héparine peut-elle agir sur les antigènes de surface des cellules épidermiques? En effet, chez la larve de *Blaberus*, BULLIERE (1985) suggère une relation entre le pouvoir de régénération et l'expression d'antigènes topospécifiques. Pour cet auteur, en début de cycle, lorsque les larves sont capables de régénérer, les antigènes sont exprimés selon une répartition très spécifique. Au contraire en fin de cycle, lorsque les larves ne sont pas capables de régénérer, la topospécificité des antigènes disparaît.

Chez les Vertébrés, il apparaît que l'héparine serait capable de se lier à une grande variété de protéines. KOHNKE-GODT et GABIUS (1989) ont purifié et caractérisé une lectine qui se lie à l'héparine. Par ailleurs, l'héparine fixée sur des colonnes de sépharose permet d'isoler le FGF (fibroblast growth factor). Il a été démontré également qu'*in vitro*, l'héparine interagit avec les facteurs de croissance pour inhiber la croissance des muscles squelettiques (KARDAMI et col., 1988). Toutefois, jusqu'alors, chez les Insectes et particulièrement chez la drosophile, seuls des homologues de l'EGF (epidermal growth factor) et du TGF- β (transforming growth factor- β) ont été mis en évidence (BRYANT, 1987). Il a également été établi que l'héparine agissait au niveau des membranes plasmiques en libérant des enzymes membranaires en particulier des lipases (BOULANGER et Col., 1979). HILL et col., (1987) ont aussi montré que l'héparine pouvait agir sur les systèmes de transduction intracellulaire de cellules de foie de rat, notamment en inhibant la libération de l'ion calcium induite par l'inositol triphosphate IP₃. Une modification de la transduction intracellulaire conduit à une perturbation de la phosphorylation des protéines et par la même à une perturbation des métabolismes cellulaires. Dans notre cas, nous ne savons pas à quel(s) niveau(x) métaboliques l'héparine agit, des recherches complémentaires seront nécessaires pour tenter d'expliquer les effets qu'elle a sur la durée de l'intermue et la morphogénèse.

La régénération allonge la durée de l'intermue. Certains auteurs ont donc recherché, en dosant

les ecdystéroïdes, une éventuelle perturbation du métabolisme des ecdystéroïdes responsables de la corrélation régénération-allongement de l'intermue (BULLIERE et col.(1979), MALEVILLE et DE REGGI (1981), ROBERTS et col.(1983), chez les Insectes ; HOARAU et HIRN (1980) chez les Crustacés). Les injections d'héparine ont-elles modifié la production d'ecdystéroïdes et ainsi perturbé le développement et la régénération ? Pour tenter de répondre à cette question, nous nous sommes intéressée aux ecdystéroïdes présents chez ces animaux.

LES ECDYSTEROIDES



Chez les Insectes, les premières hormones stéroïdes isolées furent l'ecdysone (BUTENANDT et KARLSON, 1954) et la 20-hydroxyecdysone (20-OH-E ou β -ecdysone ; KARLSON, 1956). Cette dernière fut considérée comme l'hormone de mue. Actuellement, une centaine de composés différents sont identifiés et constituent la famille des ecdystéroïdes (KOOLMAN, 1982). Les nombreux travaux sur le rôle des hormones ecdystéroïdes montrent qu'elles contrôlent les sécrétions cuticulaires, les processus physiologiques impliqués dans la croissance, la différenciation et la morphogenèse des Arthropodes.

Des dosages radio-immunologiques ont été réalisés afin de déterminer les taux d'ecdystéroïdes présents chez nos animaux.

I - MATERIEL ET METHODE

A - Matériel biologique

Trois lots d'animaux, tous en stade IV, ont été sélectionnés.

lot 1 : Lot de référence. 2 animaux sont prélevés chaque jour, depuis le jour du passage en stade IV (jour 0) au jour 13. Pour ces animaux, placés à une température élevée, la durée moyenne de l'intermue est de 14 jours.

lot 2 : Animaux autotomisés. Chez ces animaux, la patte mésothoracique gauche, autotomisée 4 jours après leur passage au stade IV, est en régénération. Deux animaux sont prélevés tous les deux jours, du jour 6 au jour 20 et également au jour 25. La durée de l'intermue des animaux en régénération est de 26 jours alors que celle des animaux non amputés est de 20 jours dans ces conditions.

lot 3 : Animaux injectés et autotomisés. Ces animaux reçoivent chacun 0,1 mg d'héparine au jour 3 et leur patte mésothoracique gauche est autotomisée au jour 4. Deux animaux sont prélevés tous les deux jours, du jour 6 au jour 38. Pour ces animaux, placés dans les mêmes conditions d'élevage que le lot 2, la durée de l'intermue est de 53 jours.

B . Etude histologique

Des coupes histologiques colorées au trichrome de Masson ont été réalisées :

- à partir de fragments mésothoraciques, pour le lot 1, afin d'apprécier l'évolution de la cuticule,

- sur les moignons coxo-trochantériens, pour les lots 2 et 3, afin de suivre la formation du régénérat.

C . Dosage des ecdystéroïdes

1 . Extraction des ecdystéroïdes (Fig. 16)

Les dosages sont réalisés sur des animaux entiers. Chaque animal est pesé avant l'extraction.

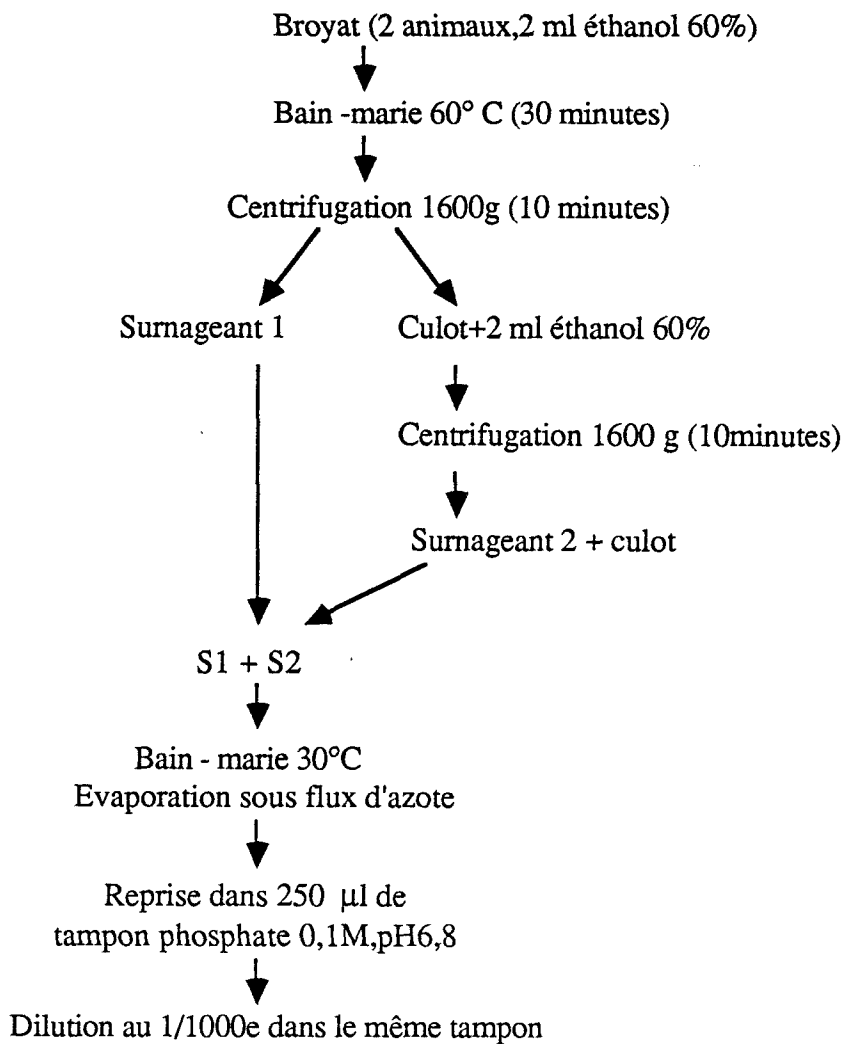


Fig. 16. Schéma de la méthode d'extraction des ecdystéroïdes.

2. Dosage radio-immunologique (RIA)

Le dosage utilisé est basé sur la compétition entre deux antigènes vis-à-vis d'un anticorps spécifique : un antigène marqué par l'iode 125 et un antigène froid contenu dans l'échantillon à doser (DE REGGI et col., 1975).

La technique a été réalisée avec des tubes "coâtés" provenant de chez Immunotech, réf. 0490, et un Ag-I¹²⁵ (don du Dr DE REGGI). La spécificité de l'anticorps monoclonal anti 20-OH-E est très élevée (constante de dissociation pour la 20-OH-E, $10^{-9}M$). Cet anticorps reconnaît la 20-OH-E 50 fois mieux que l'ecdysone. Néanmoins, l'inokostérone, l'ecdysone et plusieurs métabolites proches de ces hormones sont très bien "reconnus" par l'anticorps.

Le mode opératoire est récapitulé dans la figure 17.

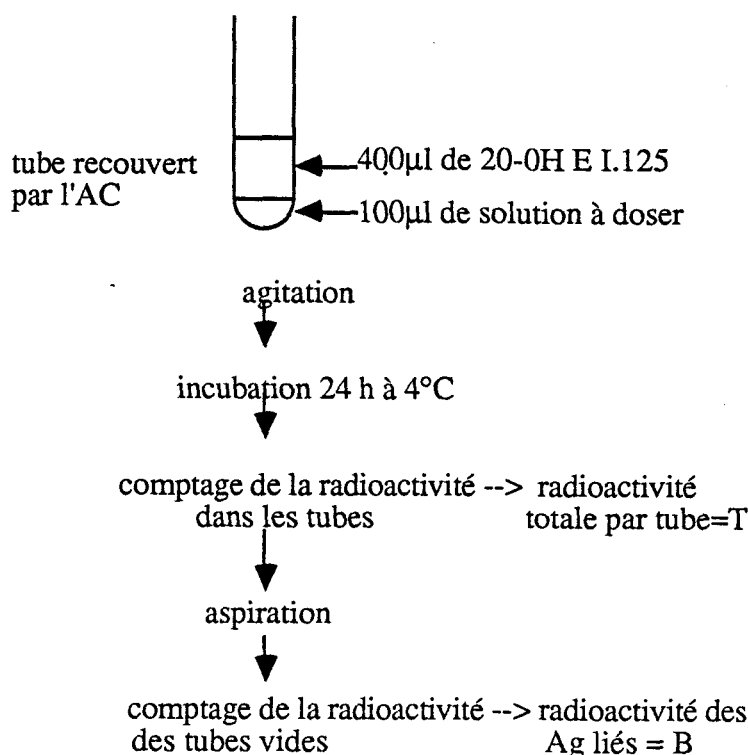


Fig. 17. Représentation schématique de la technique de dosage radio-immunologique

Dans un premier temps, une courbe de référence de la 20-OH-E (Sigma) est établie graphiquement en construisant la courbe $B/T = f(\log(C))$, C étant la concentration molaire de la 20-OH-E qui s'échelonne de $10^{-12} M$ à $10^{-5} M$. Dans un deuxième temps, les taux d'ecdystéroïdes présents dans nos échantillons sont exprimés en équivalence de 20-OH-E par

animal (analyse informatisée des résultats, programme élaboré et donné par le Dr NIRDE, Institut Pasteur).

II - RESULTATS

A. lot 1 : Animaux normaux

Les taux d'ecdystéroïdes observés chez les animaux, pendant l'intermue qui est de 14 jours, sont récapitulés dans le tableau XII et la figure 18.

Jour du stade IV	ng/animal	ng/mg
0	298	5,5
1	60	1,1
2	53	0,8
3	191	2,1
4	96	1,1
5	375	4
6	6000	58,2
7	1062	10,7
8	2280	20,3
9	1620	14,5
10	1800	16,5
11	600	5,7
12	660	6,2
13	780	7,6

Tableau XII : Taux d'ecdystéroïdes exprimés en ng de 20-OH-E équivalents par animal ou par mg de poids frais.

Au cours de l'intermue, le poids des animaux augmente jusqu'au jour 8 (50 à 110 mg) puis diminue jusqu'à l'exuviation (110 à 100 mg).

Le dosage des ecdystéroïdes totaux chez des animaux qui n'ont subi aucune injection ni autotomie révèle la présence d'un pic majeur qui se situe à la fin de la première moitié de l'intermue, juste après la période critique, moment où l'autotomie n'est pas suivie d'une régénération. Le taux d'ecdystéroïdes est très élevé, 6000 ng de 20-OH-E eq par animal.

Les moments de l'apolyse et de l'apparition de la nouvelle cuticule ont été appréciés sur des coupes histologiques de mésothorax.

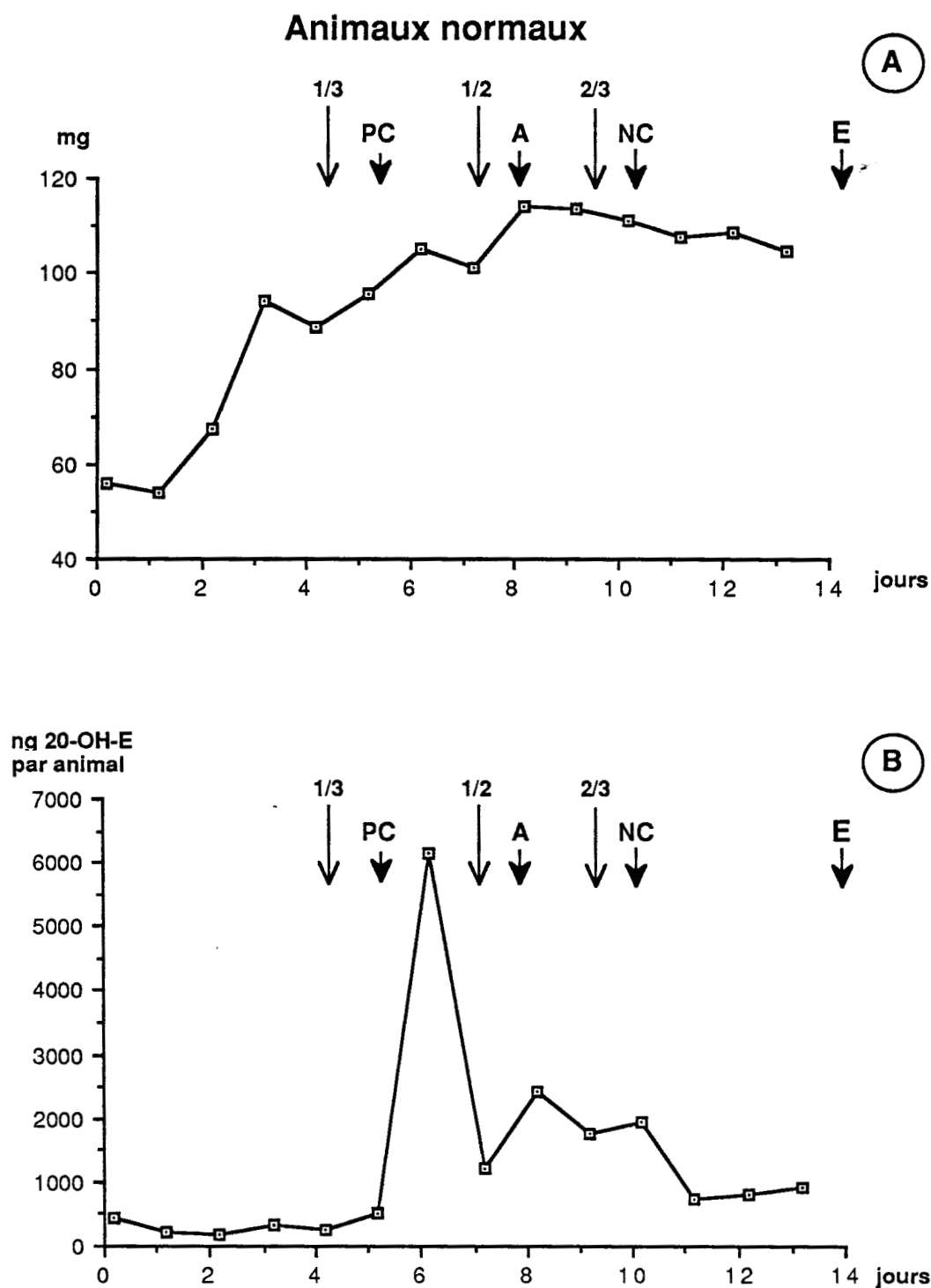


Fig.18 . Evolution du poids (A) et des taux d'ecdystéroïdes (B) au cours du stade IV (animaux normaux). Les résultats sont exprimés en milligrammes (mg) et en nanogrammes de 20-hydroxyecdysone équivalents par animal (ng 20-OH-E par animal). A , apolyse ; E , exuviation ; NC , apparition de la nouvelle cuticule ; PC , période critique ; 1/3 , 1/2 , 2/3 , moments dans l'intermue

B. Lot 2 : Animaux autotomisés

Les variations des taux d'ecdystéroïdes, chez des animaux autotomisés 4 jours après leur passage en stade IV, sont récapitulées dans le tableau XIII et la figure 19.

Jour du Stade IV	ng/Animal	ng/mg
6	300	3,5
8	216	2,5
10	348	3,6
12	270	2,6
14	840	8,8
16	1500	16,8
18	960	9,6
20	7800	75,7
25	132	1,2

Tableau XIII : Variations du taux d'ecdystéroïdes chez des animaux où l'autotomie a été provoquée au jour 4 (ng de 20-OH-E équivalents par animal ou par mg de poids frais).

Chez ces animaux la durée de l'intermue a été de 26 jours.

L'allure générale de la courbe de prise de poids des animaux autotomisés est différente de celle des témoins. Le poids de ces animaux est toujours inférieur à celui des animaux normaux. Les animaux qui subissent une autotomie semblent quelque peu perturbés puisque dans les 4 jours qui suivent, le poids de ces animaux n'augmente pas.

L'évolution du régénérat, appréciée sur les coupes histologiques de moignons prélevés avant le dosage, est la suivante : au jour 8, le régénérat est en phase 2 (avant la fin du 1/3 de l'intermue); au jour 12, le régénérat est en phase 4 (avant la fin de la 1/2 de l'intermue) ; au jour 15, le régénérat est en phase 5 (au début de la deuxième partie de l'intermue) ; au jour 18, le régénérat est en fin de phase 6.

Le dosage des ecdystéroïdes révèle un pic majeur (7800 ng de 20-OH-E Eq par animal) qui se situe à 20 jours, soit dans le dernier tiers de l'intermue. A ce moment, la nouvelle cuticule du régénérat apparaît.

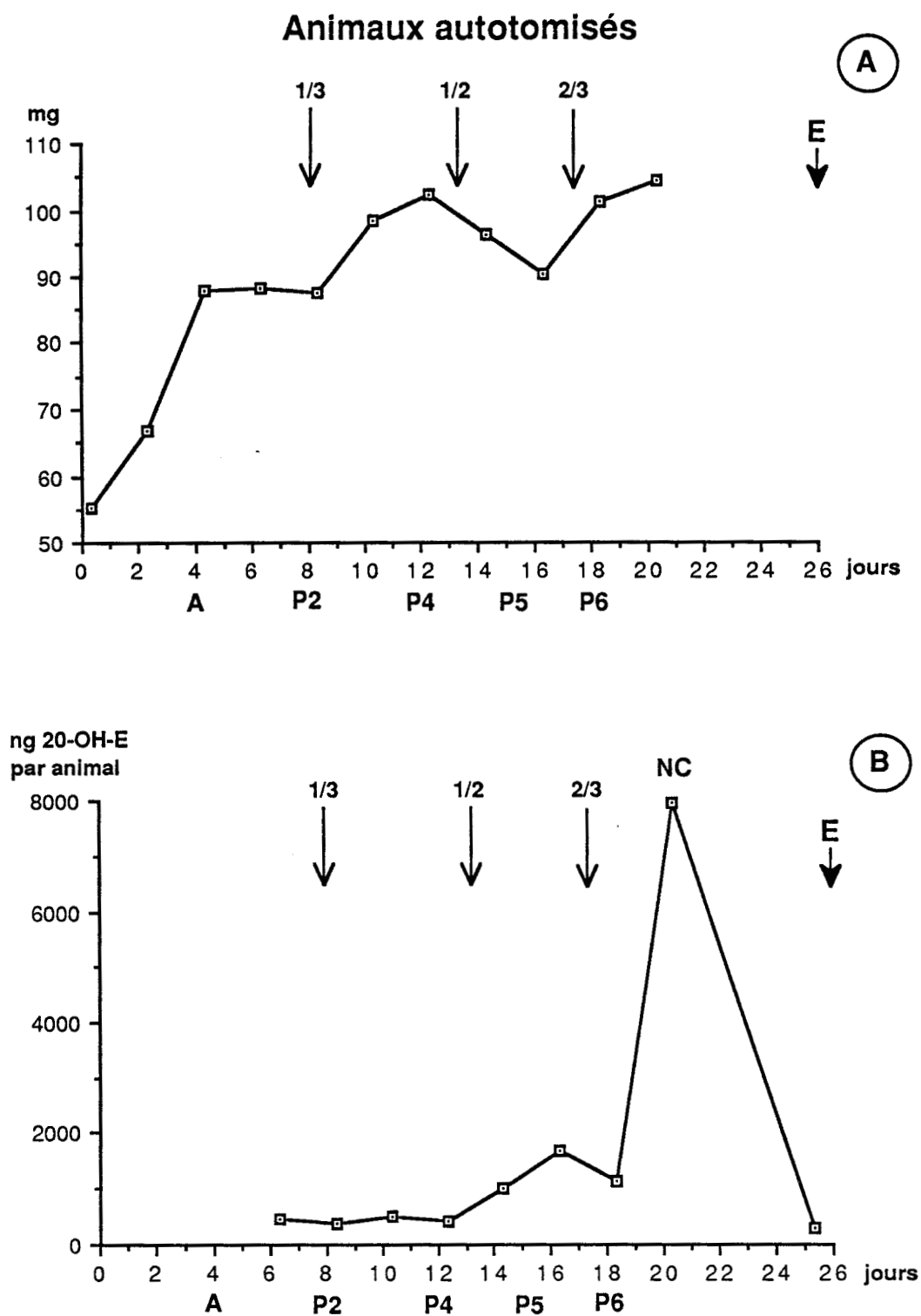


Fig.19. Evolution du poids (A) et du taux des ecdystéroïdes (B) au cours du stade IV d'animaux autotomisés au jour 4 (lot 2). Les résultats sont exprimés en milligrammes (mg) et en nanogrammes de 20-hydroxyecdysone équivalents par animal (ng 20-OH-E par animal). A , autotomie ; E , passage en stade V ; NC , nouvelle cuticule ; P2 , P4 , P5 , P6 , différentes phases du régénérat ; 1/3 , 1/2 , 2/3 , moments dans l'intermue .

C. Lot 3 : Animaux injectés et autotomisés

Les variations du taux des ecdystéroïdes, observées chez des animaux en stade IV ayant reçu de l'héparine au jour 3 et autotomisés au jour 4, sont récapitulées dans le tableau XIV et la figure 20.

Jour du stade IV	ng/animal	ng/mg
6	144	1,9
8	114	1,9
10	211	3,1
12	ND	ND
14	44	0,7
16	ND	ND
18	38	0,6
20	108	1,6
22	57	0,7
24	138	1,7
26	240	3,3
28	186	1,9
30	600	7,2
32	186	1,6
34	396	3,6
36	840	7,7
38	1080	9

Tableau XIV : Variation du taux d'ecdystéroïdes exprimé en ng 20-OH-E équivalents par animal ou par mg de poids frais chez des animaux ayant reçu de l'héparine au jour 3 et dont l'autotomie a été provoquée au jour 4 (ND, non détectable).

Chez ces animaux, la durée de l'intermue est de 53 jours. L'allure générale de la courbe de prise de poids est très différente de celle des animaux normaux ou simplement autotomisés. Après l'autotomie et jusqu'au jour 28, les animaux perdent jusqu'au 1/3 de leur poids .

La cicatrisation est longue (20 jours) et un régénérat en phase 2 n'est visible qu'au jour 28, soit 8 jours après la cicatrisation et 24 jours après l'autotomie.

Aux jours 6, 8, 10, le taux des ecdystéroïdes des animaux injectés et autotomisés est sensiblement égal à celui des animaux normaux. Ensuite, contrairement aux deux autres séries expérimentales, le taux reste faible. Ce n'est qu'au début du dernier tiers de l'intermue que le taux d'ecdystéroïdes s'élève de façon sensible (1080ng de 20-OH-E eq par animal). Il ne semble pas s'agir d'un problème de croissance des animaux puisqu'au jour 32 ils ont déjà atteint leur poids maximum.

La maintenance des animaux étant problématique, aucun dosage n'a été effectué depuis le jour 40 jusqu'à l'exuviation. Cependant, les résultats montrent une amorce d'augmentation du taux des ecdystéroïdes et la mue ayant lieu, on peut penser que le pic va apparaître dans cette dernière partie de l'intermue avec un décalage plus prononcé que chez les animaux autotomisés.

Animaux injectés et autotomisés

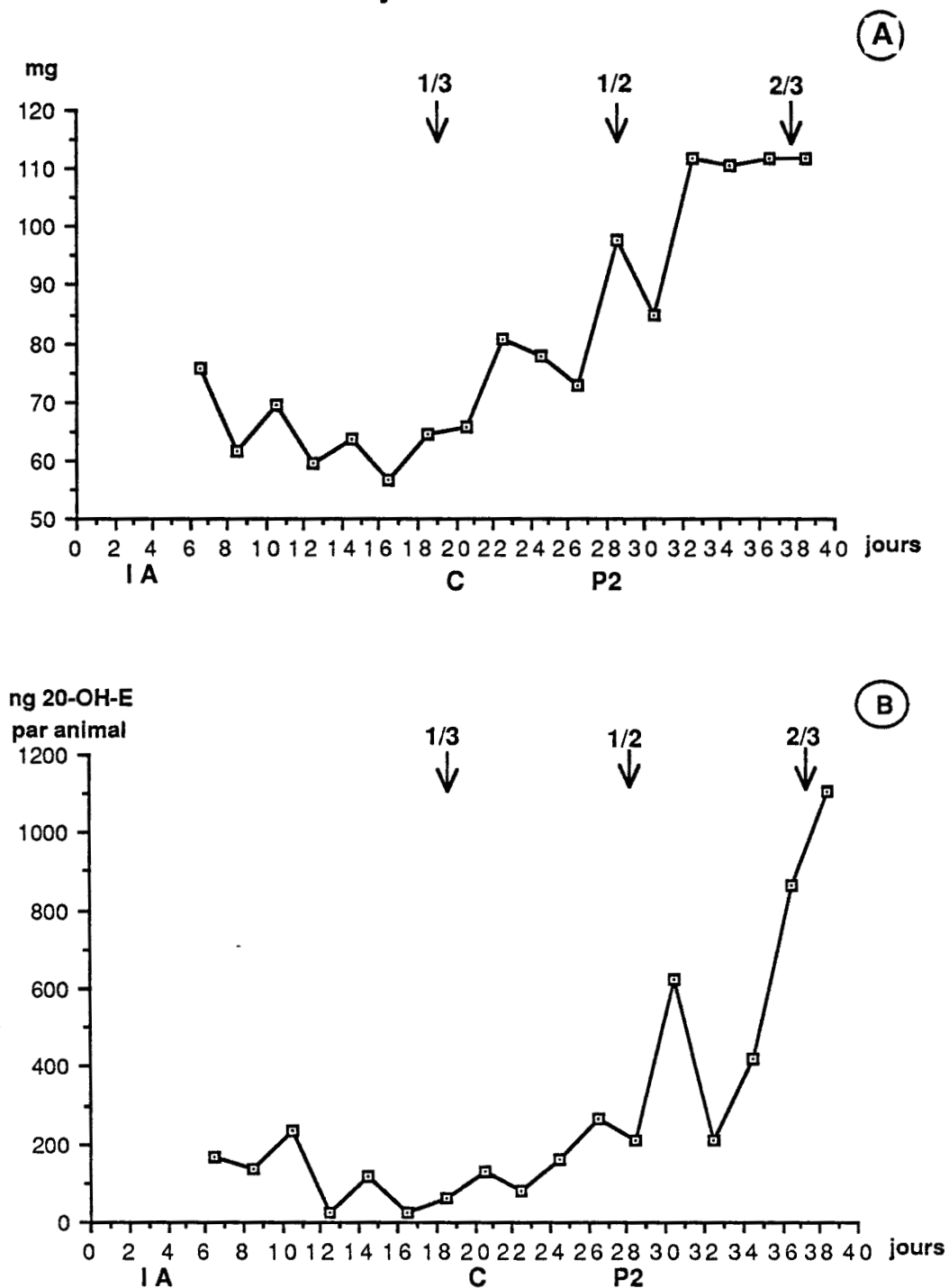


Fig. 20. Evolution du poids (A) et des taux d'ecdystéroïdes (B) au cours du stade IV d'animaux ayant reçu une injection d'héparine au jour 3 et autotomisés au jour 4 (lot 3). Les résultats sont exprimés en milligrammes (mg) et en nanogrammes de 20-hydroxyecdysone équivalents par animal (ng 20-OH-E par animal). A, autotomie ; C, cicatrisation ; I, injection d'héparine ; P2, phase 2 du régénérat ; 1/3, 1/2, 2/3, moments dans l'intermue.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Chez les Insectes, comme chez les Crustacés (HOPKINS, 1988) :

- une privation de nourriture (MALA' et col., 1987),
- une diminution de la température,
- une simple blessure (MADHAVAN et SCHNEIDERMAN, 1969 ; Mc CALEB et KUMARAN, 1980 ; MALEVILLE et DE REGGI, 1981 ; MALA' et col., 1987),
- une amputation (STOCK et O'FARRELL, 1954 ; O'FARREL et col., 1956 ; URVOY, 1963 ; POHLEY, 1965 ; LENDER et GROPOCOPATELLI, 1967 ; BULLIERE, 1968),
- l'ablation de disques imaginaux (MALA' et col., 1987),
- l'injection de substances comme le bleu trypan, le saccharate de fer, l'encre de chine (WIGGLESWORTH, 1955), l'azadirachtine (SIEBER et REMBOLD, 1983 ; SCHLÜTER et col., 1985 ; CASSIER et col., 1988 ; SUBRAHMANYAN et col., 1989), peuvent entraîner une augmentation de la durée de l'intermue.

Pour O'FARREL (1960) l'amputation avait comme effet de faire repartir l'intermue à zéro (resetting the clock). MALA' et col., 1987, relie l'augmentation de la durée de l'intermue au temps que nécessite la régénération. Cependant, le système endocrine qui règle le développement semble affecté par les facteurs d'environnement. Dans notre cas, une relation apparaît entre la sécrétion endocrine et la régénération ou l'injection d'héparine. Aussi, dans un premier temps, discuterons-nous des ecdystéroïdes puis, dans un deuxième temps, des voies d'action possibles de l'héparine sur le développement des animaux.

1. Les ecdystéroïdes

Les résultats obtenus, pour les trois séries expérimentales, sont récapitulés dans la figure 21.

a . Les pics d'ecdystéroïdes

1 . Animaux normaux

Chez de nombreuses larves d'Insectes, on note la présence de deux pics d'ecdystéroïdes : un majeur et un mineur (BORST et O'CONNOR, 1974 ; LAFONT et col., 1975 ; BOUTHIER et col., 1975 ; BOLLENBACHER et col., 1975 ; MORGAN et POOLE, 1976 ; DELBECQUE et col., 1978 ; PORCHERON, 1979). Nous n'observons qu'un seul pic net. Il se situe peu après la période critique et, comme chez la blatte, (BULLIERE et BULLIERE, 1985) semble correspondre à une intense activité mitotique des cellules épidermiques.

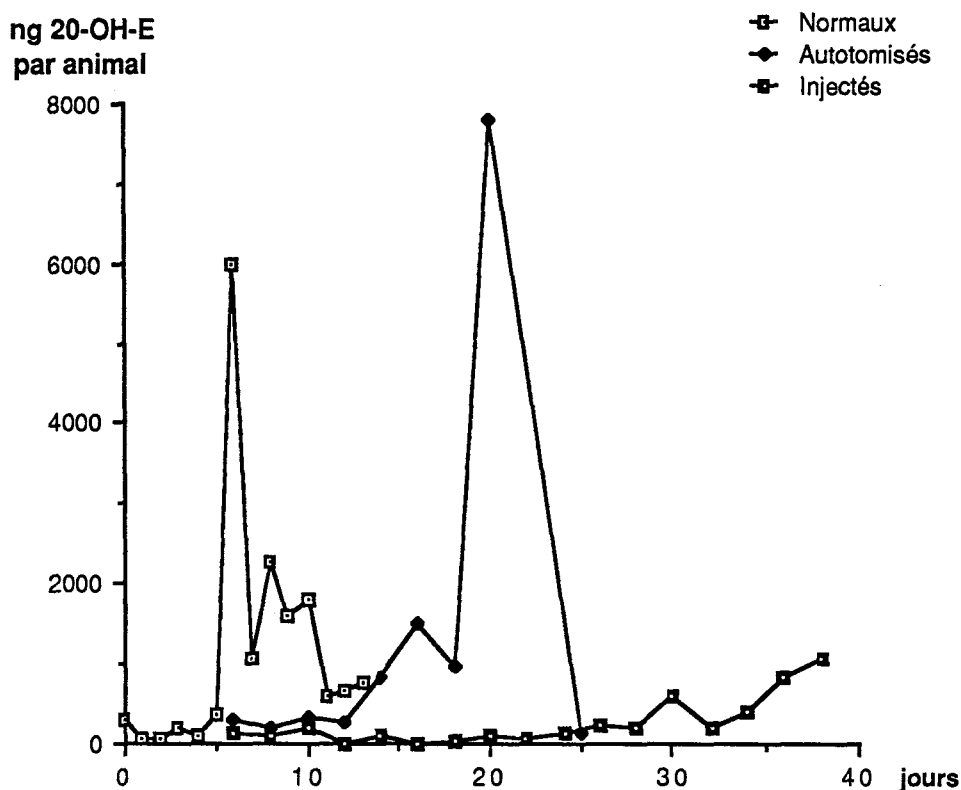


Fig. 21. Variations des taux d'ecdystéroïdes au cours du stade IV d'animaux normaux, autotomisés au jour 4 ou ayant reçu de l'héparine au jour 3 et autotomisés au jour 4. Les taux sont exprimés en nanogrammes de 20-hydroxyecdysone équivalents par animal (ng 20-OH-E par animal).

2. Animaux autotomisés

Chez ces animaux, un pic majeur se situe dans la deuxième moitié de l'intermue. Comme chez le grillon (MALEVILLE et DE REGGI, 1981) et la blatte (ROBERTS et col., 1983 ; BULLIERE et BULLIERE, 1985), la régénération semble perturber le taux des ecdystéroïdes. Chez le grillon, MALEVILLE et DE REGGI (1981) ont montré que de simples blessures n'influencent pas la production d'ecdystéroïdes. Chez *Rhodnius*, le taux des ecdystéroïdes diminue temporairement puis redevient normal sans qu'il y ait de décalage dans le temps (KNOBLOCH et STEEL, 1988). Il faut également remarquer, que chez cet animal, contrairement aux phasmes, l'amputation d'une patte avant la période critique ne modifie pas la longueur de l'intermue.

Pour BODENSTEIN (1955), HOARAU et HIRN (1981), une concentration minimale d'ecdystéroïdes hémolympatiques est nécessaire pour que la régénération ait lieu. Notons que, contrairement à ces auteurs, nous avons dosé les ecdystéroïdes tissulaires et hémolympatiques et pas seulement les ecdystéroïdes hémolympatiques. Dans notre cas, la régénération débute

rapidement après l'amputation et se poursuit jusqu'à la phase 5 avec un taux d'ecdystéroïdes faible.

3 . Animaux injectés et autotomisés

Chez ces animaux, la durée de l'intermue est considérablement augmentée et la cicatrisation, comme l'indique l'histologie, est très longue (16 jours au lieu de 2 jours chez les animaux autotomisés). Aucun pic, comparable aux deux cas précédents n'est observable. Cependant, comme l'indique l'histologie, la régénération a débuté. Dans ce cas, l'absence de cicatrisation semble seule responsable du retard de régénération puisque, nous l'avons vu précédemment, chez les animaux seulement autotomisés, la régénération a lieu malgré un faible taux d'ecdystéroïdes .

Nous n'avons pas prolongé nos dosages pendant le troisième tiers de l'intermue et il nous est donc impossible de conclure quant à l'apparition des pics. Il faut cependant noter une augmentation du taux d'ecdystéroïdes au début du dernier tiers de l'intermue et le profil évoque celui obtenu chez les animaux autotomisés. La seule injection d'eau distillée dans le moignon de patte de *Rhodnius* diminue le taux des ecdystéroïdes mais, contrairement aux phasmes, le taux redevient normal très rapidement (KNOBLOCH et STEEL, 1981)

b . Taux d'ecdystéroïdes

Les taux d'ecdystéroïdes trouvés sont plus élevés que ceux habituellement décrits dans la littérature (DEAN et al, 1980). Chez nos larves de stade IV, le pic le plus élevé a un titre environ 34 fois supérieur à celui obtenu par FOURNIER (1985) chez l'embryon de dernier stade (1500ng/g). DESCAMPS (communication personnelle), qui a utilisé la même technique d'extraction et de dosage chez *Lithobius forficatus* , obtient également des taux nettement supérieurs à ceux habituellement décrits. Très récemment, des taux élevés (3000 à 30000 pg/ μ l d'hémolymphe) ont été décrits chez la puppe d'*Ostrinia nubilalis* , résultats obtenus avec la technique RIA (GELMAN et col., 1988).

Le taux des ecdystéroïdes reste faible pendant que le régénérat se forme. Ceci est en accord avec l'effet inhibiteur de l'hormone de mue sur la régénération des appendices: MADHAVAN et SCHNEIDERMAN (1969) pour les disques imaginaux de *Galleria*, BULLIERE et BULLIERE (1971) pour les pattes embryonnaires de *Blabera* et BULLIERE (1972a) pour les pattes larvaires.

Chez les animaux autotomisés, le taux d'ecdystéroïdes est plus élevé que chez les animaux normaux. Chez *Blattella*, le taux d'ecdystéroïdes est doublé chez les animaux amputés (ROBERTS et col., 1983). Ceci est à rapprocher du fait que les organes, où les divisions cellulaires sont abondantes, produisent plus d'ecdystéroïdes (DELACHAMBRE et col., 1984).

2. Action de l'héparine

Le développement des Insectes est sous un contrôle endocrine que peuvent moduler des modifications de l'environnement. Lorsqu'on reprend le schéma classique du contrôle hormonal de la mue et de la métamorphose chez les Insectes proposé par FUKUDA (1940) (revue de GILBERT, 1974) (Fig. 22) et que l'on sait que les organes représentés sont baignés par l'hémolymphe, plusieurs voies d'action de l'héparine sont envisageables : sur l'hormone de mue, l'hormone juvénile, l'hémolymphe.

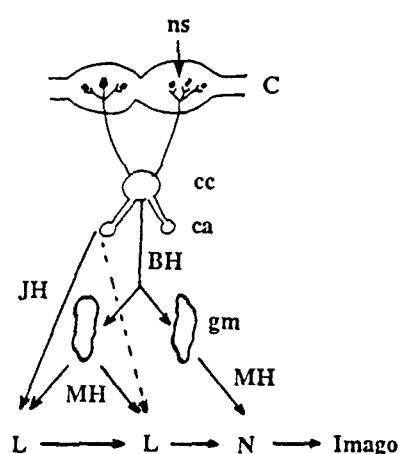


Fig. 22. Schéma classique du contrôle hormonal de la mue et de la métamorphose chez les Insectes. c , cerveau ; c a , corpora allata ; c c , corpora cardiaca ; g m , glande de mue ; n s , cellules neurosecrétrices ; B H , brain hormone ; J H , hormone juvénile ; M H , hormone de mue ; I , imago ; L , larve ; N , nymphe .

a . Hormone de mue

Nous avons précédemment évoqué le problème du taux des ecdystéroïdes chez les animaux ayant reçu de l'héparine. Les animaux présentent simultanément un faible taux d'ecdystéroïdes et une perte de poids. Chez les Hémiptères et les Lépidoptères, NIJHOUT (1981) a démontré qu'un poids (ou une taille) seuil est nécessaire mais insuffisante pour que la mue ait lieu . Ceci est aussi vrai chez nos animaux qui, bien qu'ayant atteint leur poids maximum, n'ont pas mué. Nous n'avons pas cherché à voir si l'injection d'héparine avait une incidence sur le comportement alimentaire des animaux, mais il a été démontré chez les Insectes que les modifications du taux des ecdystéroïdes et même leur suppression était sans rapport avec le jeûne (SIEBER et REMBOLD, 1983).

Par ailleurs, les ecdystéroïdes se conjuguent avec l'acide glucuronique (KOOLMAN, 1982). Or, l'acide glucuronique est un composant de l'héparine. Il est donc possible que l'héparine, en se conjuguant aux ecdystéroïdes, diminue ou supprime leur action.

La synthèse et la sécrétion de l'hormone de mue est déclenchée par l'hormone prothoracotrope (PTTH). Chez *Rhodnius*, KNOBLOCH et STEEL (1988) ont montré que l'injection de térodotoxine dans un tibia amputé prolonge la période de faible taux d'ecdystéroïdes qui suit l'amputation. Dans ce cas, l'augmentation du taux des ecdystéroïdes correspond à une reprise de l'activité électrique des corps cardiaques indiquant que la PTTH est nécessaire pour retrouver un taux normal d'ecdystéroïdes. SUBRAHMANYAM et col., 1989, ont montré que les corps cardiaques étaient affectés par l'injection d'azadirachtine, substance qui modifie le taux d'ecdysone (SIEBER et REMBOLD, 1983). Par ailleurs, la stimulation de la synthèse d'ecdysone par la PTTH est dépendante du calcium extracellulaire (SMITH et col., 1985). Les taux d'ecdystéroïdes étant modifiés par l'injection d'héparine, il faudrait rechercher si celle-ci agit sur la sécrétion de la PTTH ou sur le moment où se produit sa libération ou sur le moment où la glande de mue est réceptive à la PTTH.

b . L'hormone juvénile (JH)

L'hormone juvénile assure, au cours du développement post-embryonnaire, le maintien des caractères larvaires. Après une blessure, chez *Galleria*, elle se maintient à un taux élevé plus longtemps (BOGUS et col, 1986). Par ailleurs, selon SEHNAL (1981), la JH supprime l'activation spontanée des glandes prothoraciques qui sécrètent l'ecdysone. D'autre part, selon NIJHOUT et WILLIAMS (1974), NIJHOUT (1975), la libération de la PTTH, hormone qui agit sur la glande prothoracique, dépend d'une taille ou d'un poids critique mais aussi du taux de JH. Il conviendrait donc dans des recherches complémentaires de réaliser des dosages de JH pour apprécier son éventuel effet dans les perturbations du taux d'ecdysone.

c . L'hémolymphe

L'héparine agit sur les hémocytes, elle modifie leurs propriétés coagultrices (GREGOIRE, 1953, 1964) et leurs propriétés adhésives de surface (BOHN, 1976). Par ailleurs, l'injection de substances, telles que le bleu trypan, le saccharate de fer et l'encre de chine affectent les hémocytes et provoquent le retard de la mue (WIGGLESWORTH, 1955). Le rôle des hémocytes dans le système endocrine des Insectes n'est pas totalement élucidé (GUPTA, 1985). Pour WIGGLESWORTH (1956), les hémocytes transportent la "brain hormone" vers les glandes prothoraciques et d'autre part les plasmatocytes seraient le site majeur de la conversion de l'ecdysone en 20-OH-E et transporteraient cette hormone vers l'épiderme (1979).

Par ailleurs, TAKEDA (1977) a clairement démontré le rôle des hémocytes dans le transport des neurosécrétions du cerveau vers la glande prothoracique. Il est possible que l'héparine agisse sur les hémocytes mais elle peut agir aussi sur le plasma hémolympatique, puisque des protéines spécifiques apparaissent dans l'hémolymphe d'Insectes blessés et affectent le taux hormonal (LAUFER, 1960 ; BERRY et col., 1967 ; MAREK, 1969). En particulier, chez *Galleria mellonella*, des tissus en régénération produisent un facteur humoral capable d'agir sur le cerveau ou la glande prothoracique et d'augmenter la durée de l'intermue (MALA' et col., 1987).

En conclusion, l'injection d'héparine dans l'hémolymphe retarde la cicatrisation. Elle perturbe la régénération en particulier lorsque l'autotomie a lieu au début de l'intermue. Les régénérats obtenus présentent des déficiences totales ou partielles principalement des faces ventrales du tibia et du fémur. Elle retentit sur le poids des animaux et bien que notre étude ait été réalisée sur très peu d'animaux, il semble que le taux des ecdystéroïdes soit modifié.

CHAPITRE IV**INJECTION DE ROUGE DE RUTHENIUM**

L'étude du matériel de la chambre de régénération et de la surface apicale des cellules épidermiques du régénérat montre que de nombreux sites anioniques sont présents, en particulier au niveau des GAGs. Dans les matrices extracellulaires, les GAGs chargés négativement et les protéines qui leur sont associées, sont précipités par le rouge de ruthénium (HAY, 1981). L'injection de cette substance renforce la densité aux électrons du matériel de la chambre de régénération. Le rouge de ruthénium peut donc, tout au moins momentanément, neutraliser les charges négatives. En l'injectant, nous espérons modifier l'environnement immédiat du régénérat et la surface des cellules épidermiques de ce régénérat et de cette façon changer éventuellement l'information de position des cellules. Des injections témoins ont été réalisées afin de mieux apprécier l'effet des substances injectées.

I - INJECTION TEMOIN

Les solutions témoins injectées sont : du liquide physiologique pour *Carausius* (BART, non publié) ou du tampon Tris-HCl (pH7).

A l'aide d'un tube capillaire, 0,1 μ l de solution sont injectés dans la chambre de régénération à travers la membrane articulaire coxo-trochantérienne ventrale.

A la mue suivante, tous les animaux ont un régénérat dont la taille et l'aspect sont identiques à ceux d'un régénérat obtenu après une simple autotomie.

Chez les animaux qui ont reçu du tampon Tris-HCl, de très petites taches brunes sont parfois apparues, principalement au niveau du mésothorax. La fréquence d'apparition est sensiblement la même que pour nos animaux d'élevage soit environ 1 sur 10.

II - INJECTION DE ROUGE DE RUTHENIUM

A - Méthode

Nous avons injecté 0,1 μ l de solution de rouge de ruthénium dans la chambre de régénération d'un régénérat en début de phase 4 (rétraction au niveau des membranes articulaires coxo-trochantériennes). Le rouge de ruthénium, dissout dans du tampon Tris-HCl, pH7, a été utilisé aux doses suivantes :

10 mg/ml	soit	1	μ g/moignon
5 mg/ml	soit	0,5	μ g/moignon
2 mg/ml	soit	0,2	μ g/moignon
1 mg/ml	soit	0,1	μ g/moignon
0,5 mg/ml	soit	0,05	μ g/moignon
0,2 mg/ml	soit	0,02	μ g/moignon

Toutes les doses ont été injectées du côté ventral, la dose de 5 mg/ml (0,5 µg/moignon) l'a été également du côté dorsal.

B - Résultats (Tableau XV, page 125)

Quelle que soit la dose injectée, de grandes plages brunes apparaissent au niveau du thorax (méso et métathorax) et des premiers segments abdominaux. Nous reviendrons ultérieurement sur le problème de ces plages brunes.

Dans l'ensemble, la coxa et le trochanter se présentent comme ceux d'une patte qui a régénéré après une simple autotomie. Nous ne présenterons donc ici que la partie du régénérat située distalement par rapport à la structure coxo-trochantérienne.

1 . Rapports dose-réponse

a . 10 mg/ml (1 µg/moignon)

29 animaux ont survécu à l'injection, 5 seulement ont atteint le stade V. Chez ces animaux, il ne persiste que la moitié proximale de la coxa. La durée de l'intermue est considérablement allongée : $60,2 \pm 11,5$ jours. L'examen à la loupe binoculaire des moignons en cours d'intermue montre que:

- la chambre de régénération verdâtre semble remplie d'hémolymphe. Aucune nécrose n'est apparente.

- à la place du régénérat, on distingue un amas de cellules assez lâche. L'épiderme coxal est peu visible distalement, dans la zone moyenne, il se détache de la cuticule tandis que, tout à fait proximement, il ne s'en sépare pas.

- dans 4 cas, des régénérats atypiques sont présents; malheureusement, ces animaux n'ont pas exuvié. Chez deux d'entre eux, bien que la ligne de rétraction épidermique soit sensiblement au même niveau qu'au moment de l'injection, les régénérats, sans forme définie, présentent des excroissances (Fig. 23, 1).




Chez les deux autres animaux, alors que la ligne de rétraction épidermique a atteint la moitié de la coxa, les régénérats sont toujours droits (Fig. 23, 2).

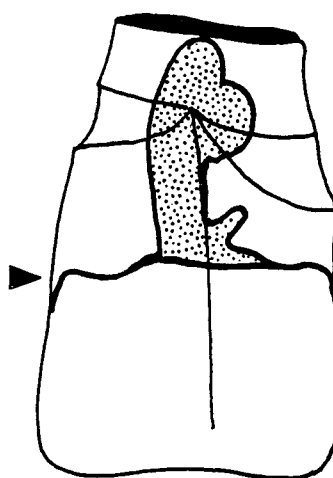
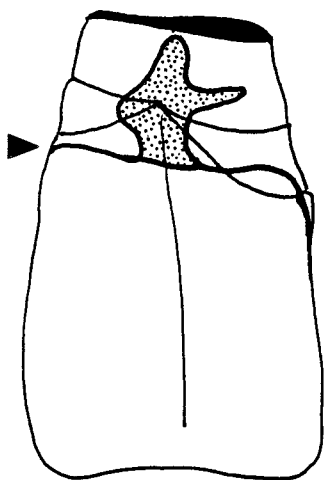
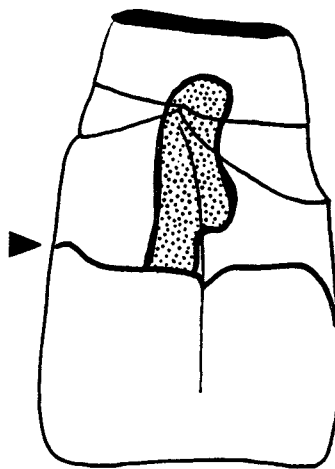
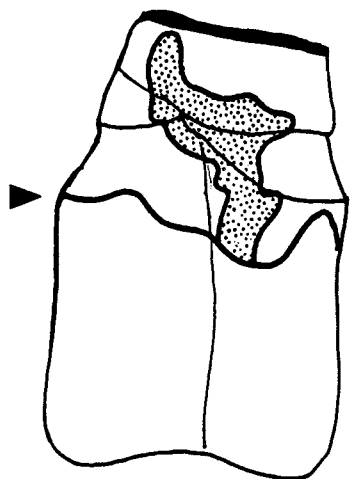
L'étude histologique des moignons montre que :

- un amas cellulaire qui ressemble à un bouchon cicatriciel se situe au-dessus de l'épiderme rétracté (Pl. XVI, 1); il arrive que cet amas soit creux en son centre (Pl. XVI, 2) et il nous est difficile de dire s'il s'agit de cellules sanguines apparues à la suite de lésions du régénérat ou s'il s'agit des cellules du régénérat qui se sont dissociées après l'injection ;

Figure 23

Résultats de l'injection de 1 µg de rouge de ruthénium dans la chambre de régénération de régénérats en phase 4.

Des régénérats atypiques sont visibles à l'intérieur des moignons (). Bien que la ligne de rétraction de l'épiderme coxal () soit sensiblement au même niveau qu'au moment de l'injection, les régénérats présentent des excroissances (1). Dans d'autres cas, la ligne de rétraction () a atteint la moitié distale de la coxa, cependant les régénérats sont encore droits (2).



1

2

- il n'y a pas de nécrose dans les moignons coxo-trochantériens, excepté au niveau de l'injection dans la chambre de régénération ;
- quand l'amas cellulaire a atteint la zone proximale du moignon, aucun matériel nouveau n'est apparu dans la chambre de régénération (Pl. XVI, 4) ;
- les cellules épidermiques du régénérat forment une couche très mince (Pl. XVI, 3) ;
- chez des animaux fixés très tardivement dans l'intermue, l'épiderme coxal en rétraction sécrète une cuticule (Pl. XVI, 4)

b . 5 mg/ml (0,5 µg/moignon)

Avec cette dose, que l'injection soit ventrale ou dorsale, les résultats obtenus au stade V sont semblables et ont été regroupés. La durée de l'intermue est de $32,3 \pm 4,1$ jours.

Dans la majorité des cas (66,6%), les régénérats manquent.

1 . Animaux sans régénérat (16 cas sur 24)

En cours d'intermue, les moignons apparaissent verdâtres mais dans les exuvies aucun vestige de nécrose n'est visible.

A la première mue post-opératoire, seule demeure la coxa dont la taille est celle d'une coxa témoin. Dans sa partie distale, les membranes articulaires sont réduites et la pigmentation est claire comme celle d'une coxa de patte régénérée ; dans sa partie proximale, cuticule et pigmentation sont celles d'une coxa témoin.

A la deuxième mue post-opératoire, la coxa garde l'aspect qu'elle avait à la mue précédente. En particulier, les membranes articulaires coxo-trochantériennes sont réduites voire absentes. Dans la moitié des cas, un très petit massif apparaît sans forme particulière à l'extrémité distale de la coxa.

2 . Animaux avec régénérat (8 cas sur 24)

Sur les 8 animaux obtenus :

- 2 régénérats bien que petits ont une organisation et une différenciation normales.
- 6 présentent des déficiences plus ou moins importantes et sont, soit segmentés (2 cas), soit totalement atypiques (4 cas). Chez ces animaux, la coxa modifiée distalement ne récupère pas une allure normale à la mue suivante.

x) régénérats segmentés (2 cas)

Chez l'un (injection ventrale), la face ventrale est déficiente au niveau du fémur, du tibia et du tarse. Au niveau du tarse, seul l'onychium est bien visible. Les membranes articulaires sont présentes uniquement sur la face dorsale (Fig. 24, 1). Au stade VI, le régénérat s'est redressé, le fémur est bien développé, le tibia et le tarse sont toujours mal individualisés.

Figure 24

Résultats de l'injection de 0,5 µg de rouge de ruthénium dans la chambre de régénération de régénérats en phase 4.

1 - Injection ventrale. Au stade V, le régénérat présente une déficience ventrale du fémur, du tibia et du tarse. Les membranes articulaires ne sont visibles qu'au niveau de la face dorsale.

2 - Injection dorsale. Au stade V, le fémur est court et harmonieux, mais le tibia et le tarse présentent une déficience ventrale postérieure. Le tarse non segmenté ne possède qu'une griffe.

3 - Le mamelon, présent au stade V (**a**), a donné au stade VI une tigelle courte et non segmentée (**b**).

4 - Un régénérat aux articles non identifiables possède une face ventrale dépigmentée et une face dorsale dont certaines zones sont très pigmentées.

C, coxa; d, face dorsale ; F, fémur ; p, face postérieure ; Ta, tarse ; Ti, tibia ;
v, face ventrale.

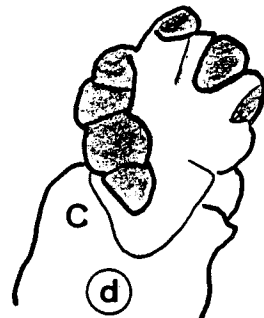
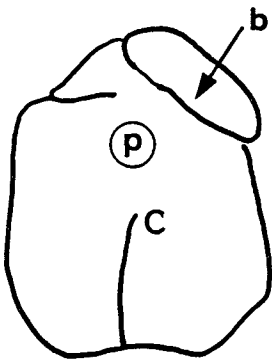
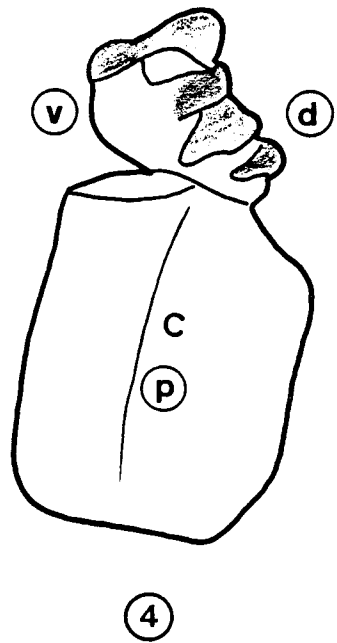
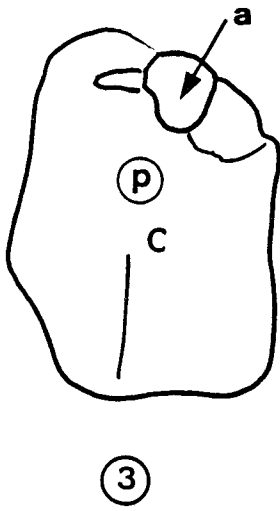
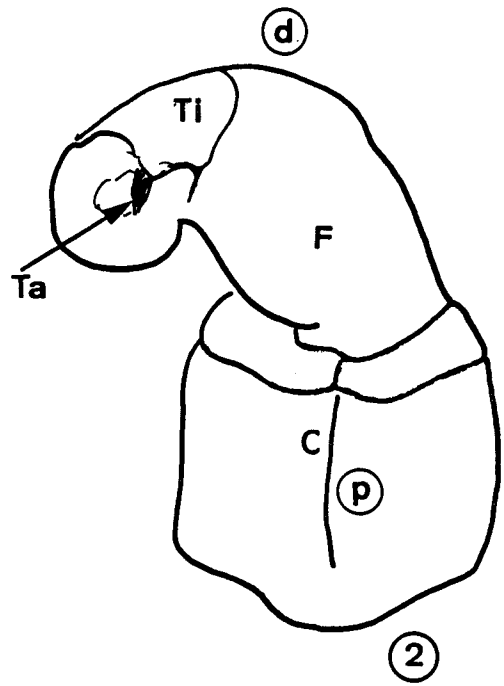
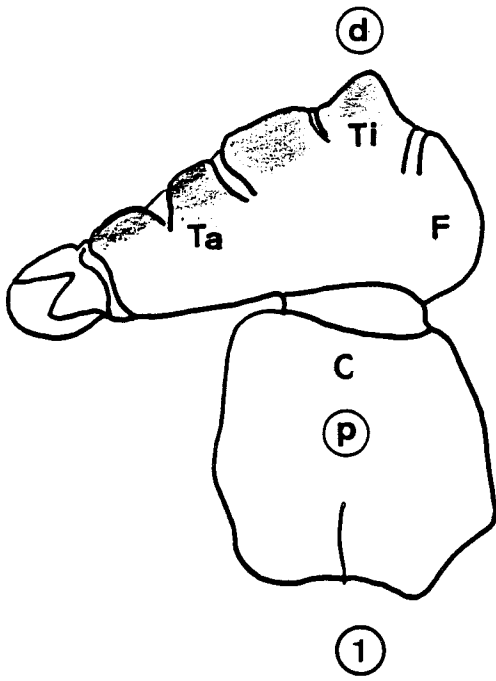


Figure 25

Résultats de l'injection de rouge de ruthénium dans la chambre de régénération de régénérats en phase 4.

- 0,5 μ g de rouge de ruthénium

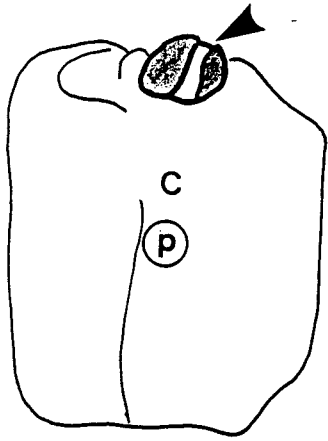
1 et 2 - Au stade V, seul un onychium est présent au-dessus de la coxa (\blacktriangleleft).

3 - Pendant l'intermue, une formation supplémentaire est apparue dorso-antérieurement au niveau du tibia (\blacktriangleleft).

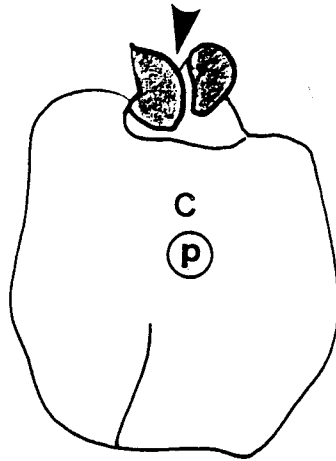
- 0,2 μ g de rouge de ruthénium

4 - Chez un régénérat en stade V (a), sur la face postérieure du fémur, en position médiane, une membrane articulaire est apparue (\blacktriangleleft). Dans cette membrane articulaire, un centre morphogénétique se développe et donne au stade VI (b) un appendice segmenté (\blacktriangleright). A ce stade, l'extrémité du régénérat s'est nécrosée. Le trochanter est anormalement grand.

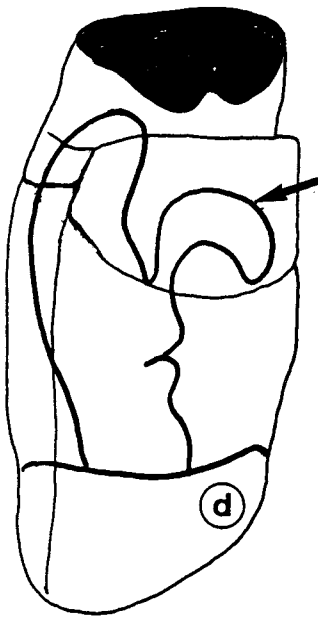
C, coxa; d, face dorsale ; F, fémur ; p, face postérieure ; Ta, tarse; Ti, tibia;
Tr, trochanter.



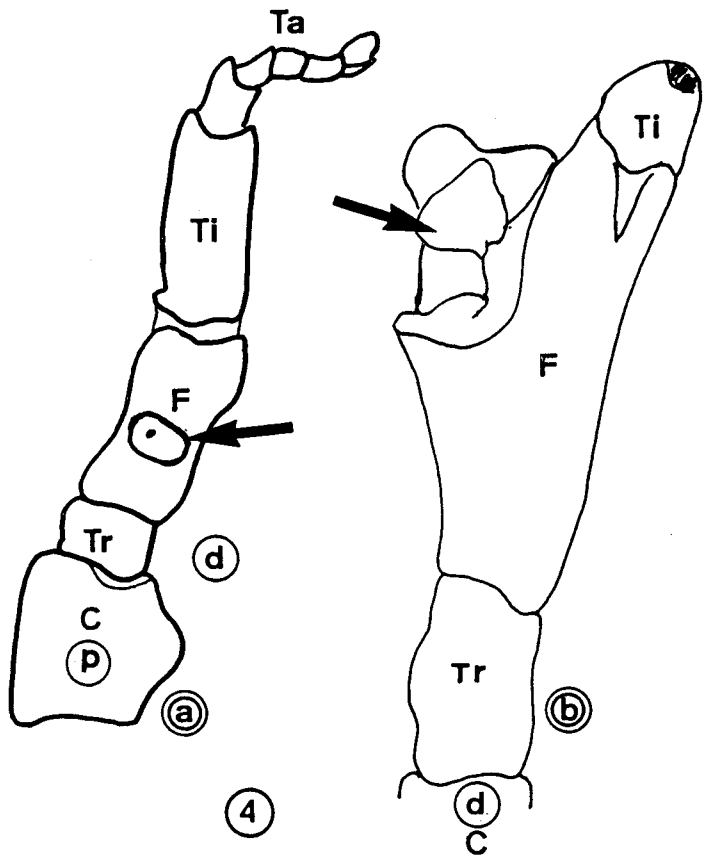
①



②



③



④

Chez l'autre (injection dorsale), le fémur est court et harmonieux, le tibia et le tarse présentent une déficience ventrale postérieure. Le tarse non segmenté ne possède qu'une griffe (Fig.24,2).

x) régénérats atypiques (4 cas)

Chez 1 individu, le mamelon blanchâtre présent au stade V, se développe au stade VI en une tigelle courte et non segmentée (Fig. 24, 3).

Dans 1 cas, le régénérat qui est petit présente une face ventrale complètement dépigmentée et une face dorsale dont certaines zones sont très pigmentées. Les articles de ce régénérat ne sont pas identifiables. (Fig. 24, 4)

Dans 2 cas, seul un onychium est présent (Fig. 25, 1 et 2).

Signalons que pendant l'intermue, sur un des régénérats en cours d'évolution, une formation supplémentaire est apparue dorso-antérieurement au niveau du tibia (Fig. 25,3), malheureusement, à l'exuviation, le régénérat s'est abîmé et nous n'avons pas pu l'observer.

c . 2 mg/ml (0,2 µg/moignon)

Avec cette dose, la durée moyenne de l'intermue est de $46,5 \pm 5,3$ jours. La moitié des 20 animaux présente un régénérat complet mais de petite taille.

Chez les animaux où la régénération est anormale :

* dans 1 cas, bien qu'il n'ait pas été observé de nécrose dans le moignon coxo-trochantérien, seule la coxa a persisté. Au stade VI, on observe un régénérat de petite taille au tarse articulé mais peu caractéristique ; les articles se télescopent et le prétarse est absent. Les membranes articulaires coxo-trochantériennes sont peu importantes.

* dans les autres cas (9), dans le moignon coxo-trochantérien en cours d'intermue, la rétraction de l'épiderme coxal est lente et la chambre de régénération est légèrement verdâtre. Le régénérat, qui s'y développe, n'apparaît pas sous la forme d'un petit cylindre segmenté en trois articles mais sous la forme d'un petit régénérat trapu dont seule la face dorsale est segmentée. A l'exuviation, les membranes coxo-trochantériennes sont réduites et le demeurent au stade VI. Chez 8 de ces animaux, les anomalies se présentent sous la forme de déficiences ventrales importantes et la limite trochanter-fémur n'est pas nette. Les déficiences sont les suivantes :

- déficience fémorale (1 cas)

Au stade V, le fémur s'est redressé mais est resté court. Cependant, il existe sur la face postérieure du fémur en position médiane, une zone articulaire où se développe un centre morphogénétique. Au stade VI, un petit appendice segmenté est apparu à cet endroit. Le trochanter est anormalement grand (Fig. 25, 4).

Figure 26

Résultats de l'injection de 0,2 µg de rouge de ruthénium dans la chambre de régénération de régénérats en phase 4.

Dans tous les cas, les régénérats sont vus par la face postérieure et les faces ventrale et dorsale sont respectivement à gauche et à droite.

1 - 5. Tous les régénérats sont au stade V.

1 - Le régénérat présente une déficience du tibia et du tarse, ces articles non identifiables sont disposés perpendiculairement au fémur et non dans son prolongement (→→).

2 - 5. Tous les articles présentent une déficience ventrale.

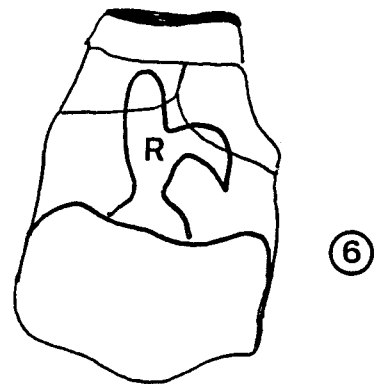
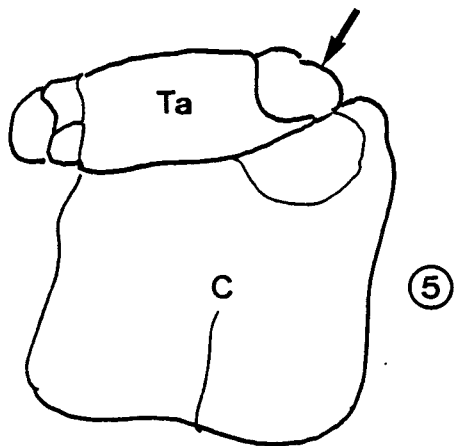
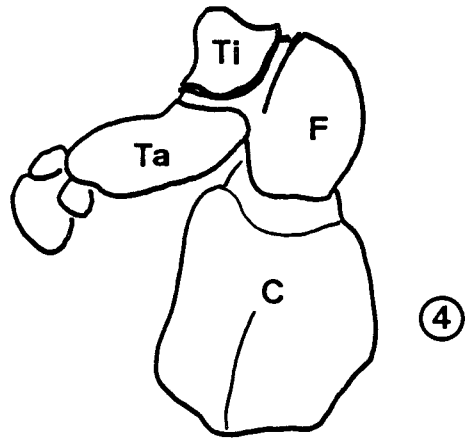
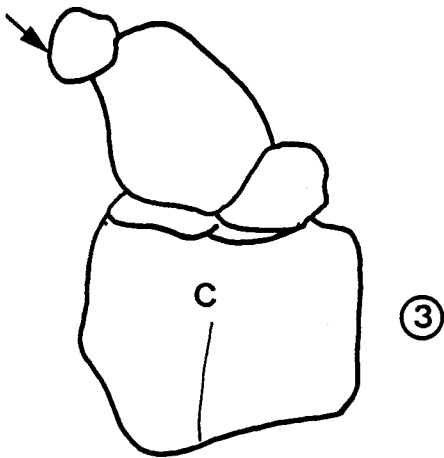
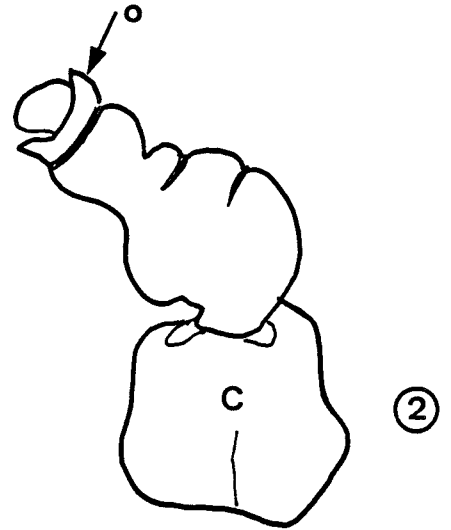
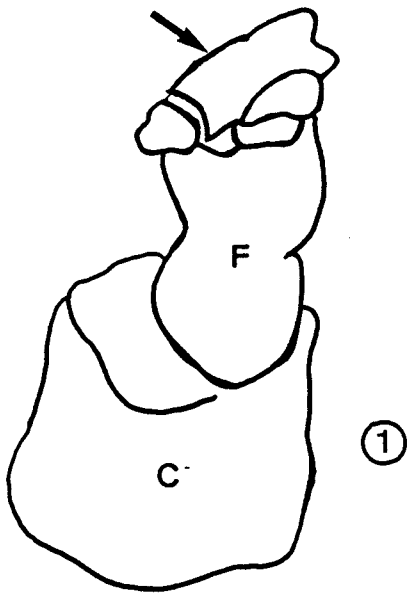
2 et 3 - Seule une masse terminale de type prétarse est identifiable (←←). En **2**, entre la coxa et le l'onychium, les membranes articulaires sont visibles uniquement du côté dorsal.

4 - La face ventrale du tibia est totalement absente et le tarse non segmenté s'articule sur le fémur.

5 - Seul le tarse est repérable, un massif à allure de blastème se situe à la place du fémur et du tibia (←←).

6 - Au cours de l'intermue opératoire, dans le moignon coxo-trochantérien, le régénérat semble se développer dans deux directions.

C, coxa; F, fémur ; o, onychium ; R, régénérat; Ta, tarse ; Ti, tibia.



- déficience tibiale et tarsale (1 cas)

Des articles non identifiables sont disposés perpendiculairement au fémur et non dans son prolongement (Fig. 26, 1)

- déficience de tous les articles (6 cas)

Les régénérats de petite taille sont reliés à la coxa par un pédoncule ce qui, le plus souvent, a entraîné leur nécrose au cours de l'intermue. Tous ces régénérats sont différents :

* dans 2 cas, de tous les articles présents, seule une masse terminale de type prétarse est identifiable (Fig. 26, 2 et 3). Chez l'un, seules les membranes articulaires dorsales sont présentes (Fig. 26, 2).

* dans 1 cas, la face ventrale du tibia est totalement absente et le tarse non segmenté s'articule directement sur le fémur (Fig. 26, 4)

* dans 1 cas, seul le tarse est repérable, un massif à allure de blastème se situe à l'emplacement du fémur et du tibia (Fig. 26, 5). Malheureusement la nécrose de l'appendice pendant l'intermue n'a pas permis de vérifier qu'il s'agissait bien d'un blastème

* une très petite masse, dont l'extrémité distale était pigmentée au stade V, donne au stade VI un régénérat dont la face ventrale est complètement absente et la segmentation des articles incomplète (Fig. 27, 1)

* dans 1 cas, le régénérat court et trapu semble posséder deux extrémités (Fig. 27, 2a). Au stade VI (Fig. 27, 2b) et chez l'adulte (Pl. XVI, 7 et Fig. 27, 2c), l'onychium est très net et dirigé ventralement, l'autre extrémité a proliféré en direction distale mais l'identification des parties qui la composent est impossible.

Chez un animal qui n'a pas réussi à muer, en cours d'intermue, le régénérat semblait se développer dans deux directions (Fig. 26, 6).

d . 1 mg/ml (0,1 µg/moignon)

Les 20 animaux, arrivés au stade V, possèdent un régénérat, soit de taille inférieure à celle d'un régénérat normal (14 ; 70%), soit atypique (6 ; 30%). La durée de l'intermue est en moyenne de $38,4 \pm 3,6$ jours.

Chez les régénérats "anormaux", les anomalies relevées sont les suivantes :

• présence d'une excroissance blanchâtre à allure de blastème à la base d'un onychium (1 cas) (Fig. 28, 1). Pendant l'intermue suivante, cette excroissance a engendré un régénérat segmenté, l'autre partie a peu évolué (Pl. XVI,6).

Figure 27

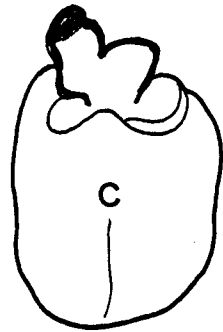
Régénérats obtenus après l'injection de 0,2 µg de rouge de ruthénium dans la chambre de régénération de bourgeons en phase 4.

Pour toutes les figures, la face ventrale est à gauche et la face dorsale à droite.

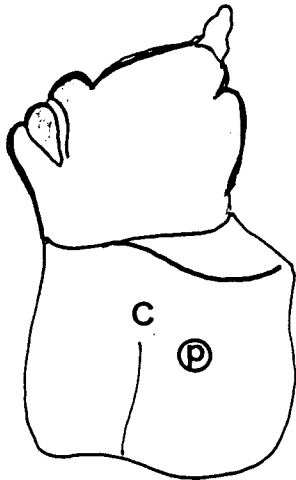
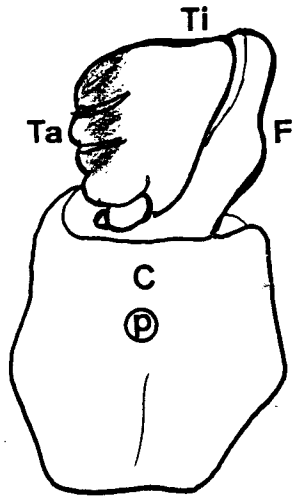
1 - Au stade V, une petite masse à l'extrémité pigmentée donne, au stade VI, un régénérat sans face ventrale et dont la segmentation des articles est incomplète .

2 - Le régénérat, court et trapu, semblait posséder au stade V deux extrémités (**a**). Au stade VI (**b**) et chez l'adulte (**c**), l'onychium est bien développé, l'autre extrémité a légèrement proliféré en direction distale mais les articles ne sont pas identifiables (←).

a, face antérieure ; C, coxa; F, fémur ; o, onychium; p, face postérieure ; Ta, tarse ;
Ti, tibia.

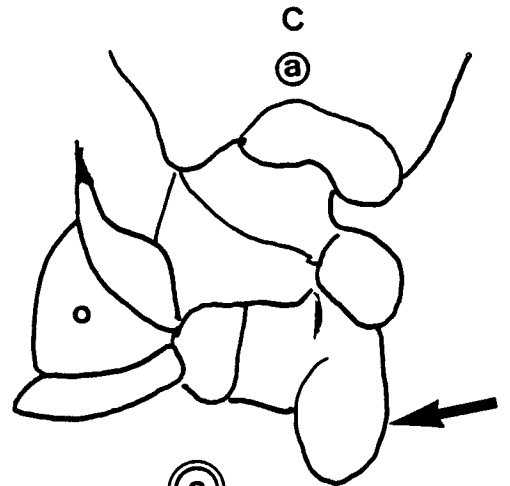


①

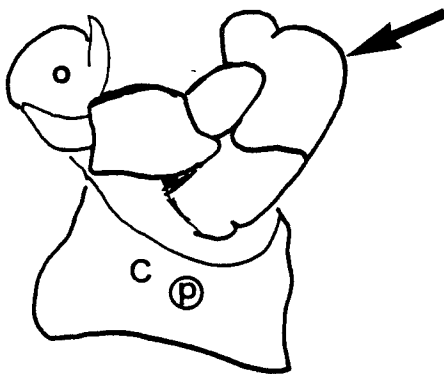


Ⓐ

②



Ⓒ



Ⓑ

- une déficience ventrale du tibia (1 cas)
- une déficience ventrale partielle du fémur qui est court (2 cas). Chez le stade VI obtenu, il y a une continuité entre le fémur et le tibia du côté ventral. L'extrémité distale du fémur est élargie et entoure partiellement le tibia (Fig. 28, 3)
- une déficience partielle du fémur et totale du tibia. Le tarse non segmenté se rattache au fémur (1 cas) (Fig. 28, 2)
- dans 1 cas, le tarse est mal segmenté et possède des zones articulaires ventrales importantes (Fig. 28, 4).

Dans tous ces cas, le trochanter, s'il est présent, n'est pas discernable.

Doses Injectées (µg)	Nombre d'animaux	Durée d'intermue (en jours)	Régénérat		
			normal	atypique	absent
Témoins	11	26,9 ± 2,3	11 (100%)	-	-
1	5	60,2 ± 11,5	-	-	5 (100%)
0,5	24	32,3 ± 4,1	2 (8,3 %)	6 (25 %)	16 (66,6 %)
0,2	20	46,5 ± 5,3	10 (50 %)	9 (45 %)	1 (5 %)
0,1	20	38,4 ± 3,6	14 (70 %)	6 (30 %)	-
0,05	21	38,3 ± 3,9	17 (81 %)	4 (19 %)	-
0,02	10	37,8 ± 3,5	9 (90 %)	1 (10 %)	-

Tableau XV : Résultats, chez des animaux en stade V, de l'injection de rouge de ruthénium dans la chambre de régénération d'un régénérat de stade IV en phase 4. Les témoins n'ont reçu que 0,1 µl de tampon Tris-Hcl.

Figure 23

Résultats de l'injection de 0,1 µg de rouge de ruthénium dans la chambre de régénération de bourgeons en phase 4.

1 - Au stade V, le régénérat petit possède à la base de l'onychium bien visible une petite excroissance blanchâtre à allure de blastème (←).

2 - Au stade V, le régénérat présente une déficience partielle du fémur et une déficience distale du tibia, ce qui entraîne une continuité entre le tarse et le fémur.

3 - Le régénérat qui, au stade V présentait une déficience ventrale partielle du fémur (**a**), montre, au stade VI (**b**), une continuité entre le tibia et le fémur du côté ventral, l'extrémité distale du fémur est élargie et entoure partiellement le tibia.

4 - Au stade V, le tarse est mal segmenté, la zone articulaire tibio-tarsale est importante du côté ventral.

C, coxa ; d, face dorsale ; F, fémur ; o, onychium ; p, face postérieure ; Ta, tarse ;
Ti, tibia ; V, face ventrale.

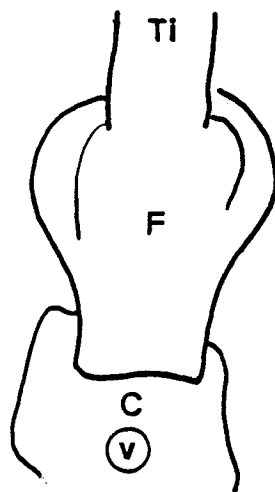
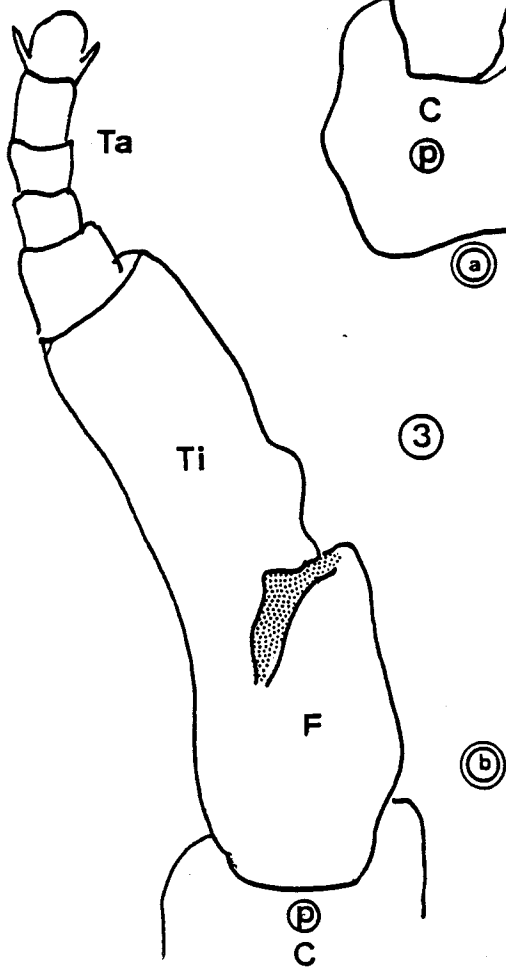
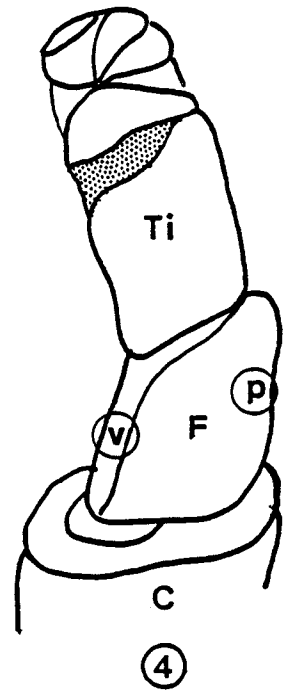
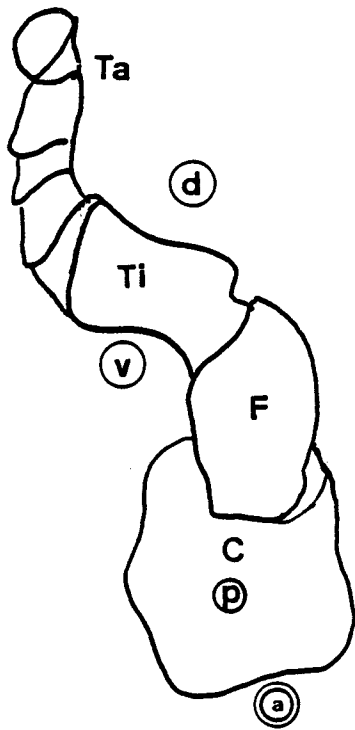
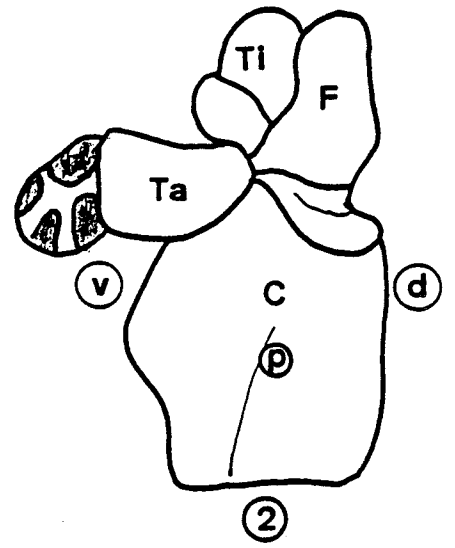
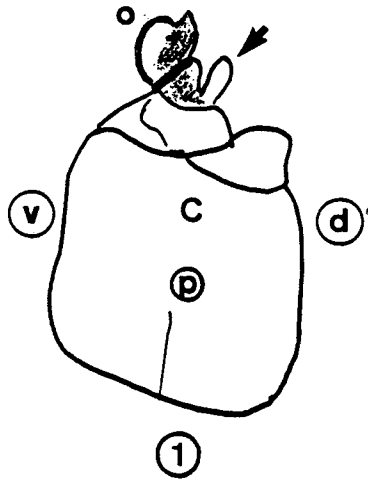
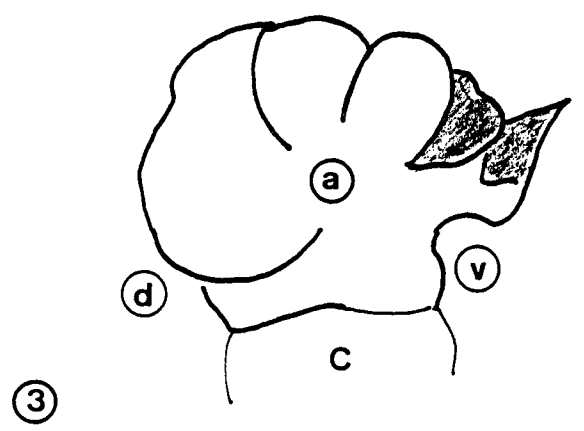
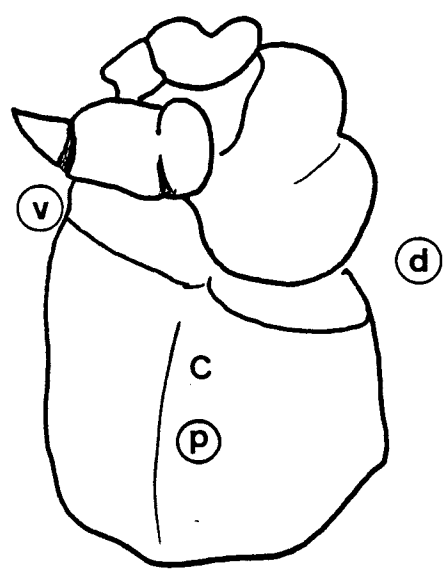
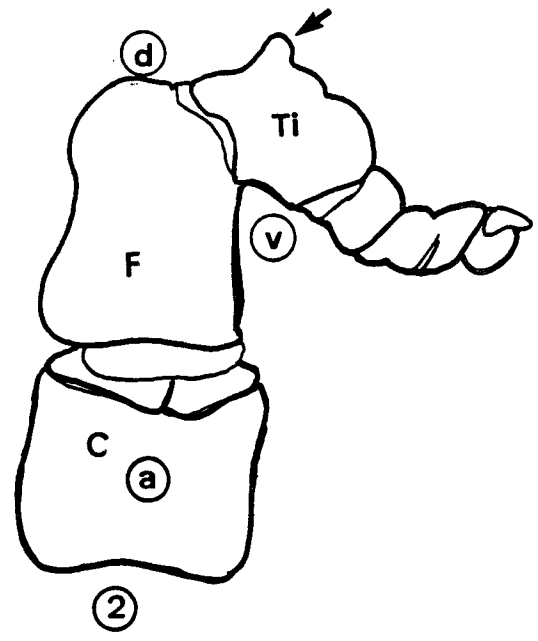
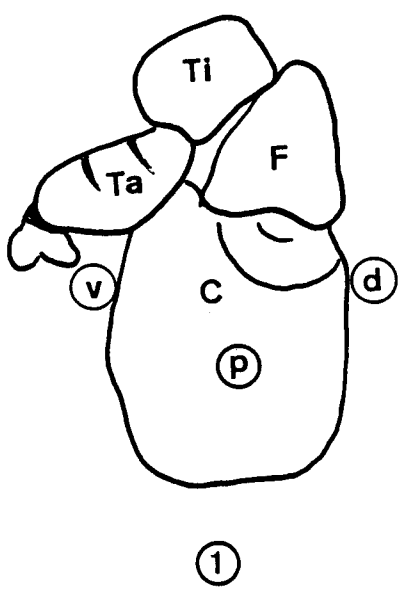


Figure 29

Résultats de l'injection au stade IV de 0,05 μ g de rouge de ruthénium dans la chambre de régénération de bourgeons en phase 4.

Les régénérats atypiques, obtenus au stade V, présentent tous une déficience ventrale plus ou moins importante. Déficience qui peut même atteindre le tarse (3). Dans un cas (2), une excroissance est apparue dans la zone antéro-dorsale du tibia (\leftarrow).

a, face antérieure ; C, coxa ; d, face dorsale ; F, fémur ; p, face postérieure ; Ta, tarse ;
Ti, tibia; v , face ventrale.



e . 0,5 mg/ml (0,05 µg/moignon)

Avec cette dose, la durée moyenne de l'intermue est de $38,3 \pm 3,9$ jours.

Les 21 stades V possèdent un régénérat, soit normal (17 ; 81%), soit atypique (4 ; 19%). Les anomalies sont essentiellement des déficiences de faces ventrales (Fig. 29) :

- dans 1 cas, cette déficience était très importante puisque même le tarse en était dépourvu (Fig. 29, 3)
- dans 1 cas, une excroissance est apparue dans la zone antéro-dorsale du tibia (Fig. 29, 2)

f . 0,2 mg (0,02 µg/moignon)

Un seul des 10 régénérats obtenus possède une anomalie qui se présente sous la forme d'une déficience antérieure du tibia et du fémur, ce qui confère au régénérat un aspect enroulé.

La durée moyenne de l'intermue est de $37,8 \pm 3,5$ jours.

2 . Etude histologique

Les animaux étudiés ont reçu une injection de 0,2 µg de rouge de ruthénium. En parallèle, une série témoin n'a reçu que du tampon.

Les moignons coxo-trochantérien ont été fixés après des délais de 6 heures, 1, 2, 3, 5, 7, 10 et 15 jours.

a . Injection de tampon

Une discontinuité épidermique est parfois observée. Dans la chambre de régénération, des nodules bruns sont présents au niveau de la blessure, les cellules sont plus nombreuses que dans un moignon non injecté mais sans accumulation particulière. Le régénérat évolue normalement

b . Injection de rouge de ruthénium.

Le caillot est important. A l'intérieur du régénérat, on note la présence de nodules encapsulés. Dans la majorité des cas, l'épiderme s'est rompu. Des cellules se sont réparties autour du régénérat et constituent une couche qui entoure le régénérat. Le matériel de la chambre est moins abondant et l'injection a retardé la retraction épidermique et l'évolution du régénérat.

Il faut souligner cependant une large diversité des résultats. Malgré les différentes fixations, nous n'avons pas pu observer de gradation dans l'évolution des régénérats, chaque régénérat évoluant presque différemment.

3 . Microscope électronique

0,2 µg de rouge de ruthénium ont été injectés dans la chambre de régénération. Lorsque la fixation a lieu juste après l'injection, le matériel de la chambre apparaît très nettement par rapport aux témoins (Pl. XII, 4). Il est constitué d'un réseau fibrillaire de taille très variable, les plus grosses fibres peuvent atteindre 50 nm (Pl. XII, 5). Un jour après l'injection, dans le matériel de la chambre et à proximité des surfaces épidermiques apicales du régénérat, des zones très denses aux électrons sont visibles (Pl. XII, 6) ainsi que des vésicules au contour fortement souligné (Pl. XII, 7). A la surface apicale des cellules épidermiques (Pl. XII, 8) et sous la surface, des petites vésicules revêtues sont présentes. Les cellules présentes dans la chambre de régénération, à allure d'hémocytes, possèdent des zones plus ou moins grandes, non délimitées, très denses aux électrons (Pl. XII, 9). Dès le deuxième jour après l'injection, de nombreux phagosomes sont présents dans l'épiderme (Pl. XII, 3)

4 . Rouge de ruthénium et tampon phosphate

Lorsqu'on injecte du rouge de ruthénium dilué dans du tampon phosphate à la dose de 10 mg/ml, les 8 stades V obtenus ont un régénérat d'allure normale, parfois de taille légèrement inférieure à celle d'un régénérat témoin (6/8).

La durée de l'intermue est d'environ 25 jours, délai normal lorsqu'il y a autotomie. La dose utilisée correspond à celle qui provoque l'absence de régénération lorsque le rouge de ruthénium est dilué dans le tampon Tris-HCl. Le rouge de ruthénium se lie aux phosphates (LUFT, 1971) et est donc neutralisé. On peut donc en déduire que lorsque le rouge de ruthénium est dilué dans le tampon-Tris-HCl, ce sont bien les charges positives du rouge de ruthénium qui sont responsables des perturbations obtenues.

C - Conclusion

L'injection de rouge de ruthénium, dans la chambre de régénération d'un bourgeon de régénération en phase 4 provoque :

1. la formation de plages brunes
2. l'allongement de la durée de l'intermue
3. une perturbation de développement des régénérats ébauchés.

Nous considèrerons plus loin le cas des plages brunes qui apparaissent aussi à la suite de l'injection d'autres substances.

En ce qui concerne la durée de l'intermue, elle est augmentée quelle que soit la dose injectée.

Elle est plus que doublée pour la dose la plus élevée. Par rapport aux autres doses qui lui sont inférieures, la dose de $0,5 \mu\text{g}$ affecte peu la durée de l'intermue. Ce qui est surprenant, d'autant que les résultats morphologiques semblent cohérents. Pour cette série, dans la majorité des cas, l'évolution du régénérat cesse alors que dans les autres séries, un régénérat se forme et par là même, sa mise en place nécessite un délai d'intermue plus grand. Les délais d'intermue sont aussi importants qu'après l'injection d'héparine dans le corps de l'animal. Or, avec l'héparine, nous avons montré que le taux des ecdystéroïdes était perturbé. Avec le rouge de ruthénium, l'injection a lieu dans la chambre de régénération et la quantité injectée est faible par rapport à l'héparine. On ne peut cependant pas exclure un effet du rouge de ruthénium sur le taux des ecdystéroïdes. Il nous est impossible de conclure puisqu'aucun dosage n'a été effectué.

Un autre phénomène peut expliquer le retard de la mue. Il s'agit de l'évolution du régénérat. Les perturbations de régénération ne sont pas dues au tampon de dilution ni aux éventuelles lésions causées par l'injection. En effet, chez les témoins, même si à l'observation histologique, des ruptures épidermiques sont constatées dans la zone d'injection, les régénérats sont normaux. Par ailleurs, les résultats de l'injection de rouge de ruthénium dilué dans le tampon phosphate démontre bien que ce sont les charges positives du rouge de ruthénium qui sont responsables des perturbations.

Plus les doses de rouge de ruthénium sont fortes, moins il y a de régénérat et plus les doses sont faibles, plus les régénérats sont normaux. Pour les doses les plus fortes 1 et $0,5 \mu\text{g}$, dans la majorité des cas, le régénérat, le trochanter et la moitié distale de la coxa ont disparu. Cependant, aucune nécrose n'est perceptible dans le moignon coxo-trochantérien et la rétraction épidermique s'est partiellement poursuivie dans la coxa. Les résultats histologiques obtenus avec la dose de $0,2 \mu\text{g}$ nous permettent de penser qu'en fait, l'injection de rouge de ruthénium entraîne la rupture de l'épiderme et empêche le régénérat d'évoluer voire même le supprime. Il faut également signaler que la coxa d'une patte régénérée est toujours plus petite et moins pigmentée qu'une coxa de patte témoin. Or, lorsque les animaux perdent leur régénérat (dose de $0,5 \mu\text{g}$), la coxa a une taille semblable à celle d'une coxa témoin et n'est dépigmentée que dans sa partie distale. La dédifférenciation des cellules épidermiques est limitée puisque la morphologie coxale est conservée. Par ailleurs, des coupes histologiques montrent que les cellules épidermiques sont toujours capables de sécréter de la cuticule. Aussi le rouge de ruthénium agit-il sur la croissance du régénérat sans pour autant perturber le fonctionnement des cellules épidermiques ou alors ces cellules sont capables de récupérer leur fonction.

Lorsque les régénérats ont évolué, ils sont : soit semblables à des régénérats normaux excepté la taille, soit atypiques. C'est la dose de $0,2 \mu\text{g}$ qui produit le plus grand nombre de régénérats

atypiques. Les régénérats reliés à la coxa par un fin pédoncule se sont le plus souvent nécrosés pendant l'intermue. Les anomalies concernent essentiellement les membranes articulaires et la déficience voire l'absence de faces ou d'articles.

- Les membranes articulaires.

Les membranes articulaires coxo-trochantériennes sont souvent petites et le demeurent au stade VI.

Les membranes articulaires qui séparent les autres articles sont incomplètes principalement du côté ventral. Dans 1 cas, la membrane fémoro-tibiale est demeurée absente du côté ventral au stade VI.

- Les déficiences

Le seul article vraiment reconnaissable est le tarse et plus particulièrement l'onychium qui dans certains cas est aussi développé que le reste de l'appendice. Tout se passe comme si l'onychium, partie distale du régénérat, visible dès la phase 5, n'était pas touchée par l'injection et continuait sa croissance normalement.

L'injection du rouge de ruthénium n'entraîne pas qu'une simple rupture de l'épiderme puisque dans la majorité des cas, on observe une déficience ventrale des régénérats au niveau du fémur, du tibia et parfois même du tarse. Dans certains cas, il semble que des formations supplémentaires soient apparues. Anomalies qui peuvent s'expliquer par l'importance de la mort cellulaire qui, lors de la cicatrisation, entraîne la mise en continuité de cellules dotées d'informations de position différentes, ce qui est invoqué par GIRTON et BRYANT (1980) pour expliquer la genèse de formations surnuméraires. Cependant, chez *Carausius morosus*, les résultats expérimentaux de BART (1969) ont montré que seule la mise en contact de faces opposées pouvait déclencher une morphogenèse surnuméraire. La mise en contact de faces non opposées n'entraîne pas de morphogenèse mais une simple cicatrisation et par là même une déficience de la partie enlevée.

CHAPITRE V

**INJECTION DE MEMBRANES PLASMIQUES
DE CELLULES EPIDERMiques**

Dans l'épiderme d'une patte, chaque cellule possède une information de position et l'association de faces de qualités opposées provoque une morphogenèse surnuméraire. Pour tenter de démontrer que cette information de position se situe au niveau des membranes plasmiques des cellules épidermiques, nous avons injecté des membranes plasmiques de cellules épidermiques dans la chambre de régénération. Nous espérons ainsi créer des dysharmonies entre le régénérat et les membranes plasmiques injectées et déclencher des morphogenèses surnuméraires.

I - MATERIEL ET METHODE

Des suspensions de membranes plasmiques ont été préparées selon la technique décrite précédemment en vue de l'obtention d'anticorps dirigés contre les antigènes membranaires (cf. chap. II, Fig. 9). Les fragments tissulaires qui ont servi à cette préparation sont les suivants :

- tergites ou sternites méso et métathoraciques.
- faces dorsales ou faces ventrales de fémurs de pattes méso et métathoraciques.
- faces fémorales antérieures, postérieures et dorsales de pattes méso et métathoraciques.

Toutes les suspensions membranaires ont été soumises aux ultra-sons excepté celles des faces dorsales.

La quantité de protéines injectée et la phase de régénération au moment de l'injection seront précisées pour chaque suspension membranaire.

Les injections ont été faites à travers la membrane articulaire coxo-trochantérienne, dorsalement ou ventralement.

II - RESULTATS

Quelle que soit la suspension membranaire injectée, de grandes plages brunes apparaissent au cours de l'intermue. Par leur importance, elles ont souvent perturbé l'exuviation des animaux.

Chez les animaux témoins, la durée moyenne de l'intermue est de 30 jours.

Les résultats sont récapitulés dans les tableaux XVI et XVII. Il faut signaler que peu d'animaux ont mué par rapport aux animaux traités, puisque au minimum, une vingtaine d'animaux ont été injectés par série

A - Membranes plasmiques de tergites (Tableau XVI)

La quantité de protéines contenue dans une suspension membranaire obtenue à partir de deux tergites, respectivement méso et métathoracique, est de 12000 ng.

Des bourgeons de régénération en phases 3 (petite tigelle) et 4 (cylindre) ont reçu du côté ventral 100 ng de protéines.

1 . Bourgeons de régénération en phase 3 (9 cas)

La durée de l'intermue est normale, $30,8 \pm 2,7$ jours. Les résultats suivants ont été observés :

- 1 régénérat est normal
- 1 régénérat présente une légère déficience ventrale du tibia, déficience qui disparaît au stade VI.

- 2 régénérats présentent des déficiences ventrales importantes au niveau du fémur et principalement du tibia. D'autre part, le tarse ne possède que deux articles et l'onychium (Fig. 30, 1 et 2).

- 5 petites formations dont la partie distale se nécrose au cours de l'intermue. A la 2ème mue post-opératoire, les régénérats ont disparu, sauf dans 2 cas où seule la partie distale du régénérat a disparu. Les anomalies suivantes ont été observées :

- ◇ chez l'un, le fémur est très court et deux mamelons sont visibles au niveau du tibia, sur sa face ventrale antérieure (Fig. 30, 3)

- ◇ chez l'autre, les articles sont courts, des mamelons sont présents sur la face dorsale du fémur et du tibia et, d'autre part, la membrane articulaire fémoro-tibiale occupe une large place sur la face dorsale du fémur (Pl. XVIII, 1a).

2 . Bourgeons de régénération en phase 4 (16 cas)

a . Aspects morphologiques

Les animaux reçoivent deux injections à deux jours d'intervalle. La durée moyenne de l'intermue est de $28,5 \pm 3,3$ jours.

Tous les régénérats ont une taille inférieure à celle d'un régénérat normal.

* Dans 8 cas, tous les articles sont présents et normaux.

* Dans 3 cas, seul le tarse est perturbé, le nombre de ses articles est incomplet : 2 articles mais 3 paires d'euplantules (1 cas, Fig. 30, 4a), 3 articles ventraux et 4 dorsaux (2 cas, Fig. 30, 4b et c).

* Dans 5 cas, les régénérats présentent des déficiences ventrales, soit au niveau du tibia (3 cas), soit au niveau du tibia et du fémur (2 cas) :

- déficiences tibiales (3 cas)

Dans 1 cas, la déficience ventrale est distale, peu importante et disparaît au stade VI. Quant au tarse, il présente 4 articles sur sa face dorsale et 3 sur sa face ventrale.

Dans les 2 autres cas, la déficience est plus importante. Chez l'un, au stade VI, le tarse a repris une orientation normale mais son implantation demeure sur la face ventrale du tibia et non dans son prolongement (Fig. 31, 1a et b). Chez l'autre, les faces ventrale et antérieure du tibia restent petites et ceci donne un aspect enroulé à l'extrémité distale du régénérat (Pl. XVIII, 1b). Une membrane articulaire relie la base du tarse au fémur du côté ventral antérieur (Fig. 31, 2).

- déficiences tibiales et fémorales (2 cas)

Dans 1 cas, la déficience donne au régénérat un aspect totalement enroulé (Fig. 31, 3). Dans l'autre cas, l'aspect est moins enroulé mais les articles du tarse se télescopent sur leurs faces ventrale et antérieure.

b . Aspects histologiques

9 moignons coxo-trochantériens ont été fixés 5 jours après l'injection (15ème jour de l'intermue). Dans l'ensemble, la ligne de rétraction externe de l'épiderme n'a pas bougé et se situe toujours au niveau distal de la coxa.

Chez 5 bourgeons, l'épiderme s'est rompu et 3 de ces bourgeons ont acquis des formes anormales. Des excroissances sont apparues chez 2 d'entre-eux. Elles se situent, chez l'un à la base du régénérat du côté injecté (Pl. XVII, 1), et chez l'autre, sur le tibia, mais non du côté injecté (Pl. XVII, 2). Pour ces deux régénérats, la rupture de l'épiderme n'empêche par leur évolution.

Figure 30

Résultats de l'injection, du côté ventral, de membranes plasmiques d'épiderme de tergites (100 ng de protéines) dans la chambre de régénération :

- de régénérat en phase 3

1 et 2 - Au stade V, les régénérats présentent des déficiences ventrales importantes au niveau du fémur et principalement du tibia. Le tarse ne possède que 2 articles et l'onychium.

3 - Au cours du stade V, une nécrose s'est produite au niveau distal du régénérat. Au stade VI, le fémur est très court et le tibia présente deux mamelons sur la face antérieure.

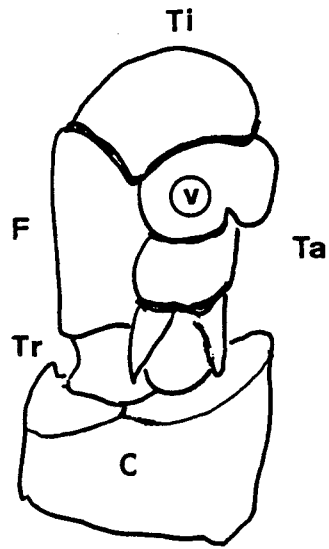
- de régénérat en phase 4

4 - Dans ces trois cas, seul le tarse a été perturbé.

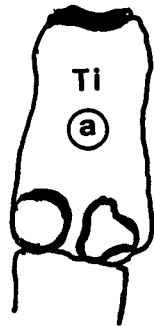
4a - Il possède 2 articles mais 3 paires d'euplantules (adulte).

4b et c - Il possède 3 articles ventraux et 4 dorsaux (stade VI).

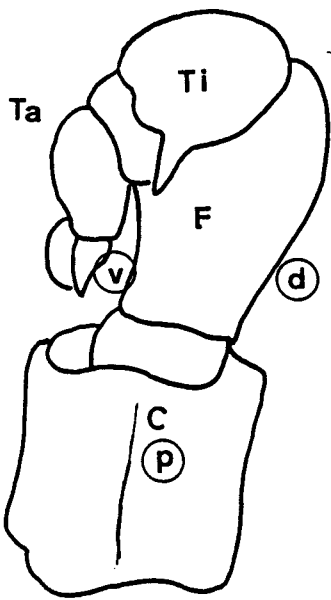
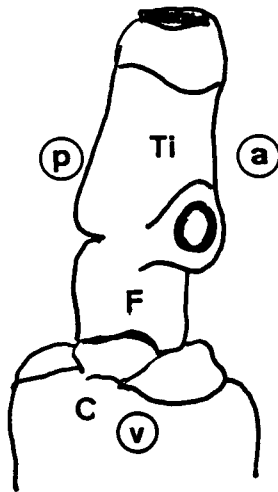
a, face antérieure ; C, coxa ; d, face dorsale ; F, fémur ; p, face postérieure ; Ta, tarse ; Ti, tibia ; Tr, trochanter ; v, face ventrale.



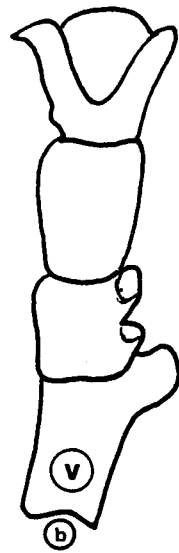
①



③



②



④

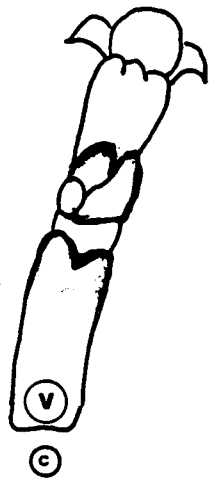


Figure 31

Résultats de l'injection de membranes plasmiques d'épiderme (100 ng de protéines) de tergites et de sternites dans la chambre de régénération de régénérats en phase 4.

- Membranes plasmiques de tergites, une injection du côté ventral.

1 - Au stade V, le régénérat présente une déficience ventrale du tibia (**a**). Au stade VI, le tarse a repris une orientation normale mais son implantation demeure sur la face ventrale du tibia et non dans son prolongement (**b**).

2 - Les faces ventrale et antérieure du tibia demeurent petites même au stade VI ; une membrane articulaire relie la base du tarse au fémur (←).

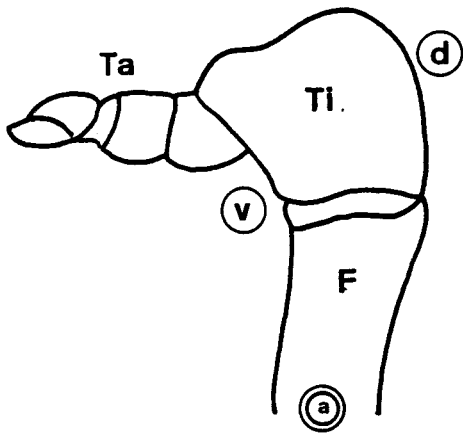
3 - La déficience au niveau du tibia et du fémur donne un aspect totalement enroulé au régénérat (stade V).

- Membranes plasmiques de sternites, 2 injections du côté dorsal.

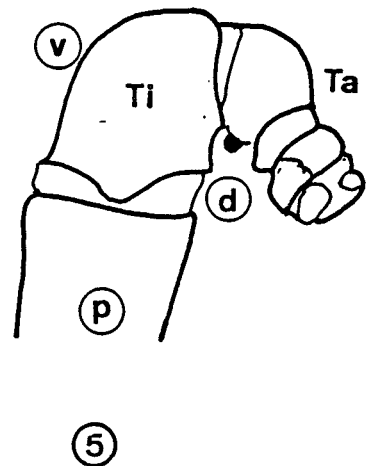
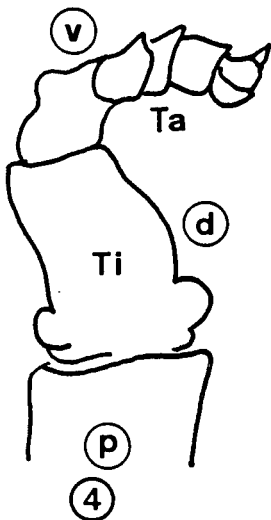
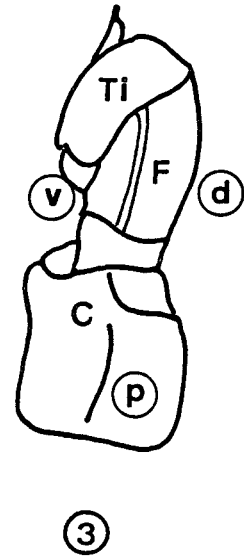
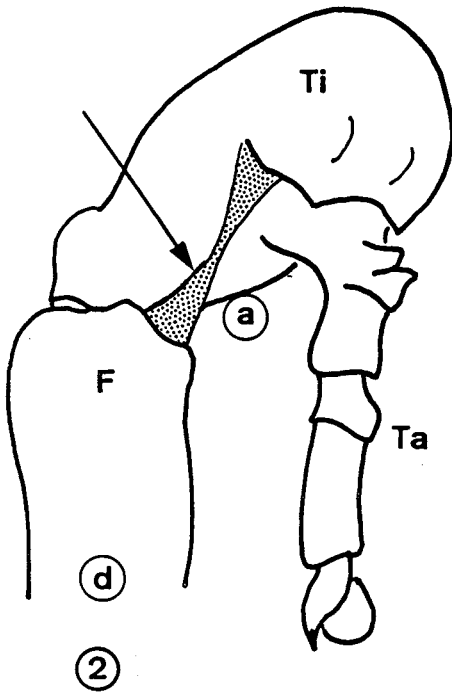
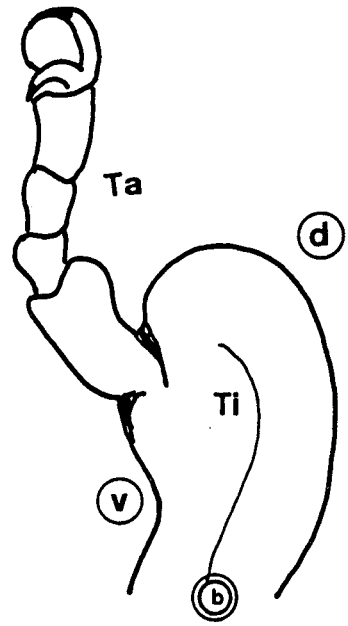
4 - La déficience dorsale du tibia est peu importante (stade V).

5 - La déficience dorsale du tibia est plus importante et le tarse ne possède que trois articles.

a, face antérieure ; C, coxa ; d, face dorsale ; F, fémur ; p, face postérieure ; Ta, tarse ; Ti, tibia ; v, face ventrale.



①



MP Régénérat	T			S		
	I	R	N	I	R	N
P3	V	9	1 (10%)			
P4	V	16	8 (50%)	D	10	7 (70%)
				D + blessure	12	3 (25%)

Tableau XVI : Résultats, au stade V, des injections (I) dorsales (D) ou ventrales (V) de membranes plasmiques (MP) de tergites (T) ou de sternites (S) pratiquées, dans la chambre de régénération de régénérats en phase 3 ou 4 lors du stade IV. Dans tous les cas, 100 ng de protéines ont été injectés. (R : nombre de régénérats obtenus ; N : nombre de régénérats normalement constitués).

B - Membranes plasmiques de sternites (Tableau XVI)

La suspension membranaire obtenue à partir de deux sternites, respectivement mésothoracique et métathoracique, contient 10000 ng de protéines.

Deux séries ont été réalisées sur des bourgeons de régénération en phase 4 (cylindre) :

- dans la série 1, deux injections dorsales sont effectuées à 2 jours d'intervalle
- dans la série 2, on pratique une seule injection dorsale qui abime le régénérat

La quantité de protéines est de 100 ng par injection.

Pour les deux séries, la durée de l'intermue est de $25,6 \pm 2,3$ jours.

1) série 1 (10 cas)

Dans 7 cas, le régénérat est normal mais de petite taille.

Dans 3 cas, le régénérat présente une déficience dorsale plus ou moins importante du tibia (Fig. 31, 4, 5 ; 32, 1). Chez l'un d'entre eux, le tarse ne possède que trois articles. Chez un autre, la membrane articulaire fémoro-tibiale est grande et une excroissance blanche ayant l'allure d'un centre morphogénétique était visible à la base proximale du tibia (Fig. 32, 1), malheureusement cet animal n'a pas survécu.

2) série 2 (12 cas) (Pl. XVIII, 2)

Les régénérats ont tous une taille inférieure à celle d'un régénérat normal.

Figure 32

Résultats de l'injection de membranes plasmiques d'épiderme de sternites et de fémur dans la chambre de régénération de régénérats en phase 4.

- Membranes plasmiques de sternites (100 µg de protéines) injectées du côté dorsal.

1 et 2 - Les animaux en stade V présentent une déficience tibiale.

1 - La membrane articulaire fémoro-tibiale est grande (⊙) et une excroissance blanche (←) à allure de centre morphogénétique est présente à la base proximale du tibia.

2 - La membrane articulaire fémoro-tibiale qui est grande atteint la base du tarse.

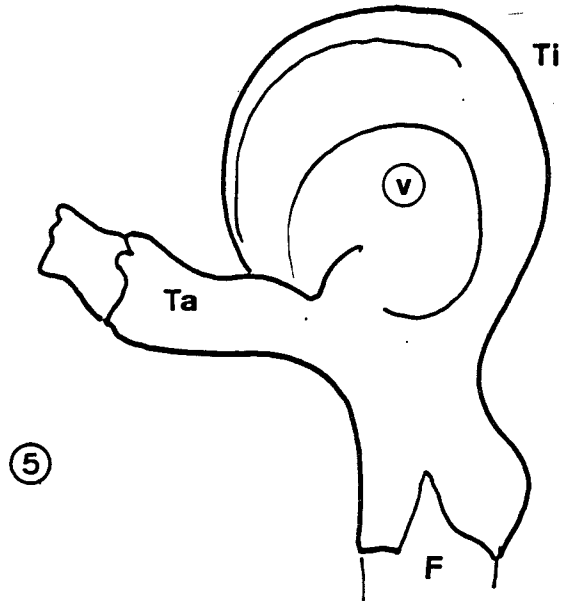
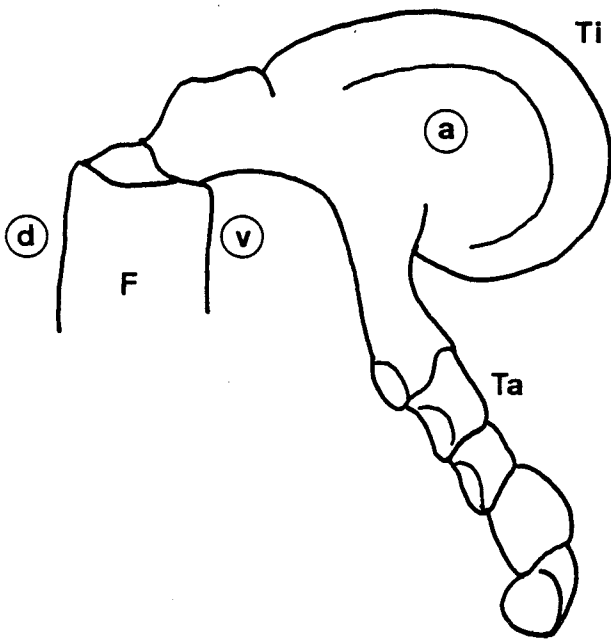
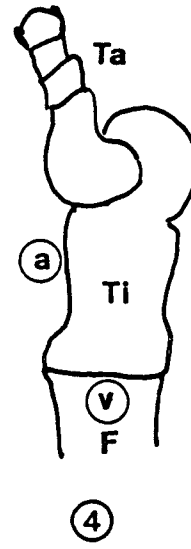
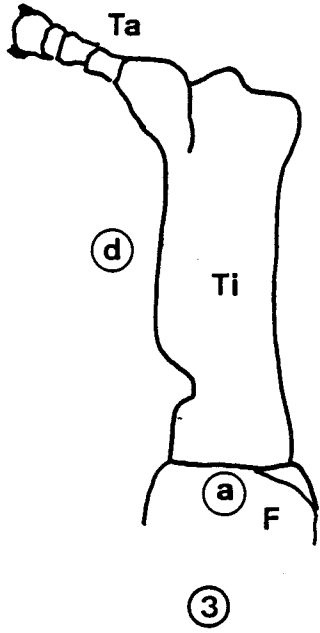
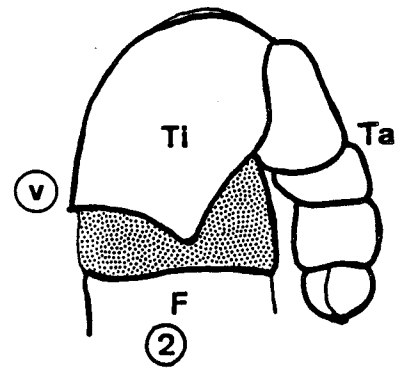
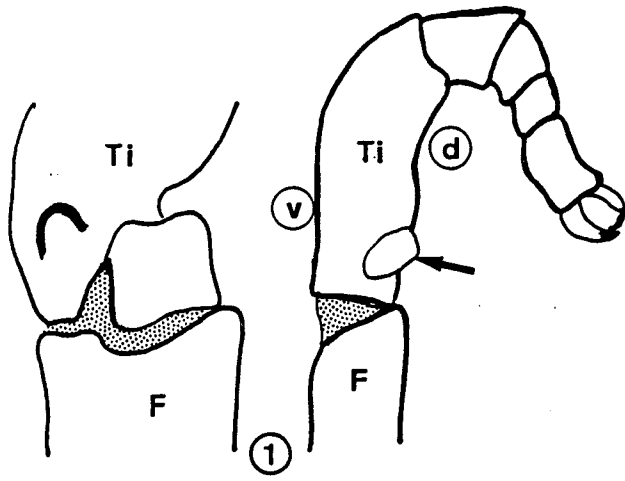
- Membranes plasmiques de faces antérieure, postérieure et dorsale de fémur (10 ng de protéines) injectés du côté ventral.

3 - Le régénérat en stade V présente une déficience dorsale antérieure du tibia.

4 - Le régénérat en stade V présente une déficience ventrale antérieure du tibia.

5 - Déficience ventrale très importante du régénérat qui, au stade VI, a entraîné la présence d'un petit tibia enroulé et une continuité entre le 1er article tarsal et le tibia du côté ventral.

a, face antérieure ; d, face dorsale ; F, fémur ; Ta, tarse ; Ti, tibia ; v, face ventrale.



9 des 12 régénérats présentent une déficience dorsale du tibia dont l'importance est variable ; elle confère au tarse un aspect plus ou moins enroulé. Dans 3 cas, le tarse ne possède que 3 articles.

Dans 5 cas, la membrane articulaire fémoro-tibiale est plus grande que chez les témoins et peut atteindre la base proximale du tarse (Fig. 32, 2).

C - Membranes (m) plasmiques (p) de fémur (Tableau XVII)

1 . m p des faces antérieures, postérieures et dorsales.

Une suspension membranaire obtenue à partir de trois faces fémorales : antérieure, postérieure et dorsale, contient 3000 ng.

100 ng de protéines sont injectés ventralement chez des bourgeons de régénération en phase 4.

La durée de l'intermue est augmentée : $44,5 \pm 2,2$ jours

Les 12 régénérats ont une taille inférieure à celle d'un régénérat témoin. 3 de ces régénérats présentent une déficience au niveau du tibia : soit dorsale et antérieure (1 cas, Fig. 32, 3) soit ventrale et antérieure (1 cas, Fig. 32, 4) peu importantes, soit ventrale très importante (1 cas). Dans ce dernier cas, au stade VI, la face ventrale du tibia n'a pas grandi et la continuité persiste entre le 1er article tarsal et le tibia du côté ventral ; la membrane articulaire est absente du côté ventral entre les deux articles (Fig. 32, 5).

2 . m p de faces dorsales.

Une face dorsale de fémur contient environ 1000 ng de protéines membranaires. 50 ng de protéines ont été injectés du côté dorsal ou ventral dans des moignons coxo-trochantériens en phase 3 (petite tigelle), 5 (cylindre segmenté) et 6 (début du reploiement en S). Dans tous les cas, les régénérats obtenus ont une taille inférieure à celle d'un régénérat normal.

a . Bourgeons de régénération en phase 3. Injection ventrale (3 cas)

Les 3 régénérats obtenus au stade V ont une allure normale. La durée de l'intermue est de $39,6 \pm 2,3$ jours.

3 animaux sont morts après 3 mois sans avoir mué. Dans leur moignon, un régénérat apparemment normal était visible mais la ligne de rétraction n'avait pas encore atteint le bas de la coxa.

Figure 33

Résultats de l'injection de membranes plasmiques de faces ventrales de fémur.

1 - Injection dans l'hémolymphe de 20 ng de protéines. Au stade V, le régénérat présente une déficience dorsale postérieure du tibia et une membrane articulaire fémoro-tibiale assez grande.

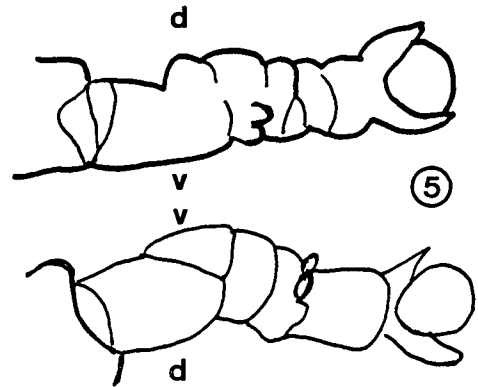
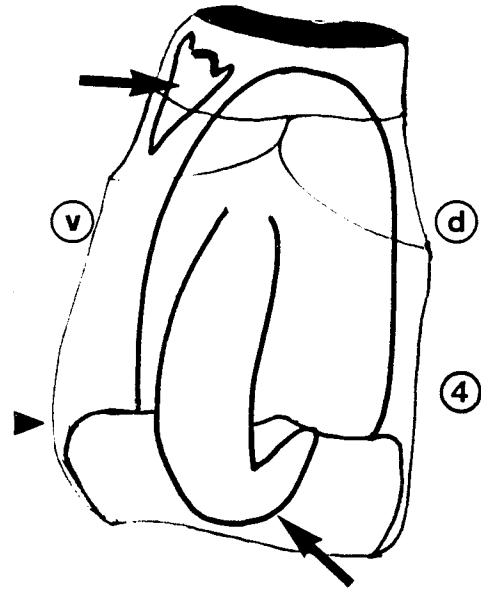
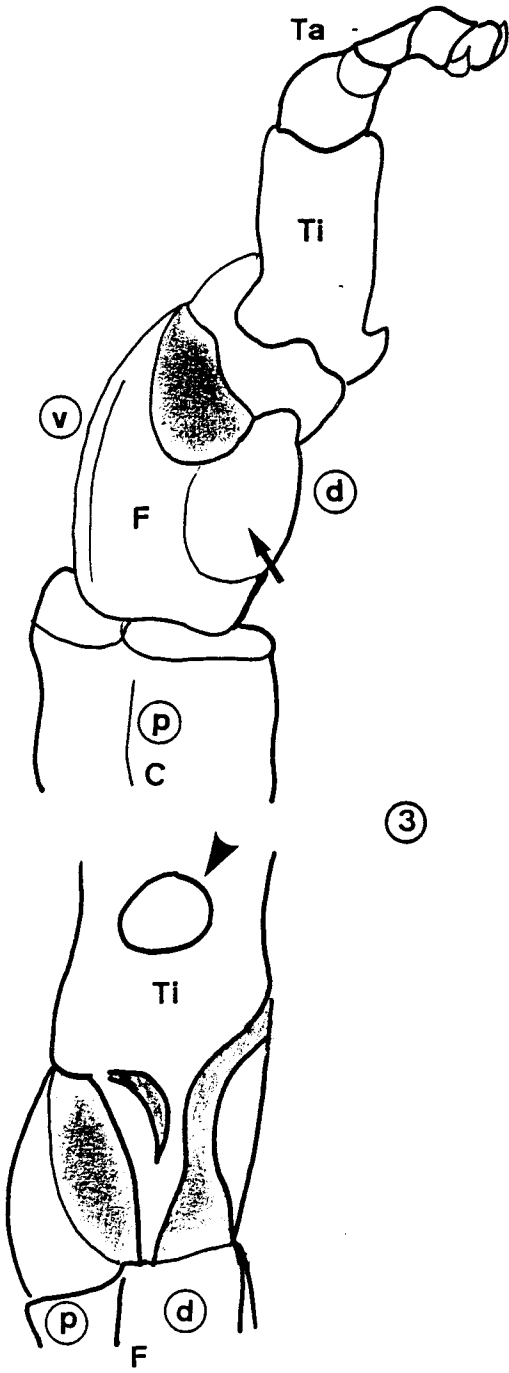
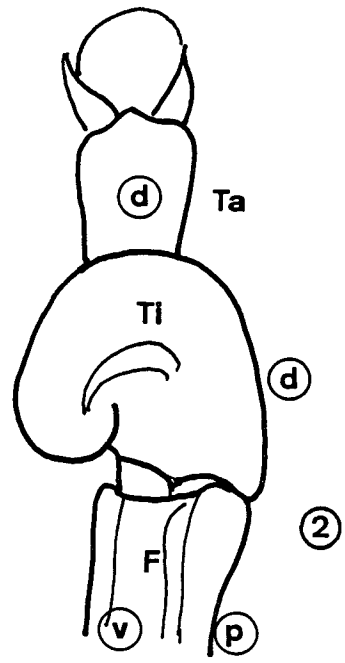
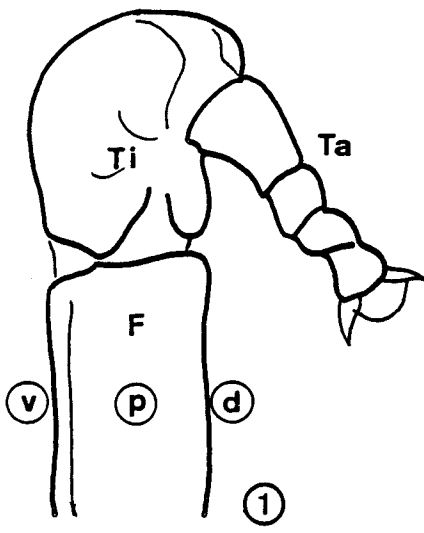
2 - Injection du côté ventral de 20 ng de protéines chez un régénérat en phase 3. Le régénérat, au stade V, présente une déficience ventrale antérieure qui donne un aspect enroulé au tibia.

3 - Injection du côté dorsal de 20 ng de protéines chez un régénérat en phase 3. Au stade V, le fémur court présente une déficience dorsale et un renflement distal sur sa face postérieure (←). Le tibia possède deux mamelons : ventral et dorsal (◀) et la membrane articulaire fémoro-tibiale est grande sur les faces dorsale et postérieure.

4 - Moignon coxo-trochantérien qui a reçu, en phase 5, 50 ng de protéines du côté dorsal. Bien que la ligne de rétraction (►) ne soit qu'au 1/3 proximal de la coxa, le régénérat occupe tout le moignon. Deux articles évoluent dans des directions opposées (←→).

5 - 20 ng de protéines ont été injectées du côté ventral d'un régénérat en phase 6. Seuls les tarse sont perturbés, en particulier les euplantules sont anormalement positionnées voire inexistantes.

C, coxa ; d, face dorsale ; F, fémur ; p, face postérieure ; Ta, tarse ; Ti, tibia ; v, face ventrale.



b . Bourgeons de régénération en phase 5.

1 . Injection ventrale (7 cas)

La durée moyenne de l'intermue est de $39,4 \pm 6,6$ jours

- Aspects morphologiques

1 seul des 7 régénérats montre une anomalie : une déficience ventrale postérieure au niveau du tibia provoque son enroulement.

- Aspects histologiques (Pl. XVII, 3a et b)

Dans les deux moignons coxo-trochantériens fixés au 20e jour de l'intermue, soit environ 8 jours après l'injection, les régénérats ont une forme anormale. Les articles sont courts et trapus, leur surface épidermique montre des digitations, l'extrémité du tarse est perturbée. D'autre part, la rétraction épidermique est peu importante par rapport au développement du régénérat. Chez l'un, la ligne de rétraction se situe en haut de la coxa alors que le régénérat est replié et segmenté. Chez l'autre, elle atteint la moitié de la coxa alors que le régénérat est entièrement constitué. Dans la chambre de régénération, on observe des zones sombres correspondant au matériel injecté et le contenu de cette chambre diffère de celui d'un régénérat normal, du matériel fibreux est présent en grande quantité.

2 . Injection dorsale (3 cas)

La durée moyenne de l'intermue est de $43,3 \pm 4,5$ jours.

- Aspects morphologiques.

2 régénérats ont une allure normale. Le troisième présente une face dorsale, concave et deux bosses sur la face postérieure proximale du tibia.

- Aspects histologiques.

Le niveau de rétraction épidermique ne correspond pas à l'état d'évolution du régénérat. Ce régénérat présente sur la face dorsale du tibia un éperon. L'aspect du matériel de la chambre est semblable à celui précédemment décrit.

c . Bourgeons de régénération en phase 6 . Injection ventrale (5 cas)

La durée de l'intermue a été de 40 jours. Les régénérats obtenus ne présentent pas d'anomalie. Des coupes histologiques pratiquées dans un moignon coxo-trochantérien fixé 8 jours après l'injection montrent un régénérat, de forme aberrante, segmenté mais dont les articles sont difficilement identifiables. Au niveau du fémur, une excroissance est visible (Pl. XVII, 4). Ici

encore, bien que le régénérat soit segmenté, la ligne de rétraction épidermique n'a atteint que le haut de la coxa.

3. m.p. de faces ventrales

Une suspension membranaire de face ventrale de fémur contient environ 1000 ng de protéines. Les injections ont été pratiquées dans l'hémolymphe et dans la chambre de régénération de régénérats en phase 3, 5 et 6.

a . Hémolymphe (5 cas)

2 jours après l'autotomie, 20 ng de protéines sont injectés, dorsalement, directement dans l'hémolymphe.

La durée moyenne de l'intermue est de $29,6 \pm 4,7$ jours. Un seul des 5 régénérats obtenus au stade V présente une déficience dorsale postérieure du tibia et une membrane fémoro-tibiale plus grande à la jonction des faces dorsale et postérieure du tibia (Fig. 33, 1).

b . Bourgeons de régénération en phase 3

La quantité de protéines injectée est de 20 ng.

1 . Injection ventrale (3 cas)

La durée de l'intermue est de $33,6 \pm 1$ jours. L'un des 3 régénérats présente une déficience ventrale antérieure du tibia, ce qui confère au tibia un aspect enroulé (Fig. 33, 2).

2 . Injection dorsale (4 cas)

La durée de l'intermue est de $30,5 \pm 6,3$ jours.

• Aspects morphologiques

Sur les 4 régénérats obtenus, 2 ont une allure normale, 2 présentent des anomalies au niveau du fémur et du tibia. Chez l'un, le tibia court présente une déficience distale au niveau de la face postérieure et, un renflement à la partie proximale dorsale, qui surmonte une membrane articulaire plus grande que chez les témoins (Pl. XVIII, 3b). Chez l'autre, le fémur court présente une déficience dorsale et un renflement distal sur sa face postérieure. Le tibia possède deux mamelons : ventralement et dorsalement et la membrane articulaire fémoro-tibiale est grande sur les faces dorsale et postérieure (Fig. 33, 3).

• Aspects histologiques (Pl. XVII, 5)

Dans un moignon coxo-trochantérien fixé environ 12 jours après l'injection (20ème jour de l'intermue), la ligne de rétraction extérieure est toujours en haut de la coxa alors que le régénérat est bien développé. La forme du régénérat est aberrante avec de nombreuses digitations. Un matériel fibrillaire surmonte l'épiderme coxal et non celui du régénérat.

c . Bourgeons de régénération en phase 4 (21 cas)

Les régénérats ont reçu 1 seule injection dorsale (13 cas) ou 2 injections (8 cas) de 100 ng de protéines chacune. Dans les deux séries expérimentales, la durée de l'intermue est de $33 \pm 3,2$ jours, les résultats obtenus sont semblables et ont été regroupés.

Au stade V, 4 régénérats ne montrent pas de nécrose. 3 ressemblent à un régénérat témoin et 1 montre une légère déficience dorsale postérieure du tibia qui est très court. Pour ce régénérat, au stade adulte, le tibia a retrouvé une taille normale par rapport au fémur mais présente une torsion distale et de ce fait la face ventrale du tarse est en position dorsale.

Les 17 autres régénérats ont subi une nécrose plus ou moins importante au cours de l'intermue. Au stade V, 2 régénérats ont complètement disparu et il ne reste que la coxa, les 15 autres ont subi une nécrose partielle et portent encore un point de nécrose. Parmi ces 15 régénérats, 8 ont donné au stade VI les résultats suivants :

- * 3 régénérats bien segmentés mais petits
- * 2 régénérats mal segmentés, très petits, avec une déficience ventrale du fémur
- * 1 régénérat où le fémur est bien distinct et le tibia qui se présente comme un blastème de régénération
- * 2 cas où la nécrose s'est poursuivie au cours de l'intermue et où seul le trochanter a persisté

d . Bourgeons de régénération en phase 5 (7 cas)

50 ng de protéines ont été injectés du côté dorsal. La durée de l'intermue est de $33,3 \pm 6,2$ jours. Tous les régénérats obtenus sont normaux. Cependant, dans un moignon coxo-trochantérien, nous avons observé l'apparition d'un régénérat anormal (Fig. 33, 4). Malheureusement, cet animal est mort au bout de 37 jours sans avoir mué. La ligne de rétraction se situe au 1/3 proximal de la coxa et le régénérat occupe tout le moignon coxo-trochantérien, ce qui ne se produit jamais lorsque le régénérat est en phase 6 (ligne de

rétraction épidermique au 1/3 proximal de la coxa). Sur la face ventrale d'un article qui semble être le tibia, on aperçoit deux formations qui ont des directions opposées : l'une à allure de tarse s'est développée en direction distale, l'autre a poussé en direction proximale. La formation qui a grandi en direction proximale est très développée puisqu'elle atteint le segment thoracique et se replie même à son extrémité (Pl. XVIII, 3b).

Régénérat	MP	F.A.D.P.			F.D.			F.V.		
	I	ng	R	N	ng	R	N	ng	R	N
P2 H	D							20	5	4
P3	V				50	3	3	20	3	2
	D							20	4	2
P4	V	100	12	9						
	D							100	21	4
P5	V				50	7	6			
	D				50	3	1	50	7	7
P6	V				50	5	5	20	4	4

Tableau XVII : Résultats au stade V des injections (I) dorsales (D) ou ventrales (V) de membranes plasmiques (MP) de faces fémorales de pattes méso et métathoraciques (F.A.D.P. : faces antérieures postérieures et dorsales ; F.D. : faces dorsales ; F.V. : faces ventrales) dans le moignon coxo- trochantérien à différents moments dans l'intermue; injections pratiquées dans l'hémolymphe (H) pour la phase P2 et dans la chambre de régénération pour les autres phases . La quantité de protéines figure en nanogrammes (ng). (H : hémolymphe ; N : nombre de régénérats normalement constitués ; R : nombre de régénérats obtenus).

e . Bourgeons de régénération en phase 6 (4 cas)

20 ng de protéines ont été injectés du côté ventral. La durée de l'intermue a été de 19 jours. Chez ces régénérats, seul le tarse est perturbé en particulier les euplantules sont absentes ou anormalement positionnées. (Fig. 33, 5)

III - DISCUSSION et CONCLUSION

Nous discuterons d'abord de la durée de l'intermue puis des caractères des régénérats obtenus. Ensuite nous aborderons le problème de l'apparition des plages brunes qui, nous l' avons vu, n'est pas spécifique de ce type d' injection .

1 . La durée de l'intermue

Pour l'ensemble des séries expérimentales, la durée des intermues est récapitulée dans le tableau XVIII

mp	T	He	P3		P4		P5		P6
			V	D	V	D	V	D	V
Tp	29,8±2								
T			30,8±2,7		28,5±3,3				
S						25,6±2,3			
Fa,p,d					44,5±2,2				
Fd			39,6±2,3				39,4±6,6	43,3±4,5	40
Fv		29,6±4,7	33,6±1,1	30,5±6,3		33±3,2		33±6,2	30±3,1

Tableau XVIII : Durée de l'intermue d'animaux qui ont reçu, dans l'hémolymphe (He) ou dans la chambre de régénération de régénérats en phases (P) 3,4,5 ou 6, des injections dorsales (d) ou ventrales (v) de suspensions membranaires (mp) de : tergites (T) ; sternites (S) ; faces antérieures, postérieures et dorsales (Fa,p,d) ; faces dorsales (Fd) ou ventrales (Fv) de fémurs. Les témoins (T) n'ont reçu que du tampon (Tp).

Les injections de membranes plasmiques fémorales ventrales ne perturbent pas la durée de l'intermue. En revanche, il est surprenant de noter que les injections de membranes plasmiques de faces dorsales de fémurs allongent de façon significative la durée de l'intermue (allongement minimal de 10 jours environ), allongement qui se produit également avec les injections membranaires de faces antérieures, postérieures et dorsales de fémurs. La cause de cet allongement ne peut pas être la nécrose puisque chez 17 des 21 animaux parvenus en stade V, après l'injection du côté dorsal de membranes plasmiques fémorales ventrales, une nécrose totale ou partielle s'était produite et qu'aucune augmentation de la durée de l'intermue n'a été observée.

Avec des doses de 100 ng de protéines, seules les injections membranaires de faces antérieures, postérieures et dorsales de fémurs augmentent la durée de l'intermue. Avec les injections membranaires de faces ventrales de fémurs, malgré des doses variées de protéines (20, 50 et 100 ng), la durée de l'intermue ne diffère pas de façon significative. En revanche, la dose de 50 ng de protéines provenant de faces dorsales de fémurs allonge la durée de l'intermue. Par conséquent, il ne semble pas qu'il y ait une relation directe entre l'allongement de la durée de l'intermue et la dose injectée.

2 . La régénération

Dans la majorité des cas, les régénérats obtenus sont normalement constitués ou peu différents de régénérats normaux. Cependant, l'examen des moignons coxo-trochantériens d'animaux, qui n'ont pas mué, révèle des anomalies. Par conséquent, nous discuterons dans un premier temps de l'aspect des moignons puis, dans un deuxième temps, de celui des régénérats.

a. les moignons coxo-trochantériens.

Comparativement à un moignon coxo-trochantérien témoin, dans les moignons qui ont reçu une suspension de membranes plasmiques épidermiques, on remarque que :

- le matériel de la chambre de régénération est plus dense et plus fibreux,
- le niveau de rétraction de l'épiderme ne correspond pas au développement du régénérat. Pour un même niveau de rétraction, le régénérat est plus évolué bien que de forme irrégulière et le plus souvent digitée. Le fait que l'épiderme ne se sépare pas de la cuticule peut être mis en parallèle avec les difficultés qu'ont ces animaux à muer, le fonctionnement de l'épiderme

correspondant à un état physiologique donné. L'évolution du régénérat est indépendante de la rétraction de l'épiderme coxo-trochantérien.

Des excroissances ont été observées sans qu'il nous soit possible d'affirmer qu'il s'agisse de centre morphogénétique ou d'appendice surnuméraire. Un régénérat tout à fait anormal s'est mis en place. Alors que la rétraction n'avait atteint que le 1/3 proximal de la coxa, le régénérat occupait tout l'espace laissé par cette rétraction. Deux formations, grandissant en direction opposée, ont pu être observées : l'une à allure de tarse dirigée distalement, l'autre très grande, repliée à son extrémité, atteignait le segment mésothoracique. Ces formations étaient situées dans le secteur ventro-postérieur alors que nous avons réalisé une injection dorsale de membranes plasmiques fémorales ventrales.

b. Les régénérats

Lorsque les régénérats sont anormaux, les anomalies se traduisent essentiellement par : des déficiences du côté de l'injection, une membrane articulaire fémoro-tibiale plus grande du côté injecté et un tarse perturbé.

La plage articulaire fémoro-tibiale a atteint la base du tarse lorsque la face tibiale correspondante était déficiente.

Les déficiences se produisent principalement au niveau du tibia. De plus, elles sont plus nombreuses lorsque les injections sont pratiquées dans la chambre de régénération de bourgeons jeunes (P3 et P4) et que les bourgeons de régénération sont abîmés à l'injection. Ceci est particulièrement visible pour les injections ventrales de membranes plasmiques de sternites dans la chambre de régénération de bourgeons en phase 4 puisqu'au stade V, 75% des bourgeons lésés présentent une déficience contre seulement 30% des bourgeons non lésés.

Les perturbations du tarse se traduisent principalement par l'absence d'articles ou des modifications des euplantules.

Il semble que les membranes plasmiques de faces ventrales de fémurs entraînent plus de perturbations au niveau des régénérats. Injectées dans des moignons coxo-trochantériens en phase 4, elles ont même entraîné un grand nombre de nécroses. Ceci est d'autant plus surprenant que les durées les plus grandes ont été observées avec les membranes plasmiques fémorales dorsales. Toutefois, la quantité de protéines injectée ne semble pas en cause puisque, la quantité de 100ng a été utilisée pour les membranes plasmiques de faces antérieure, postérieure, dorsale de fémurs et pour celles de tergites et de sternites. Alors que, pour les

faces ventrales de fémurs, des quantités variables et en général inférieures ont été injectées.

On peut également remarquer que 2 des régénérats qui présentaient une nécrose partielle au stade V ont une déficience ventrale au stade VI bien que l'injection ait été dorsale.

Malgré des injections répétées, les résultats sont semblables.

Nous n'avons pas réalisé d'études histologiques de l'évolution du matériel injecté dans la chambre de régénération. Dans certains moignons fixés ou observés à la loupe binoculaire, nous avons noté, au niveau de la zone d'injection, la présence de zones sombres qui indiquent une certaine nécrose du matériel injecté. Dans ces cas, en l'absence de contact direct entre l'épiderme du régénérat et le matériel injecté, on ne peut quand même pas exclure une possibilité d'action de molécules provenant des membranes plasmiques injectées sur le régénérat en formation.

Dans l'ensemble, les injections de membranes plasmiques de cellules épidermiques ont entraîné la formation de zones articulaires plus grandes et des déficiences, principalement du tibia. Contrairement à nos espérances, nous n'avons pas obtenu de formations surnuméraires. En cours d'intermue, certaines morphogénèses ont paru comporter des structures surnuméraires. Nous n'avons cependant pas obtenu de confirmation quand la mue a pu se faire normalement et d'autre part, les animaux les plus intéressants sont morts sans exuvier.

Des coupes histologiques de moignons coxo-trochantériens, pratiquées entre 5 et 12 jours après l'amputation, montrent souvent des ruptures de l'épiderme du côté injecté. Il existe peut-être une relation entre cette rupture et l'apparition d'une déficience puisque lorsque nous avons volontairement abîmé le régénérat (injection de membranes plasmiques d'épiderme sternal), 9 des 12 régénérats obtenus présentaient une déficience du côté lésé. Excepté les faces dorsales, tous les fragments tissulaires ont été soumis aux ultra-sons. De ce fait, on pouvait espérer une homogénéisation et une mise en suspension des substances telles qu'elles agissent au niveau des cellules épidermiques engagées dans le processus de différenciation. Dans la majorité des cas, ils ont provoqué la rupture de l'épiderme vraisemblablement liée à un problème de toxicité. Cette rupture s'accompagne sans doute d'une destruction plus large de l'épiderme. Dans le cadre du modèle de FRENCH et col. (1976), les discontinuités transversale et proximale qui en résulteraient devraient entraîner des morphogénèses compensatrices intercalaires et par conséquent, une absence de déficience. Or, BART (1969) a établi que pour les pattes larvaires et les jeunes régénérats de *Carausius*, les discontinuités transversales consécutives à l'ablation d'un secteur correspondant environ à 1/4 de la périphérie ne provoquent pas de morphogénèse

intercalaire. Dans le régénérat en formation, cette propriété est donc déjà déterminée. Quant à l'effet d'une discontinuité proximo-distale qui provoque effectivement une morphogenèse intercalaire au niveau de régénérats et de pattes larvaires, il faut souligner que nous constatons, dans les cas de déficience, une continuité entre les membranes articulaires de deux articulations successives. Celles-ci n'ont manifestement pas d'informations de position susceptibles de déclencher une morphogenèse, comme le propose d'ailleurs le modèle du gradient segmentaire de différenciation proximo-distale de BOHN (1967). De ce fait, même si la lésion entraîne des affrontements de niveaux différents dans le sens transversal, les différences quantitatives sont insuffisantes pour provoquer une morphogenèse. Les déficiences pourraient être dues :

- soit à une absence de discontinuité
- soit à une incapacité à combler une discontinuité dans le sens transversal. Dans les deux cas, une lésion pourrait être responsable soit d'une association de niveaux semblables dans le sens proximo-distal, soit des affrontements de niveaux différents dans le sens transversal et de ce fait une cicatrisation non suivie de morphogenèse serait observée. Ces modèles s'adressent à des pattes différenciées et ne sont peut-être pas complètement transposables à notre matériel puisque dans notre cas la segmentation, si elle a débuté, n'est pas complète et par ailleurs la différenciation n'étant pas effectuée, la régulation est moins avancée que dans une patte larvaire.

Un régénérat en formation s'apparente à une patte embryonnaire. Chez *Carausius*, la morphogenèse de la patte embryonnaire est interprétée par FOURNIER (1971) en terme de gradients emboîtés : proximo-distal et transversal. Pour cet auteur, le maximum des gradients transversaux se situe au milieu des faces antérieure et postérieure et le minimum, situé au milieu des faces ventrale et dorsale, ne contiendrait pas de gradients indispensables à la morphogenèse. Selon ce modèle, la face ventrale serait donc moins capable de réagir à une lésion.

De même, l'apparition de membranes articulaires fémoro-tibiales plus grandes peut être rapprochée des résultats de WRIGHT et LAWRENCE (1981) et de FRENCH (1980). Pour ces auteurs, la reconstitution d'une membrane articulaire est le résultat normal de l'affrontement d'extrémités segmentaires. Les lésions des régénérats en formation ont pu entraîner de telles confrontations ou, simplement, la nécrose liée à la lésion d'une future zone articulaire a engendré une prolifération plus importante de cette zone articulaire. BART (1969) avait observé qu'une membrane articulaire coxo-pleurale transplantée dans la coxa était capable de s'agrandir de façon importante.

3 . Les plages brunes

L'injection, en particulier de rouge de ruthénium ou de suspensions membranaires, dans la chambre de régénération a entraîné la formation de plages brunes au niveau principalement des tergites du mésothorax, du métathorax et des premiers segments abdominaux.

Ces plages apparaissent une dizaine de jours après l'injection. Leur taille augmente au cours de l'intermue jusqu'à occuper pratiquement tout le tergite et le sternite. Elles rigidifient la cuticule, aussi, lors de l'exuviation, la cuticule ne se rompt-elle pas normalement au niveau de la ligne de déhiscence. De ce fait, les animaux restent emprisonnés dans leur exuvie. Ces plages brunes sont rejetées avec l'ancienne cuticule et la nouvelle cuticule a un aspect normal et non cicatriciel. Notons que dans l'élevage, il arrive que certains animaux présentent quelques petites taches brunes, ce phénomène est peu fréquent et la taille des taches est très petite.

En histologie, bien que des déchirures surviennent fréquemment au niveau des plages lors de la confection des coupes, ce qui complique les observations, on s'aperçoit qu'il n'y a pas de digestion cuticulaire à leur niveau. Leur épaisseur est celle qu'elles avaient avant l'apparition du liquide exuvial (Pl XVI, 5.).

Au moment de l'injection, l'endocuticule est en partie déposée. La modification de cette endocuticule et de celle qui continue à se déposer est donc en relation avec les injections. S'agit-il d'un rapport direct ou indirect ? Quelle que soit la substance injectée, le phénomène observé est le même. Ces substances doivent donc intervenir dans un processus physiologique.

Chez les Insectes, nous savons que le brunissement de la cuticule après la mue est dû aux protéines tannées, riches en tyrosine et à la mélanine. Plusieurs voies métaboliques permettent la transformation de la tyrosine en mélanine et sclérotine (CHRISTENSEN et NAPPI, 1988). La mélanine est un pigment brun qui provient de l'oxydation de la tyrosine. Chez *Carausius*, la synthèse de la mélanine est sous la dépendance d'une neurohormone produite par le ganglion sous-oesophagien (RAABE, 1983). La tyrosine est présente dans l'hémolymphe et se transforme en pigment mélanique au niveau des blessures. Avec nos injections, le processus est différent dans la mesure où ces plaques brunes apparaissent dans des endroits éloignés du point d'injection et dans des zones non blessées. Certains auteurs, (HACKMAN et GOLDBERG, 1968) ont montré que chez *Lucilia*, une prophénoloxydase passe de l'hémolymphe dans la

cuticule et transforme la tyrosine en mélanine. Cependant, pour LOCKE et KRISHNAN (1971), les prophénoloxydases du sang ne sont pas impliquées dans le durcissement et le brunissement de la cuticule. Toutefois, ils n'excluent pas la possibilité d'un contrôle de ce processus par un facteur issu du sang.

Les injections, dans l'hémolymphe, d'héparine, substance qui agit sur la coagulation de l'hémolymphe, a parfois provoqué la formation de plages, mais de taille nettement plus faible que celles produites après injection de rouge de ruthénium et de membranes plasmiques épidermiques dans la chambre de régénération.

Nos connaissances actuelles ne nous permettent pas d'avancer une interprétation convenable de l'apparition de ces plages dans la cuticule. S'agit-il d'une réponse de l'hémolymphe à la toxicité des produits injectés ou simplement le passage de ces produits dans l'hémolymphe déclenche-t-il un processus de mélanisation ? Des recherches complémentaires sont nécessaires pour répondre à ces questions et pour expliquer ce phénomène.

CHAPITRE VI**INJECTION DE LECTINES ET DE SUCRE**

Nous avons démontré la présence de glycoprotéines dans le contenu de la chambre de régénération et à la surface des cellules épidermiques du régénérat. Par ailleurs, chez les Insectes, les antigènes de position sont des glycoprotéines membranaires (WILCOX et col., 1984). C'est pourquoi, nous avons tenté de modifier ces glycoprotéines de façon à perturber la morphogenèse régénératrice. Pour cela, nous avons procédé de deux façons :

1. nous avons essayé de bloquer les sucres par des lectines qui ont la propriété de se lier spécifiquement à un sucre (GOLDSTEIN et col., 1980).

2. nous avons tenté de provoquer une surabondance de N-acétyl-galactosamine en injectant ce sucre. Ce sucre a été choisi car la HPA-FITC a révélé son abondance naturelle dans le matériel de la chambre de régénération et à la surface des cellules épidermiques du régénérat. Nous espérons de cette façon modifier la synthèse de la partie glucidique des glycoprotéines.

I - INJECTION DE LECTINES

Le choix des lectines injectées, Con A, HPA et WGA a été guidé par la présence dans notre matériel de mannose, N-acétyl-D-galactosamine et N-acétyl-D-glucosamine. Les solutions utilisées pour les fixations de lectines fluorescentes ont été reprises.

Le choix des phases de régénération a été guidé par la raison suivante, nous voulions intervenir:

- 1) sur le régénérat au tout début de sa formation or ce n'est qu'en phase 3 qu'il est possible d'injecter dans la chambre de régénération
- 2) sur le régénérat bien formé et segmenté.

A - Résultats

1. Concanavalline A. (Tableau XIX)

Des injections ventrales ont été réalisées dans la chambre de régénération de régénérats en phases 3, 6 ou 7.

a . Durée de l'intermue

Pour une phase donnée, les durées de l'intermue ne diffèrent pas significativement, quelle que soit la dose injectée. En revanche, une dose donnée provoque des différences significatives selon les phases où elle est injectée. La durée de l'intermue est plus grande lorsque les

injections ont lieu en phase 6, c'est-à-dire au moment où le régénérat se replie dans le moignon coxo-trochantérien.

b . Régénérats

Dans l'ensemble, les perturbations des régénérats sont peu importantes et ne semblent pas dépendre de la dose injectée ou de la phase à laquelle l'injection a lieu.

Phases Doses (ng)	P3			P6			P7		
	N	T	I	N	T	I	N	T	I
T			24,7±3,8			28,7±0,5			
10	3	4	23 ± 1,2	4	5	27,4±0,5			
50	3	4	24,5±0,5	6	7	29,5±2,3			
100				5	8	27,1±2,2	3	4	22 ± 2,9

Tableau XIX : Résultats, au stade V, des injections de Con A dans la chambre de régénération de régénérats en phases 3, 6 ou 7. Les doses injectées sont exprimées en nanogrammes(ng). I, durée de l'intermue en jours ; N, nombre de régénérats normaux obtenus ; T, nombre total de régénérats.

Seuls 8 des 32 régénérats obtenus au stade V sont "anormaux" et se présentent de la façon suivante :

* 1 cas avec excédent, des excroissances sont présentes dans la partie proximale des faces dorsales du tibia et du fémur.

* 1 cas avec déformation, à l'extrémité distale du tibia, les carènes dorsales se sont déplacées en direction ventrale.

* 6 cas avec déficience :

- le tibia est court et l'onychium du tarse mal formé (1 cas)

- les articles du tarse se télescopent et une masse brune à allure de griffe apparaît sur le dernier article tarsal (1 cas)

- la face dorsale du tibia est déformée et possède de petites excroissances cuticulaires, la membrane articulaire fémoro-tibiale est très développée ventralement (1 cas, Fig.34, 1)

- fémur et tibia présentent une déficience ventrale (1 cas)
- la face dorsale du tibia est déficiente ; par ailleurs, la membrane articulaire fémoro-tibiale est absente sur la face ventrale et le tarse est peu développé (1 cas) (Fig. 34, 2)

2. Agglutinine d'*Helix pomatia* (Tableau XX)

Pour cette lectine, seule la dose de 100 ng a été injectée ventralement dans la chambre de régénération de régénérats en phase 3, 5 ou 6.

1. Durée de l'intermue

Dans tous les cas, la durée de l'intermue, qui est d'environ 40 jours est augmentée. Cette augmentation est conséquente puisque l'intermue dure 15 jours de plus que lors des injections de Con A.

2. Régénérats

Sur l'ensemble des 13 régénérats obtenus, 2 seulement n'ont pas une allure normale. Chez l'un, la partie distale du tibia est déformée. Chez l'autre, la face dorsale du tibia est concave, celle du 1er article tarsal déficiente et la hauteur de la coxa équivaut à la moitié d'une coxa témoin. (Fig. 34, 3).

Phase Inj	P3			P5			P6		
	N	T	I	N	T	I	N	T	I
T			24,7±3,8						28,7±0,5
HPA	3	3	40,3 ± 2,5	2	3	41,3 ± 6,4	6	7	40,28 ± 6,5

Tableau XX: Résultats au stade V de l'injection de 100 nanogrammes (ng) de HPA dans la chambre de régénération de régénérats en phases 3, 5 ou 6. I, durée de l'intermue en jours; N, nombre de régénérats normaux ; T, nombre total de régénérats.

3 . Agglutinine de germe de blé (Tableau XXI).

Différentes doses de WGA ont été injectées à différents moments dans l'intermue qui suit une autotomie. Que les injections aient été pratiquées dorsalement ou ventralement, les résultats sont semblables et ont donc été regroupés.

a . Durée de l'intermue

Elle varie peu en fonction des doses injectées et des phases d'injection. Elle est sensiblement la même que pour les injections de Con A.

b . Régénérats

Phases Doses (ng)	P3			P6			P8		
	N	T	I	N	T	I	N	T	I
T			24,7±3,8			28,7±0,5			
10	4	4	22	4	4	25,5±0,5			
50	6	7	24,2±0,4	4	6	28,1±1,7	7	15	23,8 ±2,2
100				1	3	22,6±2,8	5	12	24,9 ±3,2

Tableau XXI : Résultats au stade V de l'injection de différentes doses exprimées en nanogrammes (ng) de WGA dans la chambre de régénération de régénérats en phases 3, 6 ou 8. I, durée de l'intermue; N, nombre de régénérats; T, nombre total de régénérats.

Que la dose de 10 ng soit injectée en phase 3 ou en phase 6, tous les régénérats sont normaux.

Avec la dose de 50 ng, lorsque les injections ont lieu en phase 3 ou 6, dans l'ensemble les régénérats sont normaux (respectivement 6/7 et 4/6). Les anomalies se traduisent par un très petit régénérat (P3) et 2 régénérats dont l'extrémité tibia-tarse est enroulée (P6). Lorsque les injections ont lieu en phase 8, soit juste avant la mue, et uniquement du côté ventral, dans 8 cas

sur 15, la cuticule de la face dorsale du fémur (5 cas) présente des ornements particuliers en forme d'écailles et en nombre variable (Fig. 34, 4).

Avec la dose de 100 ng, en phase 6, 1 des 3 régénérats obtenus possède un mamelon sur la face dorsale du tibia. Injectée en phase 8, 5 des 12 régénérats obtenus ont une ornementation cuticulaire en écailles sur la face dorsale du fémur. L'un de ces animaux, parvenu au stade VI, présente à l'emplacement des écailles une plage transparente non pigmentée à allure de tissu cicatriciel.

B - Conclusion

Seules les injections de WGA juste avant la mue provoquent des modifications spécifiques à savoir, des modifications cuticulaires. Les injections ont été pratiquées ventralement alors que ces modifications sont localisées dorsalement et ne sont pas dues à des lésions provoquées mécaniquement lors de l'injection.

II - INJECTION DE N- ACETYL-D- GALACTOSAMINE (Tableau XXII)

10 µg de Gal Nac ont été injectés à travers la membrane coxo-trochantérienne ventrale d'un moignon en phase 3, 5 ou 6

A - Durée de l'intermue

Quelle que soit la phase du régénérat au moment de l'injection, la durée de l'intermue est d'environ 35 jours. Par rapport à une intermue normale ou aux injections de Con A ou de WGA, la durée de l'intermue est allongée mais de façon moindre qu'à la suite d'injections de HPA.

B. Régénérats

Au cours de l'intermue qui suit les injections, la rétraction épidermique ne constitue pas une ligne nette comme chez les témoins. A l'approche de la mue, bien que l'épiderme coxal soit séparé de la cuticule, la rétraction est plus proximale du côté ventral que du côté dorsal (Fig. 34,5).

14 des 18 régénérats sont normaux.

Figure 34

Résultats de l'injection dans la chambre de régénération de lectines et de GalNac.

1 et 2 - Injection de ConA . Régénérats en stade V.

1 - La face dorsale du tibia est déformée et possède des petites excroissances cuticulaires. La membrane articulaire fémoro-tibiale est très développée du côté ventral (→).

2 - La face dorsale du tibia est déficiente et le tarse peu développé (→).

3 - Injection de HPA. Au stade V, ce régénérat possède une face dorsale concave (↶) et une déficience dorsale du 1er article tarsal.

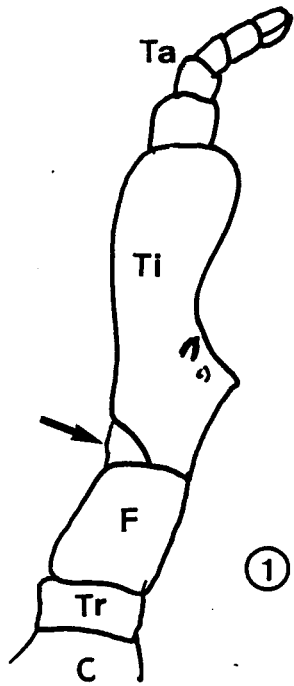
4 - Injection de WGA chez des régénérats en phase 8. La face dorsale du fémur montre des ornementations cuticulaires en forme d'écailles.

5 et 6 - Injection de Gal Nac.

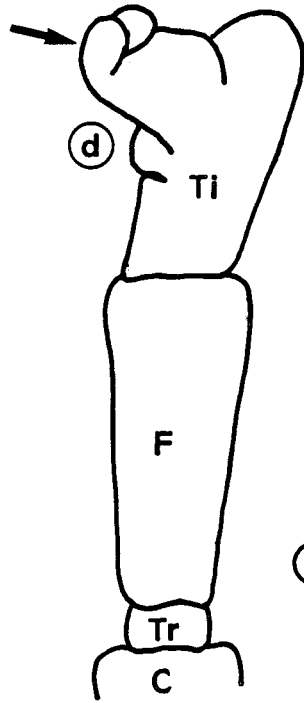
5 - A cours de l'intermue qui suit l'injection, la rétraction épidermique (▶) est plus proximale du côté ventral que dorsal (←).

6 - Chez un régénérat au stade V, bien que l'injection ait été pratiquée ventralement, il y a une déficience dorsale du fémur et du tibia.

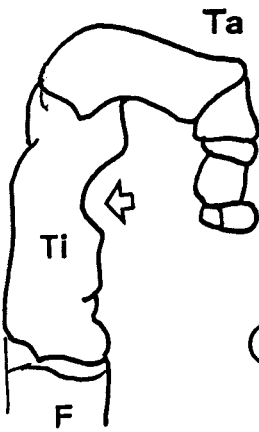
C, coxa ; d, face dorsale ; F, fémur ; Ta, tarse ; Ti, tibia ; Tr, Trochanter ; v, face ventrale.



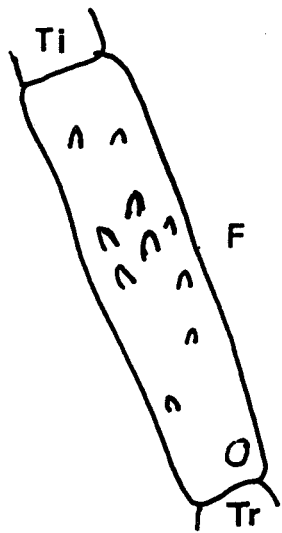
①



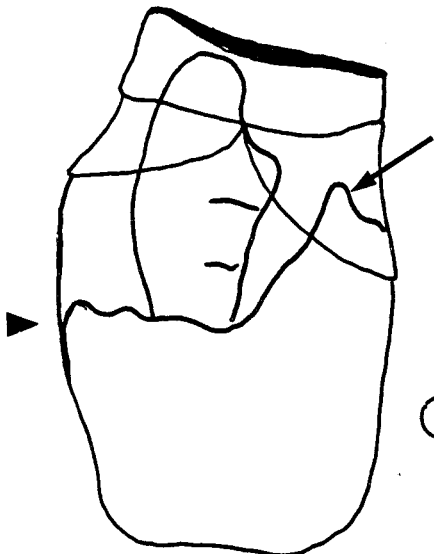
②



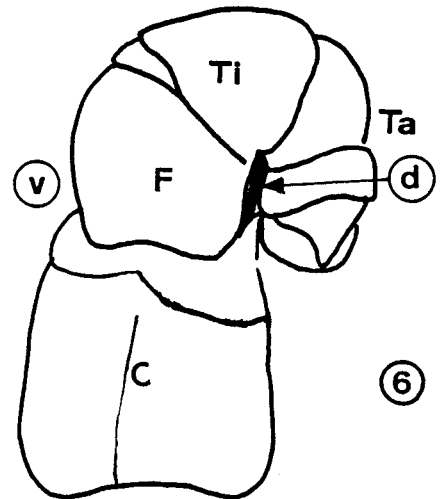
③



④



⑤



⑥

Les anomalies se traduisent par des déficiences (injections en P3 et P5) ou un tarse légèrement perturbé (injection en P6) :

- dans 1 cas, les faces dorsales du fémur et du tibia manquent, bien que l'injection ait été pratiquée ventralement (Fig. 34, 6)
- dans 2 cas, un secteur postéro-ventral du tibia est absent
- dans 1 cas, la face ventrale du tibia est déficiente.

Phase Inj	P3			P5			P6		
	N	T	I	N	T	I	N	T	I
T			24,7±3,8						28,7±0,5
GalNac	3	5	34,2 ± 5,4	4	5	35,1 ± 3,9	7	8	35 ± 4,9

Tableau XXII : Résultats au stade V de l'injection de 10 µg de Gal Nac dans la chambre de régénération de régénérats en phase 3, 5 ou 6. I, durée de l'intermue; N, nombre de régénérats normaux; T, nombre total de régénérats

III - DISCUSSION et CONCLUSION

Comparativement aux injections précédentes, les différences spécifiques concernent l'aspect cuticulaire. Elles ont été observées à la suite d'injection de WGA chez des bourgeons de régénération en phase 8. La WGA se fixe spécifiquement sur la Glc Nac et la Glc Nac entre dans la composition de la chitine. La WGA peut donc agir à ce niveau mais ceci est peu vraisemblable puisque l'épicuticule qui est la première couche cuticulaire à apparaître est normalement imperméable. Ce résultat est surprenant puisque les injections sont faites ventralement et que, dans la moitié des cas, les modifications cuticulaires sont observées du côté dorsal, cependant le matériel injecté a pu diffuser du côté dorsal et agir à ce niveau. Il faut également remarquer qu'à la mue suivante ces écailles disparaissent. Il s'agit donc d'une modification transitoire de la formation de la cuticule.

C'est avec les injections de Gal Nac et principalement de HPA que nous avons observé de réels allongements de la durée de l'intermue. Par conséquent, même si dans l'ensemble, les régénérats sont normaux, la physiologie de l'animal est perturbée bien que les quantités soient faibles et non en contact direct avec l'hémolymphe.

En conclusion, il semble donc que ces substances aient une action sur les cellules du régénérat en formation. Cependant, la modification des sucres contenus dans le matériel de la chambre de régénération, contrairement à nos espérances, n'a pas entraîné de perturbation de l'information de position des cellules et donc de morphogènes régénératrices surnuméraires. Deux raisons peuvent être invoquées :

1. les doses injectées étaient insuffisantes. Pour en être sûr, il faudrait pouvoir injecter des doses plus fortes, proches de la saturation qui, pour les lectines, seraient environ 10 fois plus fortes que la dose la plus forte que nous ayons utilisée. L'essai n'a pas pu être réalisé car la viscosité du produit empêchait toute injection.
2. les substances injectées pénètrent trop rapidement dans les cellules et n'ont pas le temps d'avoir une action. Pour vérifier ceci, il faudrait réaliser un contrôle de la persistance des lectines dans la chambre de régénération ou à la surface des cellules épidermiques.

Cependant, des doses de même ordre utilisées dans le milieu de culture de cellules de *Drosophile* permettent la fusion des cellules et surtout agissent sur la perméabilité membranaire des cellules (RIZKI et col, 1977). Chez le triton adulte, la fermeture d'une plaie est ralentie par une action locale de ConA (DONALDSON et MASON, 1977) et de la Glc Nac inhibe la migration des cellules épidermiques sur un support recouvert de collagène ou de fibrinogène (ATNIP et col, 1987). Dans notre cas, nous avons tenté d'agir sur des cellules adhérant étroitement entre elles mais cependant à des stades où les mitoses sont nombreuses et où, selon NOONAN et BURGER (1973), les liaisons avec les sucres des membranes sont plus nombreuses.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de notre travail était d'analyser à l'échelle cellulaire les processus de formation d'un régénérat de patte de phasme après autotomie. Dans un premier temps, afin de mieux connaître les étapes de mise en place et de croissance d'un régénérat, nous avons réalisé une analyse descriptive à l'aide de techniques histologiques, ultrastructurales et cytochimiques. En complément, une analyse expérimentale a été faite. Fondée sur des données expérimentales déjà établies et sur notre propre apport, elle a consisté à essayer de perturber la morphogenèse à l'aide de substances ou extraits variés susceptibles d'agir sur l'épiderme ou son cantonnement immédiat.

I - Analyse descriptive de la mise en place et du développement du régénérat

Cette étude nous a permis d'approfondir le processus de formation du régénérat et de caractériser les constituants chimiques présents au cours de la régénération.

A - Formation du régénérat

Nous avons établi une table de développement où nous avons distingué 8 phases qui permettent de situer les moments des interventions lors de l'expérimentation.

La régénération comporte trois étapes qui regroupent chacune plusieurs phases :

1. la fermeture de la plaie, P1 et P2.
2. la morphogenèse du régénérat, P3 à P6.
3. la croissance du régénérat, P7 et P8.

Une patte de phasme est constituée de cinq articles : la coxa, le trochanter, le fémur, le tibia et le tarse, lui-même composé de 5 segments et d'un onychium. Lorsqu'on provoque l'autotomie, la patte se rompt à la limite trochanter-fémur où se situe le niveau d'autotomie. L'hémorragie est limitée par la présence du diaphragme proximal. Un caillot se constitue et obstrue le moignon coxo-trochantérien resté en place. Rapidement, l'épiderme du trochanter, proche de la blessure, se décolle de la cuticule, migre vers l'axe du moignon et la plaie est cicatrisée environ 3 jours après l'autotomie. L'épiderme continue son décollement en direction proximale et, simultanément, le régénérat se forme. Entre le caillot, la cuticule du moignon coxo-trochantérien, l'épiderme du régénérat et l'épiderme en rétraction, un espace rempli de matériel constitue la chambre de régénération.

Pour une intermue qui dure environ 20 jours, la segmentation du régénérat débute à la phase 4, soit 7 jours après l'autotomie, le prétarse est délimité et une autre constriction se met en place entre celle du prétarse et l'épiderme coxal. En phase 5, soit 9 jours après l'autotomie, le prétarse,

le tarse non segmenté, le tibia, le fémur et le trochanter sont présents. En phase 6, 12 jours après l'autotomie, la segmentation du tarse est ébauchée. Lorsque la rétraction de l'épiderme a atteint le bas de la coxa, le régénérat ressemble à une petite patte. Il va continuer son accroissement jusqu'à occuper tout l'espace coxo-trochantérien. A l'exuviation, qui a lieu en moyenne 20 jours après le début du stade IV, une patte régénérée apparaît.

C'est l'article le plus distal qui apparaît le premier. Le sens de différenciation des articles est disto-proximal. Ce type de différenciation a été décrit par FOURNIER (1971) pour la patte embryonnaire de *Carausius* et par TRUBY (1983) pour la patte larvaire de *Peiplaneta americana*. Ces résultats diffèrent de ceux observés chez *Blatella germanica* par O'FARREL et STOCK (1954) qui parlent de différenciation proximo-distale.

L'activité mitotique débute au moment de la fermeture de la plaie dans l'épiderme en rétraction. La formation du blastème résulte d'un processus de morphallaxie. Les cellules environnantes se différencient, ce qui se manifeste visiblement par une dépigmentation. Ce ne sont pas uniquement les cellules immédiatement au voisinage de la plaie qui participent à l'élaboration du régénérat comme cela a été décrit par PENZLIN (1963), mais également les cellules du trochanter comme chez la blatte (TRUBY, 1983).

La migration cellulaire a lieu en l'absence de lame basale qui disparaît en même temps que l'épiderme se décolle de la cuticule et ne réapparaît que lorsque le régénérat est bien formé. L'apodème tendineux qui s'invagine au niveau du prétarse apparaît dès la phase 4. Les apodèmes fémoro-tibiaux sont visibles en phase 6 et les apodèmes tibio-tarsaux, en phase 7. Les masses musculaires qui s'insèrent sur ces apodèmes dérivent de massifs mésodermiques mis en place pendant la phase qui précède l'apparition des apodèmes. Ceci est en accord avec ce qui a été établi par FOURNIER (1971) pour la patte embryonnaire de *Carausius*. En effet, cet auteur a montré, par suppression chirurgicale des ébauches d'apodèmes, que les rudiments d'apodèmes régissent la ségrégation des futurs muscles.

B - Les constituants chimiques

Le régénérat est entouré d'une gangue transparente à aspect gélinifé qui remplit la chambre de régénération. Le matériel qui la constitue est fibrillaire et granulaire. Les fibres, dont l'épaisseur varie de 15 à 160 nm sont orientées parallèlement à l'axe proximo-distal du régénérat ; elles constituent à la surface du régénérat un réseau qui délimite des zones apparemment dépourvues de matériel. Quant au matériel granulaire, dont la taille varie de 0,5 à 4,5 μm , il est situé dans la zone proximale à proximité de l'épiderme en rétraction, dans la zone proche du régénérat ou plaqué contre la surface apicale du régénérat. Ces grains semblent expulsés par l'épiderme. Des hémocytes sont présents dans la chambre de régénération mais leur passage à travers l'épiderme n'a pas été observé.

Le matériel présent dans la chambre de régénération et à la face apicale des cellules épidermiques du régénérat est récapitulé sur la figure 8 (chapitre II). Il est constitué de : chitine non liée à des protéines, de GAGs non sulfatés tels l'acide hyaluronique et/ou la chondroïtine. Nous y avons décelé des sucres tels le mannose, la Glc Nac, la Gal Nac dont nous ne pouvons préciser s'ils sont libres et/ou partie constitutive de glycoprotéines. Parmi ces glycoprotéines, des composés apparentés à la fibronectine et au collagène IV des Vertébrés sont présents. Chez les Vertébrés, la fibronectine composant de la matrice extracellulaire est impliquée dans le guidage des mouvements morphogénétiques au cours de l'embryogenèse et facilite l'attachement et la migration des cellules en culture. Le collagène de type IV est un composant de la membrane basale. Généralement, les cellules appliquées à une membrane basale sont polarisées. La membrane basale oriente les déplacements cellulaires pendant la croissance d'un organe. Dans le régénérat en formation, le matériel qui constitue un liseré à la surface apicale des cellules du régénérat pourrait jouer le rôle de soutien en remplacement de la membrane basale qui est absente ou en reconstruction.

Peut-on assimiler le matériel de la chambre de régénération au liquide exuvial ? En effet, à la fin de l'intermue, l'épiderme se détache de la cuticule et en se rétractant (apolyse) laisse apparaître un espace rempli d'une substance visqueuse : le gel exuvial. Ensuite, l'épiderme commence la sécrétion d'une nouvelle cuticule. Le gel exuvial se transforme alors en fluide exuvial capable de digérer l'endocuticule de l'ancienne cuticule ; les produits de digestion sont réabsorbés. Selon KRAMER et col, (1985), ce fluide contient des protéines, en particulier des chitinases et des protéases, des polypeptides, des acides aminés mais pas de sucres. En revanche, selon WIGGLESWORTH (1972), le liquide exuvial contient de la Glc Nac et de la glucosamine. Chez les Collembolés, des granules denses aux électrons contiennent des précurseurs de chitinases et de protéases qui deviennent actives lorsque l'épicuticule est entièrement sécrétée (NOBLE-NESBITT, 1963). Des similitudes existent donc entre le matériel contenu dans l'espace exuvial tant du point de vue de la formation de cet espace puisque l'épiderme se détache de la cuticule que de la composition de ce matériel. Cependant, au moment où se produit la rétraction épidermique dans le moignon coxo-trochantérien, la couche d'endocuticule est peu épaisse. Quant à la composition, la différence essentielle porte sur l'existence de sucres. Bien que contrairement à KRAMER et col. (1985), WIGGLESWORTH (1972) décrive la présence de la Glc Nac et de la glucosamine, nous trouvons d'autres sucres tels le mannose et la Gal Nac. Nous avons également noté la présence de grains denses aux électrons mais ceux-ci sont présents dans la chambre avant la sécrétion d'une nouvelle cuticule. Le matériel de la chambre de régénération diffère quelque peu du fluide exuvial et ressemble en partie à de la cuticule puisqu'il contient de la chitine et des protéines, toutefois la chitine serait sous une forme libre. Comme le

liquide exuvial, ce matériel est sécrété par les cellules épidermiques et contient des substances présentes dans l'hémolymphe.

Nous ne pouvons pas définir de façon précise le rôle du matériel de la chambre de régénération. Nous pensons qu'il a un rôle protecteur et de soutien pour le régénérat. Le gel fortement hydraté maintient autour du régénérat un milieu et une structure favorable au développement du régénérat.

Les résultats expérimentaux de BART (1969, 1971), sur la patte de phasme montrent que les cellules possèdent une information de position. Par ailleurs, chez la Drosophile, les antigènes spécifiques de position sont des glycoprotéines (BROWER et col., 1984 ; WILCOX et col., 1984). Des glycoprotéines sont présentes en surface des membranes plasmiques des cellules épidermiques et du côté cuticulaire du régénérat. Toutefois, les techniques utilisées ne nous ont pas permis de visualiser une régionalisation et de conclure à la présence d'antigènes spécifiques de position .

II - Tentatives de perturbation de la morphogenèse régénératrice.

Nous avons tenté d'agir sur la cicatrisation par l'injection d'héparine dans le corps de l'animal et sur le développement du régénérat en injectant différentes substances dans la chambre de régénération. Dans les deux cas, à la mue suivante, les régénérats obtenus présentent des déficiences, avec parfois absence de tout ou partie de la zone proximale, et la durée de l'intermue a été augmentée. Nous considérerons donc les deux points suivants : la morphogenèse et la durée de l'intermue.

A - La morphogenèse

Les injections d'héparine, comme chez la blatte (BOHN, 1976) retardent la cicatrisation. La migration des tissus est moins rapide, aussi la fermeture de la plaie nécessite-t-elle une durée plus longue que celle qui suit une simple autotomie. Nous avons également noté que les divisions cellulaires surviennent plus tard que dans les tissus en migration et dans l'épiderme trochantérien. Les régénérats obtenus présentent des déficiences au niveau du tibia et du fémur. Ces déficiences affectent plus souvent la face ventrale (8 cas) que les autres faces (face dorsale, 5 cas ; face postérieure, 2 cas ; face antérieure, 1 cas). D'autre part, lorsque les régénérats sont petits, les parties distales sont les plus repérables et parfois même, seul l'onychium est présent. Ces régénérats ressemblent aux régénérats obtenus chez l'adulte après une autotomie pratiquée en fin de stade V ou en début de stade VI. Tout se passe comme si l'autotomie s'était produite à un moment où la période qui suit avait une durée insuffisante. Or, ce n'est pas le cas dans notre

expérimentation puisque les autotomies sont pratiquées au début de l'intermue et que celle-ci est très grande. En alternative, on peut considérer que les conditions physiologiques ne conviennent pas pour une régénération complète

Par ailleurs, plus l'autotomie est proche de l'injection qui est pratiquée au début de l'intermue, plus les régénérats sont anormaux. L'injection d'héparine entraîne donc des perturbations qui pourraient affecter les cellules et/ou la physiologie de l'animal. Les modifications cellulaires pourraient avoir lieu soit au niveau de la surface, soit au niveau du métabolisme cellulaire. Au moment de la cicatrisation, les nécroses qui se produisent peuvent également avoir un retentissement sur la morphogénèse. La faculté de répondre à une blessure varie selon les espèces et pour une même espèce, selon les secteurs épidermiques. Dans certains cas, l'apparition de structures segmentées à la suite d'association de niveaux différents ont conduit BULLIERE et SENDEL (1970) à considérer que des difficultés de cicatrisation avaient entraîné ce type de résultats, les cellules étant placées alors dans des conditions propices à la régénération. Dans notre cas, nous n'obtenons pas de formation surnuméraire mais des déficiences qui peuvent être également dues à des difficultés de cicatrisation.

Nous avons procédé à l'injection dans la chambre de régénération de rouge de ruthénium, de suspensions de membranes plasmiques de cellules épidermiques, de lectines et de sucre. Les régénérats obtenus diffèrent peu de ceux observés après les injections d'héparine. Les déficiences se situent le plus souvent du côté de l'injection ; cependant, dans quelques cas, des déficiences sont visibles du côté opposé à l'injection (membranes plasmiques 1/28, lectines 2/8, sucres 1/4). Ce sont les injections de suspensions membranaires de cellules épidermiques qui entraînent le plus de déficiences (35% contre 27,3% pour le rouge de ruthénium et 15,8% pour les lectines et la Gal Nac). Si les résultats sont semblables, les interprétations peuvent être différentes :

Avec le rouge de ruthénium, nous avons montré que les charges positives de ce produit étaient responsables des anomalies de régénération puisque lorsque ces charges sont neutralisées par le tampon phosphate, les régénérats sont normaux. D'autre part, les résultats dépendent des doses injectées ; plus les doses sont fortes, moins il y a de régénération. Les nombreux sites anioniques présents dans le matériel de la chambre et à la surface du régénérat sont neutralisés par le rouge de ruthénium. L'effet du rouge de ruthénium est à rapprocher de celui de l'héparine. Il perturbe l'intégrité de la nappe épidermique.

Avec les injections de suspensions membranaires de cellules épidermiques, nous espérons perturber la régénération en provoquant la genèse de régénérats surnuméraires comme cela a été réalisé expérimentalement par BART (1969). En effet, la mise en contact de cellules de faces opposées, portant des informations de position différentes, vraisemblablement au niveau de leur membrane plasmique, déclenche des morphogénèses. Si des interactions entre les fragments membranaires injectés et les cellules de l'ébauche du régénérat s'établissaient, on pouvait espérer l'obtention de formations surnuméraires. Les perturbations se traduisent uniquement par des déficiences bien que, chez des animaux qui n'ont pas mué, des excroissances aient pu être observées en cours d'intermue.

Le nombre des déficiences est faible après injection d'extraits de sternites du côté ventral et plus grand après les injections de tergites du côté ventral, faces antérieures, postérieures et dorsales de fémur du côté ventral, faces ventrales de fémurs du côté dorsal qu'après celles de sternites du côté ventral. Notons que les "faces dorsales de fémurs" injectées du côté ventral n'ont pas engendré de déficiences contrairement à celles de "faces antérieures, postérieures et dorsales de fémurs". Par ailleurs, la durée de l'intermue est plus grande pour les injections de "faces dorsales" ou de "faces antérieures, postérieures et dorsales" de fémurs, que pour celles de "faces ventrales" bien qu'il n'y ait pas eu de perturbation des régénérats après les injections de "faces dorsales".

Nous voyons que les effets engendrés par ces injections sont différents. Ceci peut être dû, soit aux qualités différentes de chaque face, soit à la réactivité différente du régénérat vis à vis des produits injectés. Malgré le soin apporté à la préparation du matériel et à l'injection, il est difficile d'affirmer que des fibres musculaires n'aient pas persisté sur les tergites et plus particulièrement sur les faces antérieures et postérieures où les muscles s'insèrent sur toute la hauteur de la face. Cependant, notons que les injections de "faces dorsales" n'entraînent pas de perturbation du régénérat. De même, chaque injection a pu différer quelque peu et, d'autre part, la zone du régénérat qui fait face à cette injection n'est pas obligatoirement la même. Le côté de l'injection ne semble pas avoir une influence puisque nous avons des anomalies de régénération pour les deux faces. Par conséquent, en dehors des facteurs liés à la technique, il est possible que la réactivité des tissus vis-à-vis des substances mises en présence soit différente. Il faut également remarquer que les bourgeons ayant atteint la phase 5 ne sont plus sensibles aux injections : tous les régénérats obtenus sont normaux.

Les lectines se lient aux sucres qui leur sont spécifiques. Les lectines injectées se lient momentanément aux sucres présents dans le matériel de la chambre et à la surface du régénérat, mais en définitive, n'ont pas perturbé l'information de position des cellules. Ceci peut être dû soit à l'injection d'une dose trop faible, soit à une pénétration trop rapide de la lectine dans l'épiderme.

Les injections de membranes plasmiques et de lectines n'ont pas entraîné la formation de régénérats surnuméraires visibles à la mue post-opératoire. Ceci peut signifier que l'information de position n'a pas été perturbée ou que la perturbation n'a pas retenti sur la morphogenèse. Pour cela, deux raisons peuvent être invoquées : les substances injectées ne parviennent pas jusqu'aux sites sensibles des membranes plasmiques ou, si elles y parviennent, ces sites sont incapables de réagir. Pour être sûr de mettre en contact des zones opposées, il faudrait réaliser de la microchirurgie sur les bourgeons de régénération. Quant aux lectines, il faudra suivre leur devenir au niveau des surfaces cellulaires en les révélant avec des marqueurs glycosylés ou en injectant des lectines couplées à la peroxydase.

L'héparine perturbe la cicatrisation de l'épiderme trochantérien et retentit sur la formation du régénérat où des déficiences principalement ventrales sont observées. Ceci permet de penser que l'héparine modifie la qualité des cellules mises en présence et perturbe la morphogenèse du régénérat. Au moment des injections dans la chambre de régénération, le régénérat est déjà mis en place. Dans les deux cas, à la mue suivante, les régénérats ont augmenté de taille ou lorsque seule la partie distale était repérable, des structures intermédiaires sont apparues. Cependant, les déficiences affectant une face persistent. Il semble donc qu'une morphogenèse soit possible dans le sens proximo-distal mais non dans le sens transversal. Chez les témoins, une rupture produite au moment de l'injection n'engendre pas de déficience au niveau de la patte régénérée. Dans notre cas, les cellules ont subi une modification de leur information de position ou sont incapables de réagir aux informations apportées par les injections. Toutefois, une simple plaie pratiquée dans une patte n'est pas obligatoirement suivie d'une régénération.

Chez *Carausius*, BART (1969) a montré expérimentalement que, dans des conditions normales, deux mécanismes interviennent dans la phase initiale de la régénération : l'activation trochantérienne par blessure avec une réactivité morphogénétique affirmée du côté ventral et l'hétérogénéité entre les qualités transversales. Les cellules mises en contact lors de la cicatrisation sont qualitativement différentes.

La régénération est perturbée par l'injection de substances. Bien que pour la larve de *Carausius*, la régénération axiale puisse se dérouler en l'absence d'une innervation normale. Nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'une intervention du système nerveux, en particulier pour le développement du régénérat. NUESCH (1968) lui attribue un rôle décisif pour la régénération et FOURNIER et ROGUEDA (1988) pensent que le déclenchement de la régénération d'une patte embryonnaire de *Carausius* pourrait faire intervenir simultanément la section du nerf crural et un facteur céphalique. S'il nous est impossible de conclure quant à l'action des substances sur le nerf crural, ces substances semblent avoir une action sur le système endocrine.

B - La durée de l'intermue.

Dans de nombreux cas, nous avons observé une augmentation de la durée de l'intermue. Notons toutefois que lorsque l'injection a entraîné des lésions du régénérat, il n'y a pas obligatoirement augmentation de la durée de l'intermue.

Le processus de la mue est sous le contrôle d'hormones. La capacité de régénération est liée au cycle de mue. Par ailleurs, celle-ci disparaît sous l'action indirecte d'hormone de mue qui provoque la différenciation de l'ébauche (BULLIERE, 1972 ; LENOIR-ROUSSEAU, 1981). La durée de l'intermue d'animaux qui ont reçu de l'héparine et dont une patte a été autotomisée est double de celle d'animaux simplement autotomisés. Pendant les deux premiers tiers de l'intermue, le taux des ecdystéroïdes est très faible. Pendant cette période, le pic observé chez les animaux normaux ou autotomisés n'est pas décelable. Il nous est malheureusement impossible de conclure à l'existence de ce pic pendant les quinze derniers jours de l'intermue puisque aucun dosage n'a été effectué au cours de cette période. Pour la phase d'apparition du blastème (la phase 2), le taux d'ecdystéroïdes est plus faible chez les animaux injectés et autotomisés que chez les animaux simplement autotomisés (1,9 ng/mg de poids frais contre 2,5 ng/mg). Or, nous savons que les précurseurs de certains ecdystéroïdes comme la makistérone se trouvent uniquement chez les végétaux et donc que la nourriture peut affecter le taux de ces ecdystéroïdes. Bien qu'à ce moment, le poids des animaux soit sensiblement le même, il nous est impossible d'affirmer que la quantité de nourriture absorbée soit la même ou que la transformation des végétaux absorbés soit semblable chez tous les animaux. Il faut cependant noter que des autotomies pratiquées en début de stade, où le taux des ecdystéroïdes est faible, n'ont pas été suivies de régénération normale.

Pour les autres types d'injection, aucun dosage des ecdystéroïdes n'a été effectué. Toutefois, ces injections retentissent sur la durée de l'intermue alors que les injections n'ont pas été pratiquées dans l'hémolymphe. L'allongement de l'intermue ne résulte pas obligatoirement d'une anomalie de régénération. En effet, si on compare les résultats obtenus après l'injection de suspensions de membranes plasmiques, on s'aperçoit que les suspensions contenant des membranes plasmiques de faces dorsales, injectées du côté ventral, augmentent la durée de l'intermue alors que celles de faces ventrales, injectées du côté dorsal, ne modifient pas la durée de l'intermue bien que les déficiences soient plus nombreuses.

L'injection de bleu trypan, d'encre de chine affecte les hémocytes et provoque le retard de la mue (WIGGLESWORTH, 1955). Toutefois, le rôle des hémocytes dans le système endocriné des Insectes n'est pas totalement élucidé (GUPTA, 1985). Dans notre expérimentation, si l'héparine est capable d'agir sur l'hémolymphe, il n'en est pas de même des substances injectées dans la

chambre de régénération qui, elle, n'est pas baignée par l'hémolymphe. On ne peut cependant pas exclure le passage de certaines substances dans l'hémolymphe soit directement après une lésion de l'épiderme du régénérat soit après pénétration dans les cellules épidermiques. Sans savoir précisément à quel niveau se situe l'action des substances, il s'agit vraisemblablement d'un effet systémique affectant globalement la physiologie de l'animal. En particulier pour l'héparine qui, sur les cellules de Vertébrés, perturbent la transduction intracellulaire.

Avec les injections d'héparine, l'augmentation de la durée de l'intermue pourrait être due à une modification de l'hémolymphe mais aussi à une augmentation du temps nécessaire à la cicatrisation et peut être à une modification des cellules mises en contact. Chez les animaux qui ont reçu de l'héparine, tant que le taux d'ecdystéroïdes est faible, le régénérat est peu développé. Chez la drosophile, RICKOLL et GALEWSKY (1987) ont montré que la 20-OH-E augmente le nombre d'antigènes à la surface des cellules ; ces antigènes sont des glycoprotéines. Les résultats trouvés chez la Drosophile laisseraient à penser que, tant que le taux d'ecdystéroïdes est faible, les glycoprotéines sont insuffisantes pour permettre le développement du régénérat. Les résultats de GALEWSKY et col., (1988) sur les lignées cellulaires permettent à ces auteurs de supposer que les glycoprotéines dépendantes d'hormone peuvent fonctionner comme une lame basale et/ou des composants de la matrice extracellulaire impliqués dans la morphogénèse du disque imaginal. Rappelons que la couche présente à la surface du régénérat pourrait jouer le rôle de lame basale.

En conclusion, l'analyse descriptive de la formation du régénérat après autotomie nous a permis de préciser son origine, le sens de différenciation de ses articles ainsi que les constituants chimiques présents dans la chambre de régénération et à la surface du régénérat. Cependant, une étude comparative du matériel de la chambre et du liquide exuvial nous permettrait peut être de mieux comprendre le fonctionnement des cellules du régénérat. Par ailleurs, une étude plus approfondie de la mise en place du régénérat serait nécessaire, en particulier pour l'analyse du réarrangement cellulaire. L'étude des jonctions cellulaires permettrait de mieux suivre le positionnement des cellules et de mieux analyser les problèmes de communication entre les cellules. Quant aux résultats expérimentaux, ils sont dans l'ensemble décevants. Cependant, il semble que la face ventrale soit plus vulnérable que les autres faces et que le gradient transversal ne soit pas rétabli à la suite d'une perturbation liée aux injections. Une analyse des cellules du régénérat les plus proches du point d'injection: étude descriptive (noyau, contenu cytoplasmique, surface) et étude des communications entre cellules (injection de substances fluorescentes), nous permettrait de définir si oui ou non les cellules sont perturbées par ces injections. Il semble également exister une relation injection-durée d'intermue. Une étude des taux d'ecdystéroïdes dans le dernier tiers de l'intermue qui suit l'injection d'héparine permettrait de préciser si le pic observé chez des animaux normaux dans cette période existe effectivement.

La comparaison des taux d'ecdystéroïdes d'animaux ayant reçu de l'héparine ou toute autre substance qui allonge la durée de l'intermue permettrait de préciser l'action des substances sur les facteurs endocrines et la morphogénèse. Bien que ces substances aient peu perturbé la régénération des pattes, elles ont entraîné des modifications physiologiques chez l'animal. Il serait donc intéressant de préciser, lors des injections de substances, le type de message reçu par les cellules tant au niveau des surfaces cellulaires qu'au niveau des seconds messagers ainsi que leurs actions sur les synthèses protéiques. Cette étude devra être réalisée sur des cellules isolées ou des bourgeons de régénération en cours de différenciation afin de supprimer l'influence d'autres systèmes. Des substances qui activent les protéines-kinases gouvernant l'activité d'enzymes-clé du métabolisme pourraient être testées. En particulier, les esters de phorbol qui se fixent sur les membranes cellulaires et le dibutyryl-AMPC qui est hydrolysé en AMPC à l'intérieur de la cellule et qui contrairement à celui-ci traverse les membranes plasmiques. Afin d'apprécier l'action des substances sur la régénération, on peut envisager de placer des moignons coxo-trochantériens dans les substances *in vitro* et de les greffer ensuite chez des animaux "normaux".

BIBLIOGRAPHIE

- ANDRIES, J.C., 1977. Dégénérescence, phagocytose et rejet cellulaire au niveau du mésentéron d'*Aeschna cynea* (Insecte, Odonate). Biol. cell, 29, 2-3, 203-208.
- ASHHURST, D.E., 1979. Haemocytes and connective tissue : a critical assessment. In: "Insect haemocytes : développement, form, functions and techniques". 319-330. Ed. GUPTA A.P. Cambridge University Press Cambridge.
- ASHHURST, D.E., 1982. The structure and development of insect connective tissues. In : "Insect ultrastructure", vol. 1, chp 11, 313-350. Eds. KING, R.C., AKAS, H., Plenum Press, N.Y.
- ASHHURST, D.E., 1985. Connective tissue. In : "Comprehensive Insect physiology, biochemistry and pharmacology". vol. 3, chap. 7, 249-287. Eds. KERKUT G.A. and GILBERT L.I. Pergamon Press. Oxford.
- ASHHURST, D.E., COSTIN, N.H., 1974. The developpement of a collagenous tissue in the locust, *Locusta migratoria* . Tissue & cell., 6, 279-300.
- ATNIP, K.D., MAHAN, J.T., DONALDSON, D.J., 1987. Role of carbohydrates in cell-substrate interactions during newt epidermal cell migration. J. Exp. Zool., 243, 461-471.
- BALL, E.E., GERT de COUET, H., HORDN, P.L., QUINN, J.M.A., 1987. Haemocytes secrete basement membrane components in embryonic locusts. Development, 99, 255-259.
- BARKA, T., ANDERSON, P.J., 1963. Histochemistry, Theory, Praticce and Bibliography. Chp. III : Carbohydrates. Eds. HARPER, ROW, Inc. N.Y.
- BART, A., 1965a. Sur l'origine des formations surnuméraires au cours de la régénération des pattes chez *Carausius morosus* Br. C.R. Acad. Sci. Paris., 261, 1901-1903.
- BART, A., 1965b. Induction expérimentale d'une morphogenèse accompagnant ou non la régénération de la patte de *Carausius morosus* Br. C.R. Acad. Sci. Paris., 261, 5619-5622.
- BART, A., 1966. Rôle de l'hypoderme dans le déclenchement de la morphogenèse régénératrice chez *Carausius morosus* Br. C. R. Acad. Sci. Paris, 262, 1452-1454.
- BART, A., 1969. Recherches expérimentales sur le déclenchement et le développement de morphogenèses de type régénératrices chez un Insecte : *Carausius morosus* Br. Thèse Doctorat ès Sci Nat, Lille.

- BART, A., 1970. Sur la morphologie et l'orientation des régénérats de patte obtenus après autotomie chez *Carausius morosus* Br. Ann. Embr. Morpho., 3, 4, 369-378.
- BART, A., 1971. Morphogenèse surnuméraire au niveau de la patta du phasme *Carausius morosus* Br. Arch. Entw. Mech. Org., 166, 331-364.
- BART, A., 1972. Morphogenèse provoquée par une discontinuité proximo-distale au niveau de la patte de *Carausius morosus* Br. Associations de niveaux différenciés. Archiv. Biol., 83, 129-166.
- BART, A., CAPRON, A., 1974. Etude des déterminants antigéniques du phasme *Carausius morosus* adulte. Bull. Soc. Zool. France., 99, 4, 707-714.
- BARWIG, B., BOHN, H., 1980. Evidence for the presence of two clotting proteins in Insects. Naturwissenschaften, 67, 47-48.
- BEAULATON, J., LOCKSHIN, R.A., 1982. The relation of programmed cell death to development and reproduction : comparative studies and an attempt at classification. Int. Rev. Cytol., 79, 215-235.
- BENJAMINSON, M.A., 1969. Conjugates of chitinase with fluoresceine isothiocyanate or lissamine rhodamine as specific stains for chitin *in situ*. Stain Techn, 44, 27-31.
- BERRY, S.J., KRISHNAKUMARAN, A., OBERLANDER, H., SCHNEIDERMAN, H.A., 1967. Effects of hormones and injury on RNA synthesis in Saturniid moths. J. Insect. Physiol., 13, 1511-1537.
- BERTHOLD, G., SEIFERT, G., 1977. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Wanderung der Pigment-Granula beim physiologischen Farbwechsel der Stabhenschrecke *Carausius morosus* (Phasmatodea : Phasmatidae). Ent. Germ., 3, 4, 303-315.
- Biorad Protein Assay., 1979. Bull. 1069 EG.
- BLANQUET, P.R., 1976. Ultrahistochemical study on the ruthenium red surface staining II. Nature and affinity of the electron dense marker. Histochemistry, 47, 175-189.
- BODENSTEIN, D., 1937. Zur Analyse experimentellezengter Beinmehrfachbildungen. Arch. Entw. Mech. Org., 136, 745-785.
- BODENSTEIN, D., 1955. Contribution to the problem of regeneration in Insects. J. Exp. Zool., 129, 209-224.

- BOGUS, M.I., WISNIEWSKI, J.R., CYMBOROWSKI, B., 1986. Effects of injury to the neuroendocrine system of last instar larvae of *Galleria mellonella*. J. Insect Physiol., 32, 12, 1011-1017.
- BOHN, H., 1965a. Analyse der Regenerationsefähigkeit der Insektenextremität durch Amputations-und Transplantationsversuche an Larven der Afrikanischen Schabe *Leucophaea maderae* FABR. (Blattaria). I. Regenerationspotenzen. Arch. Entw. Mech. Org., 156, 49-74.
- BOHN, H., 1965b. Analyse der Regenerationsfähigkeit der Insektenextremität durch Amputations-und Transplantationsversuche an Larven der Afrikanischen Schabe *Leucophaea maderae* FABR. (Blattaria). II. Achsendetermination. Arch. Entw. Mech. Org. 156, 449-503.
- BOHN, H., 1967. Transplantationsexperimente mit interkalärer Regeneration zum Nachweis eines sich segmental wiederholenden Gradienten im Bein von *Leucophaea* (Blattaria). Verh. Deutsch. Zool. Ges., 499-508.
- BOHN, H., 1970. Interkaläre Regeneration und segmentale Gradienten bei den Extremitäten von *Leucophaea* -Larven (Blattaria). I Femur und Tibia. Wilhelm Roux'Arch. Entw. Mech. Org., 165, 303-341.
- BOHN, H., 1971. Interkaläre Regeneration und segmentale Gradienten bei den Extremitäten von *Leucophaea* -Larven. III Die Herkunft des interkalären Regenerates. Wilhelm Roux'Arch. Entw. Mech. Org., 167, 209-221.
- BOHN, H., 1975. Growth-promoting effect of haemocytes on insect epidermis *in vitro*. J. Insect Physiol., 21, 1283-1293.
- BOHN, H., 1976. Tissue interactions in the regenerating cockroach leg. In "Insect development". Ed. LAWRENCE P.A. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburgh, Melbourne.
- BOHN, H., 1977a. Differential adhesion of the haemocytes of *Leucophaea maderae* (Blattaria) to a glass surface. J. Insect Physiol., 23, 185-194.
- BOHN, H., 1977b. Enzymatic and immunological characterization of the conditioning factor for epidermal outgrowth in the cockroach. *Leucophaea maderae*. J. Insect Physiol., 23, 1063-1073.
- BOHN, H., 1986. Hemolymph clotting in insects. In : "Immunity in invertebrates". Ed. M. BREHELIN, chp 14, 188-207. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

- BOLLENBACHER, W.E., VEDECKIS, W.V., GILBERT, L.I., O'CONNOR, J.D., 1975. Ecdysone titers and photoracic gland activity during the larval-pupal development of *Manduca sexta*. Dev. Biol., 44, 46-53.
- BORDAGE, E., 1897. Sur la régénération tétramérique du tarse des phasmides. C.R. Acad. Sci., 124, 1536-1538.
- BORDAGE, E., 1905. Recherches anatomiques et biologiques sur l'autotomie et la régénération chez divers Arthropodes. Bull. Biol. Fr. Belg., 39, 308-454.
- BORDAGE, E., 1916. Phénomènes histologiques de la régénération des appendices autotomisés chez les Orthoptères pentamères. Bull. Scient. Fr. Belg., 49, 199-235.
- BORST, D.W., O'CONNOR, J.D., 1974. Trace analysis of ecdysones by gas-liquid chromatography, radio-immunoassay and bioassay. Steroids, 24, 637-656.
- BOULANGER, P., POLONOVSKI, J., BISERTE, G., DAUTREVAUX, M., 1979. "Abrégé de biochimie médicale". 1. Les constituants des organismes vivants. Ed. MASSON. Paris, New-York.
- BOUTHIER, A., PENNETIER, J.L., MAUCHAMP, B., LAFONT, R., 1975. Variations du taux de β -ecdysone circulante chez *Locusta migratoria cinarescens* Fabr. (Orthoptères, Acrididae) au cours du dernier stade larvaire. C.R. Acad. Sci. Paris, 280, 1837-1840.
- BRADFORD, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. Anal. Biochem. 72, 248.
- BRAEMER, H., 1956. Über die Heilung von Hautwunden bei der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Zeller. Roux'Arch. EntwMech. Org., 148, 362-390.
- BROWER, D.L., LAWRENCE, P.A., WILCOX, M., 1981. Clonal analysis of the indifferentiated wing disc of *Drosophila*. Dev. Biol., 86, 448-455.
- BROWER, D.L., PIOVANT, M., REGER, L.A., 1985. Developmental analysis of *Drosophila* position-specific antigens. Dev. Biol., 108, 120-130.
- BROWER, D.L., WILCOX, M., PIOVANT M., SMITH, R.J., REGER, L.A., 1984. Related cell-surface antigens expressed with positional specificity in *Drosophila* imaginal discs. Proc Natl Acad Sci USA, 81, 7485-7489.
- BROWER, D.L., PIOVANT, M., SALATINO, R., BRAILEY, J., HENDRIX, M.J.C., 1987. Identification of a specialized extracellular matrix component in *Drosophila* imaginal discs. Dev. Biol., 119, 373-381.

- BRYANT, P.J., 1987. Experimental and genetic analysis of growth and cell proliferation in *Drosophila* imaginal discs. In : "Genetic regulation of development " Ed. Alan R. LISS. Inc. 339-372.
- BRYANT, S., FRENCH, V., BRYANT, P., 1981. Distal regeneration and symmetry. *Science*, 212, 993-1002.
- BULLIERE, D., 1967. Etude de la régénération chez un insecte Blattoptéroïde *Blabera Craniifer* Burm (Dictyoptère). I. Influence du niveau de la section sur la régénération de la patte métathoracique. *Bull. Soc. Zool. France.*, 92, 523-536.
- BULLIERE, D., 1968a. Etude de la régénération chez un insecte Blattoptéroïde *Blabera craniifer* Burm (Dictyoptère). II. Influence du moment de l'amputation dans l'intermue sur la régénération de la patte métathoracique. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 93, 69-82.
- BULLIERE, D., 1968b. Etude de la régénération chez un insecte Blattoptéroïde, *Blabera craniifer* Burm (Dictyoptère). III. Influence de la régénération d'une patte métathoracique sur la durée de l'intermue et le nombre de stades larvaires. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 93, 251-257.
- BULLIERE, D., 1971. Les mécanismes de la détermination cellulaire étudiés par des expériences de régénération chez un insecte Dictyoptère. Thèse Doc. ès-Sciences. Grenoble.
- BULLIERE, D., 1972a. Action de l'ecdysone et de l'inokostérone sur la régénération d'appendice chez la larve de *Blabera craniifer* (Insecte Dictyoptère). *C.R. Acad. Sci. Paris*, 274, 1349-1352.
- BULLIERE, D., 1972b. Etude de la régénération d'appendice chez un insecte : stades de la formation des régénérats et rapports avec le cycle de mue. *Ann. Embr. Morph.*, 5, 1, 61-74.
- BULLIERE, D., BULLIERE, F., 1985. Regeneration in comprehensive insect physiology, Biochemistry and Pharmacology, vol. 2. Eds. G.A. KERKUT and L.I. GILBERT., 371-424. Pergamon Press. New York .
- BULLIERE, D., BULLIERE, F., DE REGGI, M., 1979. Ecdysteroid titres during ovarian and embryonic development in *Blaberus craniifer*. *Arch. Dev. Biol.*, 186, 103-114.
- BULLIERE, D., BULLIERE, F., MOUNAJI, K., DE REGGI, M., GHARIB, B., 1982. Positional cell surface antigens in an insect appendage. *Wilhelm Roux's Arch.*, 191, 222-227.

- BULLIERE, D., BULLIERE, F., MOUNAJI, K., DE REGGI, M., GHARIB, B., KHAMANI, R., 1981. Mise en évidence de différences antigéniques à la surface des cellules épidermiques entre le fémur et le tibia, chez l'insecte *Blaberus craniifer*. C.R. Acad. Sci. Paris, 292, 935-938.
- BULLIERE, D., SENDEL, P., 1970. Sur le déterminisme de la différenciation qualitative des cellules au cours de la régénération des appendices thoraciques chez *Blabera craniifer* (Insecte Dictyoptère). C.R. Acad. Sci. Paris., 270, 1141-1144.
- BULLIERE, F., BULLIERE, D., 1971. Régénération, différenciation et ecdyses chez l'embryon de *Blabera craniifer* (Insecte dictyoptère) en culture *in vitro*. C.R. Acad. Sci. Paris., 273, 955-958.
- BULLIERE, F., 1985. Morphogenèse et expression de gènes topospécifiques chez la larve de *Blaberus*. 7ème colloque de la SFBD : Génétique et Biologie du développement. Marseille.
- BUTENANDT, A., KARLSON, P., 1954. Über die Isolierung eines Metamorphosehormons der Insekten in kristallisierter Form. Z. Naturforsch., 9b, 389-391.
- BUTTERS, T.D., HUGUES, R.C., 1978. Lectin binding to mosquito *Aedes aegypti* and human KB cells : structured comparisons of membrane oligosaccharides. Carbohydr. Res., 61, 159-168.
- BUTTERS, T.D., HUGUES, R.C., 1981a. Isolation and characterization of mosquito cell membrane glycoproteins. Biochem. Biophys. Acta., 640, 655-671.
- BUTTERS, T.D., HUGUES, R.C., 1981b. Steps in the biosynthesis of mosquito cell membrane glycoproteins and the effects of tunicamycin. Biochem. Biophys. Acta., 640, 672-686.
- CASSIER, P., BAGHDASSARIAN-CHALAYE, D., De BESSE, N., PAPILLON, M., BALDAIA, L., PORCHERON, P., 1988. Ecdysteroids and activation of epidermal cells in the locust, *Locusta migratoria*. J. Insect. Physiol., 34, 7, 669-677.
- CECCHINI, J.P., KNIBIEHLER, B., HIRRE, C., LE PARCO, Y., 1987. Evidence for a type-IV-related collagen in *Drosophila melanogaster*. Eur. J. Biochem., 165, 587-593.
- CHEW, E.C., 1980. On tannic-acid fixation and staining. Acta Anat., 108, 156-159. Chp. II, 303-318. Ed. GUPTA. Cambridge University Press. Cambridge.

- CHRISTENSEN, B.H., NAPPI, A.J., 1988. Immune responses of arthropods. In : ISI atlas of Science : animal and plant sciences, 15-19. 473- 498.
- DALE, L., BOWNES, M., 1985. Pattern regulation in fragments of *Drosophila* wing discs which show variable wound healing. *J.Embryol. Exp. Morph.*, 85, 95-109.
- DAY, M.F., 1952. Wound healing in the gut of the cockroach *Periplaneta*.. *Austr. J. Sci. Res. (B)* 5, 282-289.
- DAY, M.F., BENNETTS, H.J., 1953. Healing of gut wounds in the mosquito *Aedes aegypti* (L.) and the leafhopper *Orosius argentatus* (Ev.). *Austr. J. Biol. Sci.*, 6, 580-585.
- DEAN, R.L., BOLLENBACHER, W.E., LOCKE, M., SMITH, S.L., GILBERT, L.I., 1980. Haemolymph ecdysteroid levels and cellular events in the intermoult / moult sequence of *Calpodes ethlius*. *J. Insect Physiol.*, 26, 267-280.
- DELACHAMBRE, J., 1969. La réaction de la chitine à l'acide périodique-Schiff. *Histochemie*, 20, 58-67.
- DELACHAMBRE, J., BESSON, M.T., QUENNEDEY, A., DELBECQUE, J.P., 1984. Relationships between hormones and epidermal cell cycles during the metamorphosis of *Tenebrio molitor*. In : Biosynthesis, metabolism and mode of action of Invertebrate hormones, 245-254. Ed. HOFFMAN, PORCHET, Springer-Verlag, Berlin.
- DELBECQUE, J.P., HIRN, M., DELACHAMBRE, J., DE REGGI, M., 1978. Cuticular cycle and molting hormone levels during the metamorphosis of *Tenebrio molitor* (Insecta Coleoptera). *Dev. Biol.*, 64, 11-30.
- DE REGGI, M., GHARIB, B., BULLIERE, D., BULLIERE, F., 1986. Mise en évidence d'un système antigénique région-spécifique chez l'insecte *Blaberus*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 302, 9, 335-340.
- DE REGGI, M., HIRN, M., DELAAGE, M., 1975. Radioimmunoassay of ecdysone an application to *Drosophila* larvae and pupae. *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, 66, 4, 1307-1315.
- DONALDSON, D.J., MASON, J.M., 1977. Inhibition of epidermal cell migration by concanavalin A in skin wounds of the adult newt. *J. Exp. Zool.*, 200., 55-64.
- DURLIAT, M., 1985. Clotting processes in crustacia decapoda. *Biol. Rev.*, 60, 473-498.

- DUTKOWSKI, A.B., 1977. The ultrastructure and ultracytochemistry of the basement membrane of the *Galleria mellonella* fat body. *Cell. Tiss. Res.*, 176, 417-429.
- FAIN, M., SCHNEIDERMAN, H.A., 1979. Wound healing and regenerative response of fragments of the *Drosophila* wing imaginal disc cultured *in vitro*. *J. Insect Physiol.*, 25, 913-924.
- FESSLER, J.H., LUNSTRUM, G., DUNCAN, K.G., CAMPBELL, A.G., STERNE, R., BÄCHINGER, H.P., FESSLER, L.I., 1984. Evolutionary constancy of basement membrane components. 207-249. In : "The role of extracellular matrix in development". Ed : LISS, Inc. N.Y.
- FOURNIER, B., 1971. Essai d'analyse expérimentale de la morphogénèse embryonnaire des pattes, chez le phasme *Carausius morosus* Br. Thèse Doctorat ès Sci Nat, Bordeaux.
- FOURNIER, B., 1985. Secretions cuticulaires et ecdystéroïdes chez les embryons décapités du phasme *Carausius morosus* Br. *Int. J. Invert. Reprod. Dev.*, 8, 349-362.
- FOURNIER, B., ROGUEDA, J., 1988. Intervention possible d'un facteur céphalique dans la régénération des pattes chez les embryons du phasme, *Carausius morosus* Br. (Phasmida : Lonchodidae). *Int. J. Insect. Morphol. & Embryol.*, 17, 3, 221-230.
- FRANÇOIS, J., 1985. The collagen of the Arthropoda. In : "Biology of invertebrate and lower vertebrate collagens". 345-368. Eds. BAIRATI, GARRONE. Plenum Publishing corporation.
- FRENCH, V., 1976. Leg regeneration in the cockroach, *Blattella germanica*. Regeneration from a non congruent tibial graft/host junction. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 35, 267-301.
- FRENCH, V., 1980. Positional information around the segments of the cockroach leg. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 59, 281-313.
- FRENCH, V., BULLIERE, D., 1975. Nouvelles données sur la détermination de la position des cellules épidermiques sur un appendice de Blatte. *C.R. Acad. Sci. Paris.*, 280, 53-56.
- FRENCH, V., BRYANT, P., BRYANT, S., 1976. Pattern regulation in epimorphic fields. *Science.*, 193, 969-981.
- FRIEDRICH, H., 1930. Zur kenntniss der Regeneration der Extremitäten bei *Carausius (Dixippus) morosus*. *Br. Z. wiss. Zool.*, 137, 578-605.

- FRISTROM, D.K., 1968. Cellular degeneration in wing development of the mutant vestigial of *Drosophila melanogaster*. J. Cell. Biol., 39, 488-491.
- FRISTROM, D.K., 1974. The mechanism of evagination of imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. I General considerations. Dev. Biol., 43, 1-23.
- FRISTROM, D.K., RICKOLL, W.L., 1982. The morphogenesis of imaginal discs of *Drosophila*. In "Insect ultrastructure", vol 1, chp 9, 247-244. Eds . KING, R.C., AKAI, H. Plenum Press, N.Y.
- FUKUDA, S., 1940. Hormonal control of moulting and pupation in the silkworm. Proc. Imp. Acad., 16, 417.
- FUTAESAKU, Y., MIZUHIRA, V., NAKAMURA, H., 1972. The new fixative method using tanning acid for electron microscopy and some observations of biological specimens. Proc. Int. Congr. Histochem. Cytochem., 4, 155-156.
- GABE, M., 1968. Techniques histologiques. Ed : Masson, Paris.
- GALEWSKY, S., HOPE, J.K., RICKOLL, W.L., 1988. The effects of monensin on 20-hydroxyecdysone-induced glycoprotein secretion and aggregation in *Drosophila* S3 cells. J. Insect. Physiol., 34, 7, 661-668.
- GELMAN, D.B., WOODS, C.W., BORKOVEC, A.B., 1988. Ecdysteroid profiles for hemolymph and testes from larvae, pupae, and pharate adults of the european corn borer, *ostrinia nubilalis* Hubner. Arch. Insect. Biochem. Physiol., 7, 267-279.
- GHARIB, B., DE REGGI, M., BULLIERE, D., BULLIERE, F., 1987. Chez *Blaberus* le système antigénique région-spécifique (R-SAS) est périodiquement activé et inactivé au cours du développement post-embryonnaire. C. R. Acad. Sci. Paris., 305, 211-216.
- GILBERT, L.I., 1974. Recent progress in Hormone. Research. Ed. O. GREEPROY. Academic Press, 347-390.
- GIRTON, J.R., BRYANT, P.J., 1980. The use of cell lethal mutations in the study of *Drosophila* development. Dev. Biol., 77, 233-243.
- GODELMANN, R., 1901. Beitrage zur Kenntnis von *Bacillus Rossii* Fab. mit besonderer Berücksichtigung der bei ihm vorkommen den Autotomie und Regeneration einzelner Gliedmassen. Arch. Entw. Mech., Org., 265, 301.
- GOLDSTEIN, I. J., HUGUES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., SHARON, N., 1980. What should be called a lectin ? Nature, 285, 66.

- GRATECOS, D., NAIDET, C., ASTIER, M., THIERY, J.P., SEMERIVA, M., 1988. *Drosophila* fibronectin : a protein that shares properties similar to those of its mammalian homologue. EMBO. J., 7, 1, 215-223.
- GREGOIRE, C., 1953. Blood coagulation in arthropods. III Reactions of insect hemolymph to coagulation inhibitors of vertebrate blood. Biol. Bull., 104, 3, 372-393.
- GREGOIRE, C., 1964. Hemolymph coagulation. In : "The physiology of Insecta". Ed. ROCKSTEIN M. Academic Press. New York, 3, 153-188.
- GUPTA, A.P., 1985. Cellular elements in Hemolymph. in "Comprehensive Insect physiology, biochemistry and pharmacology". Vol 3. 405-451. Eds KERKUT and GILBERT. Pergamon Press. Oxford.
- HACKMAN, R.H., GOLDBERG, M., 1968. A study of a melanic mutant of the blowfly *Lucilia cuprina*. J. Insect Physiol., 14, 765.
- HALE, J.A., 1957. The histochemistry of polysaccharides. Int. Rev. Cytol., 6, 193-267.
- HAY, E.D., 1981. Extracellular matrix. J. Cell. Biol., 91, 2053-2235.
- HAY, E.D., 1984. Cell-matrix interactions in the embryo: cell shape, cell surface, cell skeletons and their role in differentiation. In "42nd Symp. Soc. Dev. Biol." 1-32. Ed. R. Trestald. New York: Liss.
- HEDELMANN, G., 1929. Die Gewebsentwicklung bei der Regeneration der Beine von *Dixippus morosus*. Arch. EntwMech. Org., 115, 852-875.
- HEWITT, A., MARTIN, G.R., 1984. Attachment proteins and their role in extracellular matrices. in : "The biology of glycoproteins". chp 2. 65-93. Ed. R.J. IVATT. Plenum Publishing corp.
- HOARAU, F., 1973. Comportement de l'hypoderme et progression de la différenciation au cours de la régénération d'un périopode chez l'isopode terrestre *Helleria brevicornis* Ebner. Ann. Embr. Morph., 6, 2, 125-135.
- HOARAU, F., HIRN, M., 1981. Effects of amputation and subsequent regeneration of a leg on the duration of the intermoult period and the level of circulating ecdystéroïds in *Helleria brevicornis* Ebner (Ground isopod). Gen. Comp. End., 43, 96-104.
- HOPKINS, P.M., 1988. Control of regeneration in Crustaceans in invertebrate endocrinology. Vol. 2. Endocrinology of selected invertebrate types, 327-240. Ed. LAUFER and DOWNER. Alan. R. Liss., Inc. New York.

- JUNQUEIRA, L.C.U., BIGNOLAS, G., BRENTANI, R.R., 1979. A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen. *Anal. Biochem.*, 94, 96.
- KARDAMI, E., SPECTOR, D., STROHMAN, R.C., 1988. Heparin inhibits skeletal muscle growth *in vitro*. *Dev. Biol.*, 126, 19-28.
- KARLSON, P., 1956. Chemische untersuchungen über die Metamorphose hormone der insekten. *Ann. Sci. Natur Zool.*, 18, 125-136.
- KARLSON, P., SHAAYA, E., 1964. Der ecdysontiter während der Insektentwicklung. I. Eine Methode zur bestimmung des Ecdysongehalts. *J. Insect. Physiol.*, 10, 797-804.
- KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R., 1972. Apoptosis : a basic biological phenomena with wideranging implications in tissue kinetics. *Brit. J. Cancer*, 26, 239-257.
- KIVELÄ, T., TARKKANEN, A., 1987. A lectin cytochemical study of glycoconjugates in the human retina. *Cell. Tiss. Res.*, 249, 277-288.
- KNIBIEHLER, B., MIRRE, C., CECCHINI, J.P., LE PARCO, Y., 1987. Haemocytes accumulate collagen transcripts during *Drosophila melanogaster* metamorphosis. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 196, 243-247.
- KNOBLOCH, C.A., STEEL, C.G.H., 1988. Interactions between limb regeneration and ecdysteroïd titres in last larval instar *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Insect Physiol.*, 34, 6, 507-514.
- KOOLMANN, J., 1982. Ecdysone metabolism. *Insect Biochem.*, 12, 3, 225-250.
- KÖHLER, G., MILSTEIN, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefused specificity. *Nature*, 256, 495.
- KOHNKE-GODT, B., GABIUS, H.J., 1989. Heparin-binding lectin from human placenta: purification and partial molecular characterisation and its relationship to basic fibroblast growth factors. *Biochemistry*, 28, 6531-6538.
- KRAMER, K.J., DZIADIK-TURNER, C., KOGA, D., 1985. "Chitin metabolism in Insects", in : *Comprehensive Insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Vol. 3, 75-115. Eds. KERKUT et GILBERT. Pergamon Press. Oxford.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-689.

- LAFONT, R., MAUCHAMP, B., PENNETIER, J.L., TARROUX, P., DEHIS, L., DELBECQUE, J.P., 1975. α and β -ecdysone levels in insects hemolymph : correlation with development events. *Experientia*, 31, 797-804.
- LAUFER, H., 1960. Blood proteins in insect development. *Ann. NY Acad. Sci.*, 89, 490.
- LECHAT, P., LAGIER, F., ROUVEIY, B., VINCENS, M., WEBER, S., 1982. *Pharmacologie médicale*. Ed. MASSON Paris, New York, Barcelone.
- LENDER, T., GROPOCOPATELI, A., 1967. Etude du territoire de régénération de la patte larvaire de *Tenebrio molitor* (Coléoptère). *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 92, 213-221.
- LENOIR-ROUSSEAUX, J.J., 1981. Evolution de la capacité de régénération de la patte du coléoptère *Tenebrio molitor* au cours de la métamorphose : étude *in situ*, *in vivo* et action *in vitro* de la 20-hydroxyecdysone. Thèse Doc. ès-Sci. ORSAY.
- LEPTIN, M., AEBERSOLD, R., WILCOX, M., 1987. Drosophila position-specific antigens resemble the vertebrate fibronectin-receptor family. *EMBO. J.*, 6, 4, 1037-1043.
- LEPTIN, M., WILCOX, M., 1986. The *Drosophila* position-specific antigens. Clue to their morphogenetic role. *Bio Essays.*, 5, 5, 204-207.
- LEV, R., SPICER, S.S., 1964. Specific staining of sulfate groups with Alcian blue at low pH. *J. Histochem Cytochem.*, 12, 309.
- LISON, L., 1960. *Histochimie et cytochimie animales*. Paris : Gauthier-Villars.
- LOCKE, M., 1966. The structure and formation of the cuticulin layer in the epicuticle of an insect, *Calpodes ethlius* (Lepidoptera, Hesperidae). *J. Morphol.*, 118, 461-494.
- LOCKE, M., HUIE, P., 1975. Staining of the elastic fibers in insect connective tissue after tannic acid/glutaraldehyde fixation. *Tissue & Cell.*, 7, 211-216.
- LOCKE, M., KRISHNAN, N., 1971. The distribution of phenoloxidasés and polyphenols during cuticle formation. *Tissue & Cell.*, 3, 103-126.
- LOCKE, M., KRISHNAN, N., 1973. The formation of the ecdysial droplets and the ecdysial membrane in an insect. *Tissue & Cell*, 5, 441-450.

- LOUVET, J.P., 1974. Observation en microscopie électronique des cuticules édifiées par l'embryon et discussion du concept de mue embryonnaire dans le cas du phasme *Carausius morosus* Br. (Insecta, Phasmida). Z. Morph. Tiere., 78, 159-179.
- LUFT, J.H., 1964. Electron microscopy of cell extraneous coats as revealed by ruthenium red. J. Cell Biol., 54A-55A.
- LUFT, J.H., 1971a. Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. Anat. Rec., 171, 347-368.
- LUFT, J.H., 1971b. Ruthenium red and violet. II. Fine structural localization in animal tissues. Anat. Rec., 171, 369-416.
- MADHAVAN, K., SCHNEIDERMAN, H.H., 1969. Hormonal control of imaginal disc regeneration in *Galleria mellonella* (lepidoptera). Biol. Bull., 137, 321-331.
- MALA', J., SEHNAL F., KUMARAN A.K, GRANGER N.A., 1987. Effects of starvation, chilling, and injury on endocrine gland function in *Galleria mellonella*. Arch. Insect. Biochem. Physiol., 4, 113-128.
- MALEK, S.R.A., 1958. The appearance and histological structure of the cuticle of the desert locust *Schistocera gregaria* (Forsk.) Proc. Roy. Soc. B., 149, 557-570.
- MALEVILLE, A., DE REGGI, M., 1981. Influence of leg regeneration on ecdysteroid titres in *Acheta* larvae. J. Insect Physiol., 27, 35-40.
- MAREK, M., 1969. *In vitro* synthesis of "injury protein" and "a companion protein" in organs of pupa of *Galleria mellonella* L. Comp. Biochem. Physiol., 29, 1231.
- MARKS, E.P., LEOPOLD, R.A., 1971. Deposition of cuticular substances *in vitro* by leg regenerates from the cockroach, *Leucophaea maderae* (F). Biol. Bull., 140, 73-83.
- MARTIN, G.R., TIMPL, R., MÜLLER, P.K., KÜHN, K., 1985. The genetically distinct collagens. Trends. Biochem. Sci., 10, 7, 285-287.
- MARTOJA, R., MARTOJA, M., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson, Ed. Paris.
- MAUCHAMP, B., SCHREVEL, J., 1977. Observation en microscopie à fluorescence de la cuticule des Insectes : une méthode faisant appel aux propriétés spécifiques de la WGA vis-à-vis des glycoconjugués de la chitine. C.R. Acad. Sci. Paris, 285, p. 1107-1110.
- Mc CALEB, D.C., KUMARAN, A.K., 1980. Control of juvenile hormone esterase activity in *Gallerra mellonella* larvae. J. Insect. Physiol, 26, 171.

- MERRIL, C.R., DUNAU, M.L., GOLDMAN, D., 1981. A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Science*, 211, 1437-1438.
- MORATA, G., LAWRENCE, P.A., 1975. Control of compartment development by the engrailed gene of *Drosophila*. *Nature*, 255, 614-617.
- MORGAN, E.D., POOLE, C.F., 1976. The pattern of ecdysone levels during development in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J. Insect Physiol.*, 22, 885-891.
- NARDI, J.B., HARDT, T.A., MAGEE-ADAMS, S.M., OSTERBUR, D.L., 1985. Morphogenesis in wing imaginal discs : its relationship to changes in the extracellular matrix. *Tissus & cell.*, 17, 4, 473-490.
- NEVILLE, A.C., 1967. Chitin orientation in cuticle and its control. *Adv. Insect. Physiol.*, 4, 213-286.
- NIJHOUT, H.F., 1975. A threshold size for metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Biol. Bull.*, 149, 214-225.
- NIJHOUT, H.F., 1981. Physiological control of molting in Insects. *Amer. Zool.*, 21, 631-640.
- NIJHOUT, H.F., WILLIAMS, C.M., 1974. Control of moulting and metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.) : cessation of juvenile hormone secretion as a trigger for pupation. *J. Exp. Biol.*, 61, 493-501.
- NOBLE-NESBITT, J., 1963. The cuticle and associated structure of *Podura aquatica* at the moult. *Quart. J. Micro. Sci.*, 104, 369-391.
- NOOMAN, K.O., BURGER, M.M., 1973. Binding of (3H) concanavalin A to normal and transformed cells. *J. Biol. Chem.*, 248, 4286-4292.
- NOULIN, G. 1979. Etude du matériel secrété dans la chambre de régénération d'un appendice locomoteur de *Porcellio dilatatus* Br. (Crustacea : Isopoda). *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 19, 6, 1807-1816.
- NUESCH, H. 1968. The role of the nervous system in insect morphogenesis and regeneration. *Annu. Rev. Entomol.*, 13, 27-44.
- O'FARREL, A.F., 1960. The clock in the cockroach . An inaugural public lecture delivered in Armidale, New South Wales (The University of New England). 1-19.
- O'FARREL, A.F., STOCK, A., 1953. Regeneration and the moulting cycle in *Bla-tella-germanica* L. I. Single regeneration initiated during the first instar. *Aust. J. Biol. Sci.*, 6, 485-500.

- O'FARREL, A.F., STOCK, A., 1954. Regeneration and the moulting cycle in *Blattella germanica* L. III. Successive regeneration of both metathoracic legs. Aust. J. Biol. Sci., 7, 525-536.
- O'FARREL, A.F., STOCK, A., 1958. Some aspects of regeneration in cockroaches. Proc. 10th int. Cong. Eutomol, 2, 253-259.
- O'FARREL, A.F., STOCK, A., MORGAN, J., 1956. Regeneration and the moulting cycle in *Blattella germanica* L. IV Single and repeated regeneration and metamorphosis. Aust. J. Biol. Sci., 9, 406-422.
- OPPENHEIMER, S.B., 1978. Cell surface carbohydrates in adhesion and migration. Amer. Zool., 18, 13-23.
- PEARSE, A.G.E., 1968. Histochemistry theoretical and applied. Eds. CHURCHILL J. and A. London vol. 1.
- PENZLIN, H., 1963. Über die Regeneration bei Schaben (Blattaria). I. Das Regenerationsvermögen und die Genese des Regenerats. Wilhelm Roux' Arch. EntwMech. Org., 154, 434-465.
- PENZLIN, H., 1965. Einige neuere Ergebnisse und Probleme der experimentellen Analyse der Regeneration bei Evertibraten. Wiss. Z. Univ. Rostock, 14, 595-618.
- PERRONE, J.B., De MAIO, J., SPIELMAN, A., 1986. Regions of mosquito salivary glands distinguished by surface lectin-binding characteristics. Insect. Biochem., 16, 2, 313-318.
- POHLEY, H.J., 1965. Regeneration in animals and related problems. North Holland Amsterdam.
- PORCHERON, P., 1979. L'hormone de mue des arthropodes : dosage radioimmunologique, production, divers aspects de son rôle physiologique. Thèse Doct. ès Sci Nat. Paris
- POSSOMPES, B., 1961. Structures et mécanismes liés à l'autotomie chez les phasmes. Le niveau d'autotomie. C.R. Acad. Sci. Paris, 253, 3089-3091.
- POSSOMPES, B., 1962. Structures et mécanismes liés à l'autotomie chez les phasmes. Mécanisme déclencheur. C.R. Acad. Sci., 254, 574-576.
- POSSOMPES, B., 1966. Articulation trochanter-fémur et modalités de rupture de la patte des insectes. Autotomie et autospasie. Pour les cinquante années de recherches scientifiques du Prof. M. PRENANT.

- RAABE, M., 1983. Le contrôle neuroendocrine des changements de coloration chez les insectes : adaptation morphologique et physiologique. Bull. Soc. Zool. France., 108, 2, 185-195.
- REINHARDT, C.A., HODGKIN, N.M., BRYANT, P.J., 1977. Wound healing in the imaginal discs of *Drosophila*. Dev. Biol., 60, 238-257.
- REYNOLDS, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol., 17, 208-212.
- RICKOLL, W.L., GALEWSKY, S., 1987. Antibodies recognizing 20-hydroxyecdysone-dependant cell surface antigens during morphogenesis in *Drosophila*. Roux'Arch. Dev. Biol., 196, 434-444.
- RINTERKNECHT, E., 1964. Etude de la reconstitution des téguments larvaires chez *Locusta migratoria* du stade V. Etude comparative avec le stade IV. Bull. Soc. Zool. France., 89, 451-458.
- RINTERKNECHT, E., 1967. Etude de la cicatrisation chez *Locusta migratoria* L. (Orthoptère). Thèse Doct ès Sci Nat, Strasbourg.
- RINTERKNECHT, E., LEVI, P., 1966. Etude au microscope électronique du cycle cuticulaire au cours du 4e stade larvaire chez *Locusta migratoria*. Z. Zellforsch., 72, 390-407.
- RIZKI, R.M., RIZKI, T.M., ANDREWS, C.A., 1977. Modification of *Drosophila* cell surfaces by Concanavalin A. Cell. Tiss. Res., 185, 183-190.
- RIZKI, T.M., RIZKI, R.M., 1983. Basement membrane polarizes lectin binding sites of *Drosophila* larval fat body cells. Nature., 303, 5915, 340-342.
- ROBERTS, B., WENTWORTH, S.L., KOTZMAN, M., 1983. The levels of ecdysteroids in uninjured and leg-autotomized nymphs of *Blattella germanica* (L.). J. Insect. Physiol., 29, 9, 679-685.
- SANNASI, A., 1968. Hyaluronic acid in the scar tissue of cockroach. Zool. Jb. Physiol. Bd., 74, 5, 319-327.
- SCHLÜTER, V., BIDMON, H.J., GREWE, S., 1985. Azadirachtin affects growth and endocrine events in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. Insect. Physiol., 31, 10, 773-777.
- SCHMIDT, E.L., 1956. Observation on the subcuticular layer in the insect integument. J. Morph., 99, 211-226.

- SEHNAL, F., MAROY, P., MALA, J., 1981. Regulation and significance of ecdysteroid titre fluctuations in lepidopterous larvae and pupae. *J. Insect Physiol.*, 27, 8, 535-544.
- SELIGMAN, A.M., HANKER, J.S., WASSERKRUG, H.L., DMOCHOWSKI, H., KATZOFF, L., 1965. Histochemical demonstration of some oxidized macromolecules with thiocarbohydrazide (TCH) or thiosemicarbozide (TSC) and osmium tetroxide. *J. Histochem. Cytochem.*, 13, 629-639.
- SIEBER, K.P., REMBOLD, H., 1983. The effects of azadirachtin on the endocrine control of moulting in *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.*, 29, 6, 523-527.
- SIMIONESCU, M., SIMIONESCU, M., 1976a. Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. I. Procedure and evidence for mordanting effect. *J. Cell Biol.*, 70, 608-621.
- SIMIONESCU, M., SIMIONESCU, M., 1976b. Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. II The moiety and functional groups possibly involved in the mordanting effect. *J. Cell Biol.*, 70, 622-633.
- SINGLEY, C.T., SOLURSH, M., 1980. The use of tannic acid for the ultrastructural visualization of hyaluronic acid. *Histochemistry*, 65, 93-102.
- SMITH, W.A., GILBERT, L.I., BOLLENBACHER, W.E., 1985. Calcium-cyclic AMP interactions in prothoracicotropic hormone stimulation of ecdysone synthesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 39, 71-78.
- SOLURSH, M., FISCHER, M., SINGLEY, C.T., 1979. The synthesis of hyaluronic acid by ectoderm during early organogenesis in the chick embryo. *Differentiation*, 14, 77-85.
- SÖDERSTRÖM, K.O., MALMI, R., KARJALAINEN, K., 1984. Binding of fluorescein isothiocyanate conjugated lectins to rat spermatogenic cells in tissue sections. Enhancement of lectin fluorescence obtained by fixation in Bouin's fluid. *Histochemistry*, 80, 475-579.
- SPURR, A.R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultr. Res.*, 26, 31-43.
- STOCK, A. O'FARRELL, A.F., 1954. Regeneration and the moulting cycle in *Blatella germanica* L. II. Simultaneous regeneration of both metathoracic legs. *Aust. J. Biol. Sci.*, 7, 302-307.

- SUBRAHMANYAM, B., MÜLLER, T., REMBOLD, H., 1989. Inhibition of the turnover of neurosecretion by azadirachtin in *Locusta migratoria*. J. Insect. Physiol., 36, 6, 493-500.
- SWEAT, F., PUCHTLER, H., ROSENTHAL, S.I., 1964. Sirius red F3B4 as a stain for connective tissue. Arch. Pathol., 78, 69.
- TAKAI, Y., MURASE, N., HOSAKA, M., SUHITOMO, S., NODA, Y., MORI, M., 1986. Comparison of lectin binding patterns in salivary glands of mice and rats with special reference to different fixatives used. Acta. histochem., 78, 31-47.
- TAKEDA, N., 1977. Brain hormone carrier haemocytes in the moth. *Monema flavescens*. J. Insect. Physiol., 23, 1245-1254.
- THEOCHARIS, D.A., ANAGNOSTIDES, S.T., TSIGANDS, C.P., 1985. Distribution and changes of glycosaminoglycans in the three stages of development of the insect *Ceratitis capitata*. Comp. Biochem. Physiol., 81B, 4, 933-937.
- THIERRY, J.P., 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microscopie, 6, 978-1018.
- TOWBIN, H., STAEGELIN, T., GORDON, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354.
- TRELSTAD, R.L., BIRK, D.E., 1984. Collagen fibril assembly at the surface of polarized cells. 513-543. in : "The role of extracellular matrix in development". Ed. LISS. Inc. N.Y.
- TRUBY, P.R., 1983. Blastema formation and cell division during cockroach limb regeneration. J. Embryol. Exp. Morph., 75, 151-164.
- TRUBY, P.R., 1986. The growth of supernumerary legs in the cockroach. J. Embryol. Exp. Morph., 92, 115-131.
- URVOY, J., 1963. Etude anatomo-fonctionnelle de la patte et de l'antenne de la blatte *Blaberus craniifer* Burm. Annls Sci. Nat., 5, 287-414.
- VOY, A., 1950. Le pouvoir régénérateur au cours de l'intermue préimaginale chez le phasme (*Carausius morosus* Br). C.R. Acad. Sci. Paris, t 231, 246-247.
- VOY, A., 1951. Croissance régénératrice au cours des cinq âges de la phase larvaire chez le phasme (*Carausius morosus* Br). C.R. Acad. Sci. Paris, t 233, 209-211.
- VOY, A., 1952. Régénération et croissance des pattes atypiques chez le phasme (*Carausius morosus* Br.). Bull. Biol. Fr. Belg., 86, 449-470.

- WARREN, L., 1963. The distribution of sialic acid in nature. *Comp. Biochem. Physiol.*, 10, 153-171.
- WATANABE, M., TAKEDA, Z. URANO, Y., 1982. Lectins as reagents to detect differentiation-dependent alterations of carbohydrates. in "Japan scientific societies Press (Tokyo). Academic Press. Japan Inc. Tokyo, chp 14, 217-228.
- WATT, F.M., 1986. The extracellular matrix and cell shape. *Trends. Biochem. Sci.*, 11,11, 482-485.
- WEBER, K., OSBORN, M., 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244, 4406-4412.
- WEIS-FOGH, T., 1970. Structures and formation of insect cuticle. *Symp. R. Ent. Soc. Lond.*, 5, 165-185.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1937. Wound healing in an insect, *Rodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Exp. Biol.*, 14, 364-381.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1955. The role of the haemocytes in the growth and moulting of an insect *Rodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Exp. Biol.*, 32, 649-663.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1956. The haemocytes and connective tissue formation in an insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Quart. J. Mic. Sci.*, 97, 89-98.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1972. The principles of Insect physiology. Eds. CHAPMAN et HALL Ltd London - New York.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1973. Haemocytes and basement membrane formation in *Rhodnius*. *J. Insect Physiol.*, 19, 459-485.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1979. Hemocytes and growth in insects. In "Insect hemocytes",
- WILCOX, M., BROWER, D.L., SMITH, R.J., 1981. A position-specific cell surface antigen in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Cell*, 25, 159-164.
- WILCOX, M., BROWN, N., PIOVANT, M., SMITH, R. J., WHITE, R. A. H., 1984. The *Drosophila* position-specific antigens are a family of cell surface glycoprotein complexes. *EMBO. J.*, 3, 10, 2307-2313.
- WILCOX, M., LEPTIN, M., 1985. Tissue-specific modulation of a set of related cell surface antigens in *Drosophila*. *Nature.*, 316, 351-354.
- WILLIS, J. H., 1987. Cuticular proteins: the neglected component. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 6, 203-215.

- WOLFGANG, W. J., FRISTOM, D., FRISTROM, J. W., 1987. An assembly zone antigen of the insect cuticle. *Tissue & cell.*, 19, 6, 827-838.
- WOLPERT, L., 1971. Positional information and pattern formation. *Curr. Topics. Dev. Biol.*, 6, 183-224.
- WOLPERT, L., 1978. Pattern formation in biological development. *Sci. Am.*, 239, 4, 154-164.
- WRIGHT, D.A., LAWRENCE, P.A., 1981. Regeneration on the segment boundary in *Oncopeltus*. *Dev. Biol.*, 85, 317-327.
- WU, A.M., 1984. Differential binding characteristics and applications of D Gal β 1---> 3D Gal NAC specific lectins. *Mol. Cell. Biochem.*, 61, 131-141.
- WYATT, G.R., 1967. The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. *Adv. Insect. physiol.*, 4, 287-360.
- YAMADA, K., 1970. Dual staining of some sulfated mucopolysaccharides with Alcian blue (pH 1) and ruthenium red (pH 2,5). *Histochemie*, 23, 13-20.

PLANCHE I

ETUDE HISTOLOGIQUE DU REGENERAT : PHASES 1 à 5.

Pour toutes les photographies, la face ventrale est dirigée vers la gauche et l'extrémité distale vers le haut.

1 - Phase 1 : un caillot obture la plaie (←). Excepté la présence d'hémocytes, le moignon coxo-trochantérien ne diffère pas d'une base de patte normale (coxa-trochanter, pl. II, 3).

2 - Phase 2 : l'épiderme a migré sous le caillot (←→), le blastème se met en place et la chambre de régénération apparaît. Au niveau du trochanter, les cellules épidermiques accolées dans leur partie apicale présentent de grands espacements dans leur partie basale.

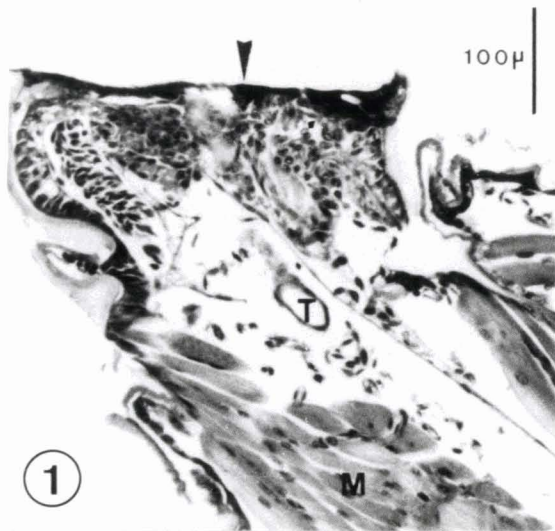
3 - Phase 3 : le régénérat a la forme d'une tige (◀) et la chambre de régénération s'agrandit (←→). Les cellules épidermiques, au niveau proximal du régénérat, sont plus espacées dans leur partie basale.

4 - Phase 4 : le régénérat a l'allure d'un cylindre (◀). Une constriction délimite le prétarse (*). Les espaces intercellulaires s'estompent.

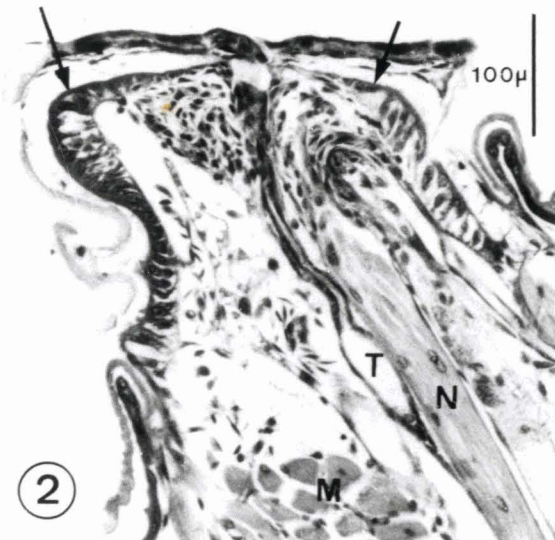
5 - Phase 5 : 4 constriction (*) séparent le régénérat en cinq zones : prétarse, tarse, tibia, fémur et trochanter. L'apodème tendineux est présent (→→). L'orientation proximo-distale des fibres qui constituent le matériel de la chambre de régénération est ici bien nette (←).

2, 3, 4, 5 - Même échelle.

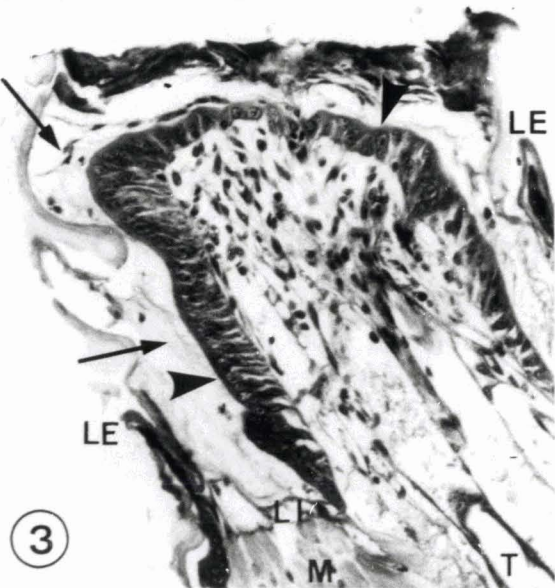
E, épiderme ; F, fémur ; LE, ligne extérieure du décollement de l'épiderme ; LI, ligne intérieure du décollement de l'épiderme ; M, muscles ; N, nerf ; Pt, prétarse ; T, trachée ; Ta, tarse ; Ti, tibia ; Tr, trochanter.



①



②



③



④



⑤

PLANCHE II

ETUDE HISTOLOGIQUE DU REGENERAT : PHASES 6 et 7 ET DE LA ZONE COXO-TROCHANTERIENNE AU COURS D'UNE INTERMUE.

Pour toutes les photographies, la face ventrale est dirigée vers la droite et l'extrémité distale vers le haut.

1 et 2 - Régénérat.

1 - Phase 6. Le régénérat se replie du côté ventral. Coxa, trochanter, fémur, tibia, tarse et prétarse sont présents. La segmentation du tarse est ébauchée. La limite entre le prétarse et le tarse est bien visible du côté ventral et se situe en regard de l'apodème trochantérien ventral. Des cellules sont présentes dans la chambre de régénération (←).

2 - Phase 7. La ligne de rétraction extérieure a atteint le bas de la coxa. Le régénérat a la morphologie d'une patte régénérée et seule la taille diffère.

3 à 6 - Zone coxo-trochantérienne normale. (même échelle)

3 - Zone trochantérienne le jour du passage en stade IV. Les deux diaphragmes distal et proximal sont bien visibles ainsi que le niveau d'autotomie (►).

4 - Zone trochantérienne témoin d'un moignon coxo-trochantérien en phase 5. L'endocuticule qui est la zone colorée de la cuticule est épaisse (←←).

5 - Zone trochantérienne témoin d'un moignon coxo-trochantérien en phase 6. La digestion de l'endocuticule a débuté (←←←).

6 - Zone trochantérienne en fin d'intermue, peu avant l'exuviation. La nouvelle cuticule est en place.

AT, apodème trochantérien ; C, coxa ; DD, diaphragme distal ; DP, diaphragme proximal ; F, fémur ; LE, ligne extérieure du décollement de l'épiderme ; LI, ligne intérieure du décollement de l'épiderme ; M, muscles ; N, nerf ; NC, nouvelle cuticule ; Pt, prétarse ; T, trachée ; Ta, tarse ; Ti, tibia ; Tr, trochanter.

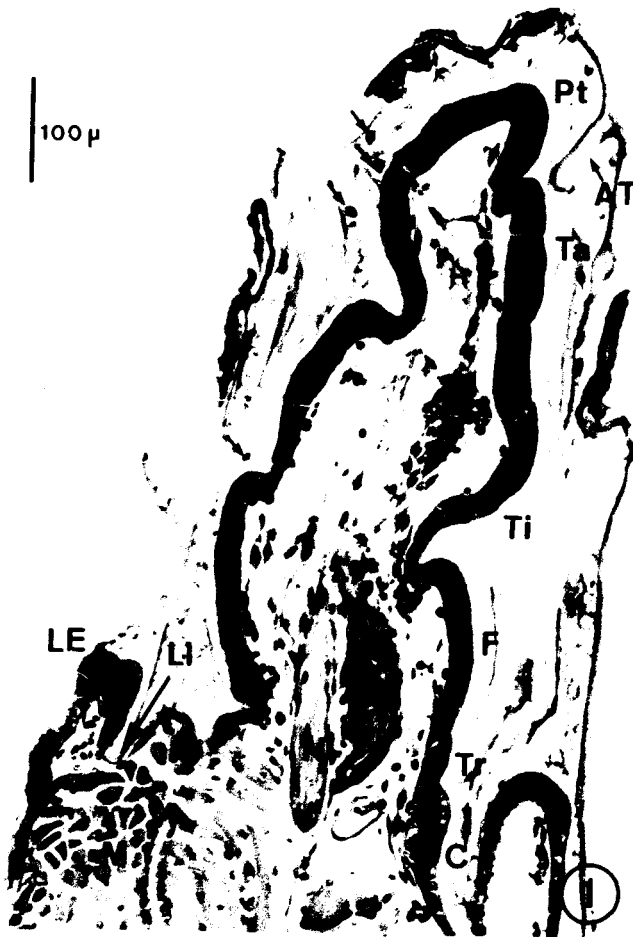


PLANCHE III

ETUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE DE L'EVOLUTION DU REGENERAT

Pour toutes les photographies, la face dorsale est dirigée vers la gauche et l'extrémité distale vers le haut.

1 - Aspect d'un moignon coxo-trochantérien en phase 2. Le caillot a été enlevé et l'épiderme a cicatrisé (←). x180.

2 à 6 - Régénérat extrait du moignon coxo-trochantérien.

2 - Régénérat en phase 3, du matériel de la chambre de régénération est présent en surface de l'épiderme (←). x300.

3 - Régénérat en phase 4, une construction proximale est bien nette (←). Une constriction distale détermine le prétarse (◀). x300.

4 - Régénérat en phase 5, le prétarse est très net. Trois constrictions délimitent le prétarse, le tarse, le tibia et le fémur (◀). Des mamelons sont visibles à la surface du régénérat (←). x360.

5 - Régénérat en phase 6, le régénérat qui possède tous les articles est replié en S. La segmentation du tarse est ébauché (←). Du matériel cellulaire présent dans la chambre de régénération est visible à la surface du régénérat. x250.

6 - Régénérat en phase 8, le régénérat a son allure définitive. Les débris cellulaires sont plus importants qu'en phase 6. x250.

E, épiderme coxal; F, fémur; g, griffe; Mad et Mav, membranes articulaires coxo-trochantériennes dorsale et ventrale; o, onychium ; Pt, prétarse; Ta, tarse; Ti, tibia; Tr, Trochanter.



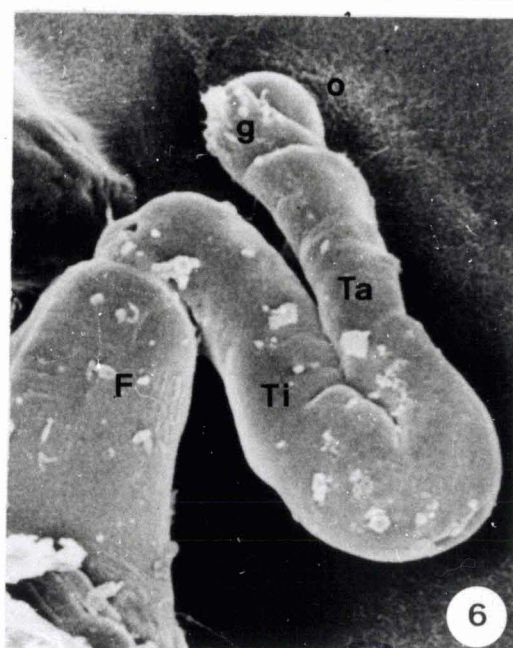
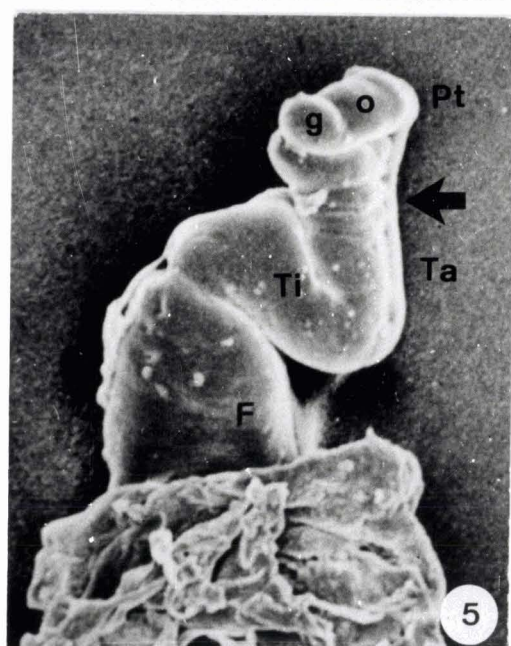
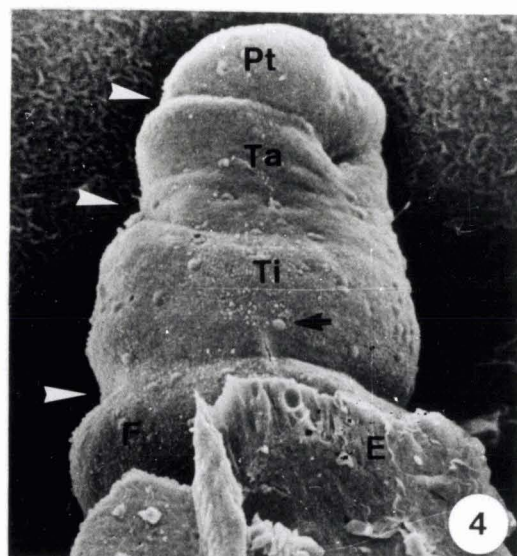
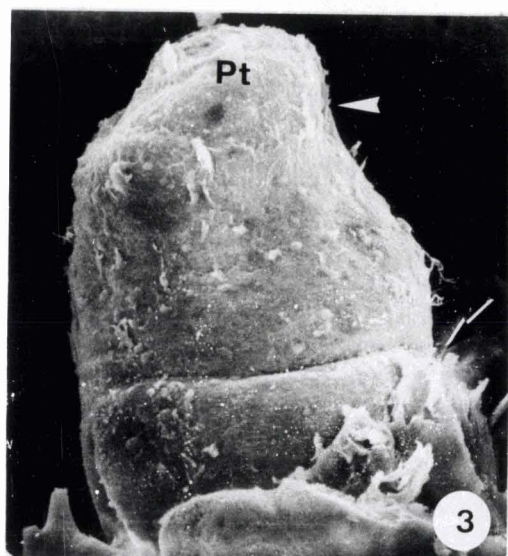
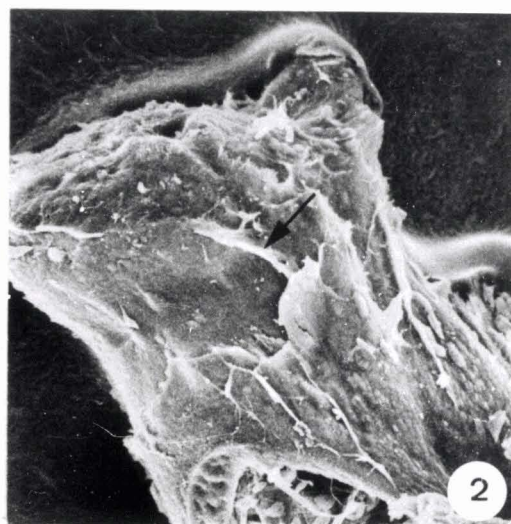
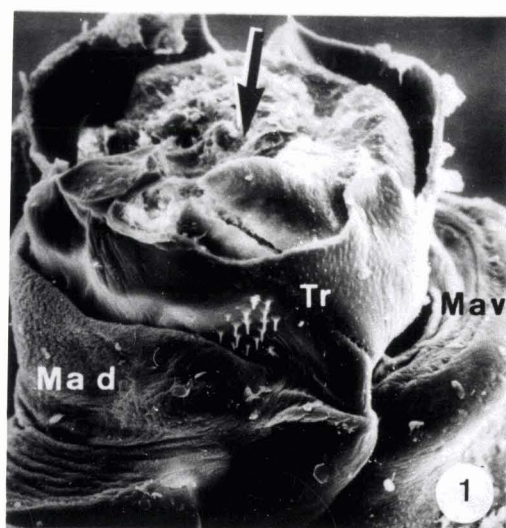


PLANCHE IV

ETUDE EN MICROSCOPIE A BALAYAGE D'UN REGENERAT AU COURS DE SON ELABORATION.

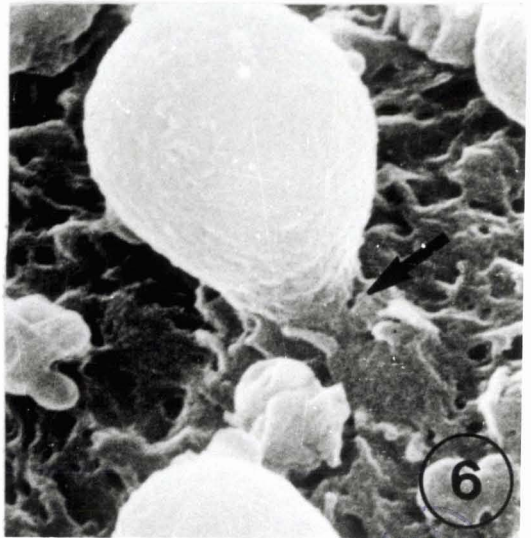
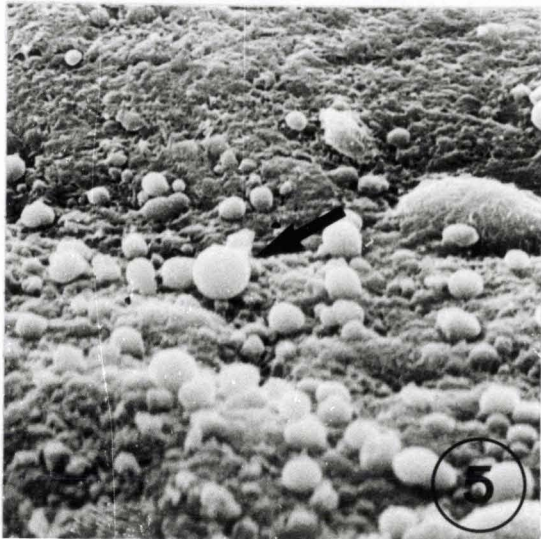
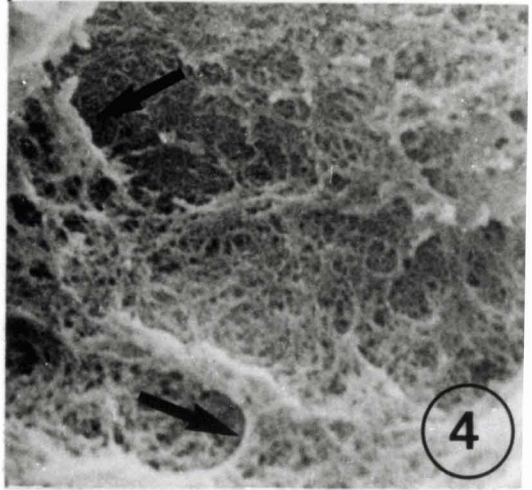
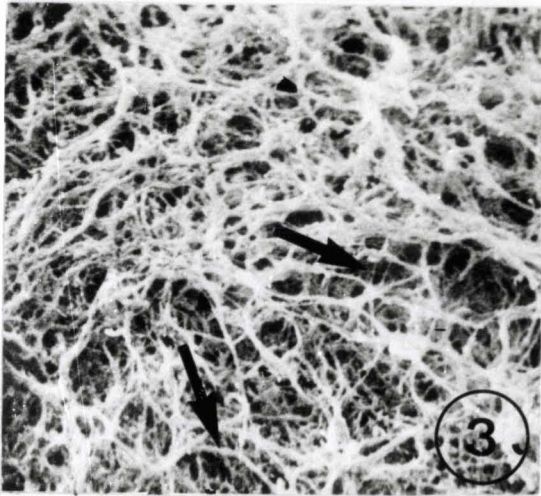
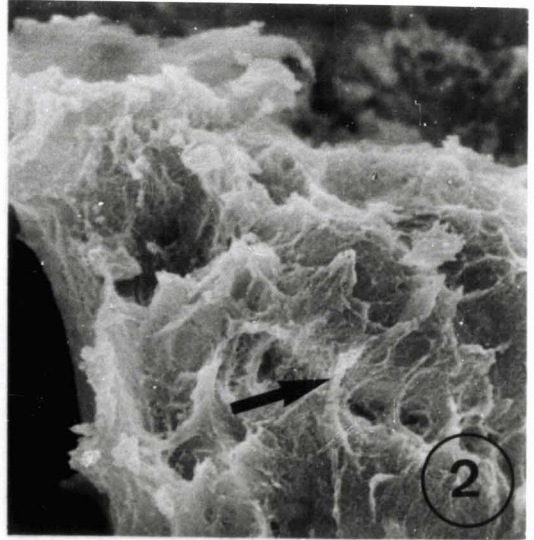
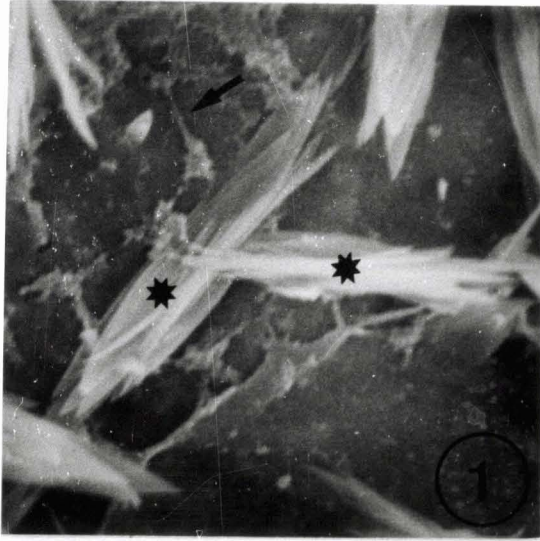
1 - La face interne du caillot montre des hémocytes aux contours pointus (*) et du matériel d'aspect fibrillaire (←) d'environ 0,5 μm d'épaisseur. x3000.

2 - L'extrémité distale d'un régénérat en phase 6 est recouverte d'un matériel qui constitue des lames orientées proximo-distalement (←). x170.

3 et 4 - Aspects du matériel fibrillaire à plus fort grossissement. La taille des fibres est très variable (→).

4. Des zones contigües à l'épiderme et dépourvues de matériel sont observables dans ce matériel (←). x12000.

5 et 6 - Des grains de taille variable (0,5 à 4,5 μm) se trouvent à la surface du régénérat et semblent expulsés à la surface de l'épiderme (←) (6). 5 : x170 ; 6 : x24000.



BU
LILLE

PLANCHE V

ASPECTS ULTRASTRUCTURAUX, AU COURS DU STADE IV, DE L'ÉPIDERME D'UNE STRUCTURE COXO-TROCHANTERIENNE DE PATTE NON AUTOTOMISÉE.

1 et 2 - Témoins de moignons coxo-trochantériens en phase 4.

1 - Les cellules épidermiques sont étroitement imbriquées dans leur partie apicale et de façon plus lâche dans leur partie basale. Des grains de ptérines et d'ommochromes sont nombreux. Les trois couches qui composent la cuticule : épi, exo et endocuticule sont nettes. La lame basale bien visible est d'épaisseur variable et les fibres de collagène coupées transversalement sont facilement repérables. Des hémidesmosomes la relient à la membrane plasmique basale. x7100.

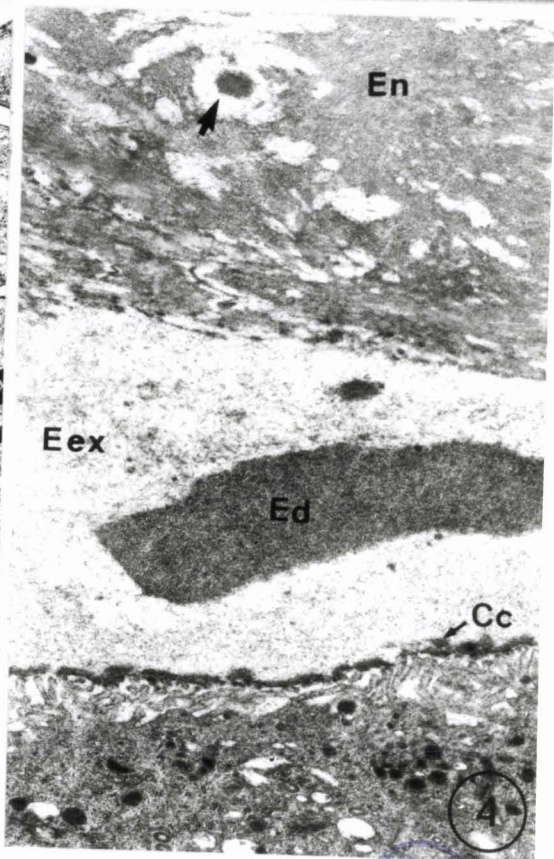
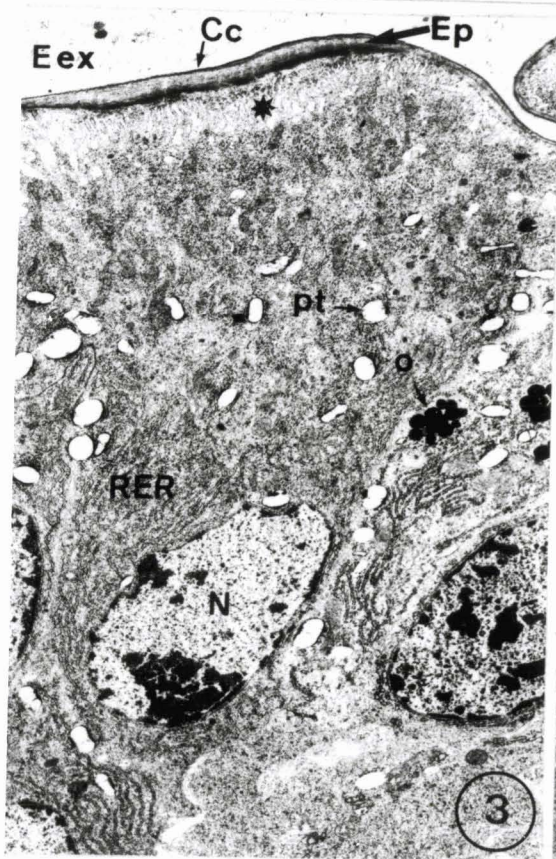
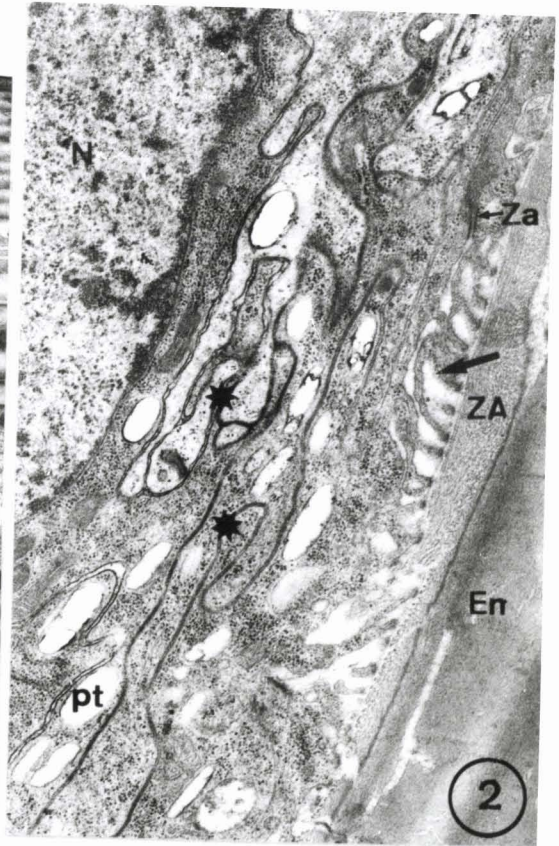
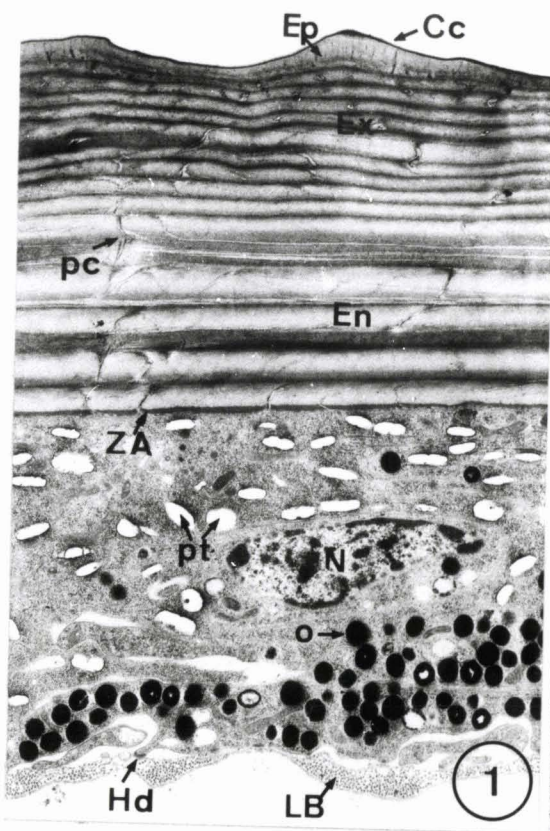
2 - Une zone d'assemblage constituée de matériel fibreux sépare la cuticule de la membrane plasmique apicale qui présente de nombreuses digitations (↙). L'interdigitation des cellules dans la partie apicale est ici bien visible. (★). x14800.

3 et 4 - Témoins de moignons coxo-trochantériens en phase 8.

3 - La sécrétion de la nouvelle cuticule a débuté. A cet endroit, l'épicuticule externe et interne sont présentes. La membrane plasmique apicale est très digitée (★). Le réticulum endoplasmique est important, probablement en relation avec la sécrétion de cuticule. Des grains de ptérines et d'ommochromes sont visibles. x5300.

4 - Ici, bien qu'il s'agisse de la même coupe qu'en 3, l'épicuticule externe ne constitue pas une couche continue. L'endocuticule est en cours de digestion et des granules (←) y sont visibles. Dans l'espace exuvial rempli d'un matériel fibrillaire très fin, des granules à allure d'"ecdysial droplets" sont présents. x9700.

Cc, épicuticule externe ; Ep, épicuticule interne ; Ed, ecdysial droplet ; E ex, espace exuvial ; En, endocuticule ; Ex, exocuticule ; Hd, hémidesmosome ; LB, lame basale ; N, noyau ; oc, grain d'ommochrome ; pc, pore canal, pt ; grain de ptérine ; RER, réticulum endoplasmique ; Za, zonula adherens ; ZA, zone d'assemblage.



BU
LILLE

PLANCHE VI

ASPECTS ULTRASTRUCTURAUX DU MOIGNON COXO-TROCHANTERIEEN 1 JOUR APRES L'AUTOTOMIE.

1 - Sous le caillot, les cellules épidermiques, reconnaissables aux grains de ptérines, sont en train de migrer. Dans le caillot, on distingue la couche externe (le coagulum), la couche moyenne où les cellules sont en nécrose et la couche interne où les hémocytes sont vivants. De nombreux hémocytes sont également présents sous le caillot. x3300.

2 - Aspect de la couche interne du caillot. Les hémocytes présentent de grands prolongements entre lesquels du matériel fibrillaire (★) est présent. Ils possèdent également des vacuoles remplies d'un matériel d'aspect différent de l'hémolymphe coagulée (◀). x8200.

3 - Sous le caillot au niveau du trochanter, les cellules épidermiques se détachent de la procuticule et leur membrane plasmique apicale présente de grandes digitations (★). Cette procuticule n'est pas constituée de lames serrées comme chez les témoins et ressemble à de l'endocuticule au moment de l'apolyse lorsque le liquide exuvial est sécrété. x 7200.

Ca, caillot ; CE, cellules épidermiques ; CG, coagulum ; CM, couche moyenne du caillot ; CI, couche interne du caillot ; Hc, hémocyte ; PC, procuticule.

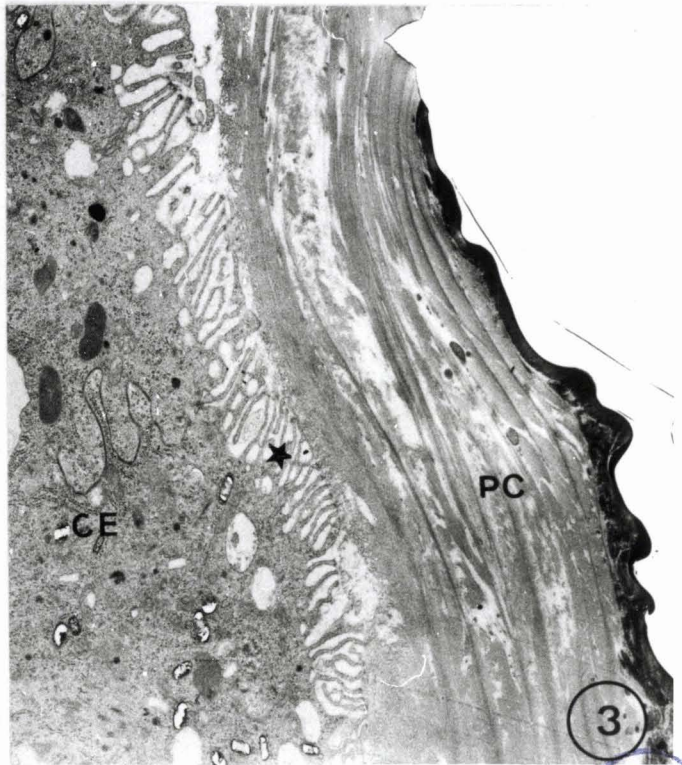


PLANCHE VII

ASPECTS ULTRASTRUCTURAUX D'UN REGENERAT AU COURS DE SON EVOLUTION.

1 - Dans le matériel de la chambre de régénération d'un régénérat en phase 4, on observe une couche fibrillaire (←) dont l'orientation semble parallèle à la face apicale des cellules épidermiques. x23000.

2 - Aspect du matériel de la chambre de régénération le plus souvent obtenu sans fixation particulière. Ce matériel a parfois une allure fibrillaire (←→). x8300.

3 - Aspects des cellules observées dans la chambre de régénération. Il semble s'agir de granulocytes. La membrane plasmique qui est bien nette au début de la formation du régénérat (3a) disparaît à la fin de l'intermue, lorsque le régénérat est bien formé (3b). Dans ce dernier cas, le matériel cellulaire est mal conservé. 3a : x27000 ; 3b : x14600.

4 - Aspect de l'épiderme d'un régénérat en phase 6. La membrane plasmique apicale présente des digitations et sous cette membrane, des vésicules sont visibles (←→). L'appareil de Golgi et de nombreux ribosomes sont visibles. x23000.

CR, chambre de régénération ; E, épiderme ; G, appareil de Golgi.

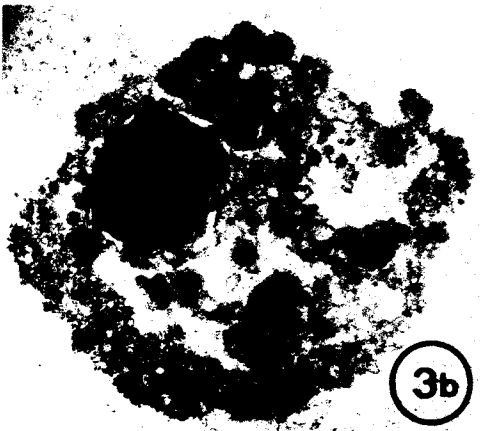
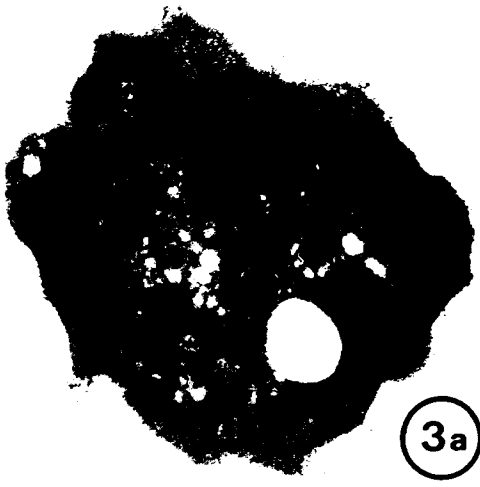
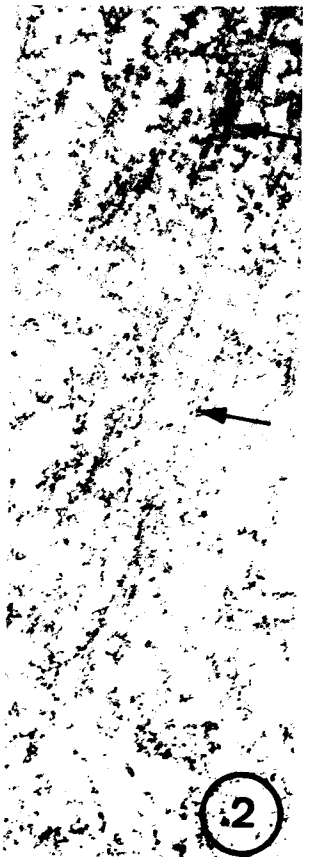


PLANCHE VIII

ASPECTS ULTRASTRUCTURAUX D'UN REGENERAT EN COURS DE FORMATION.

1 - Régénérat en phase 5. La membrane plasmique basale présente de grandes digitations et des zones denses aux électrons. Au niveau de ces zones, du matériel se condense (◀), ceci évoque l'ébauche des hémidesmosomes et de la membrane basale. A proximité se trouve un hémocyte (★). x17700.

2 - Régénérat en phase 7. Les cellules sont en colonne et le grand axe du noyau est parallèle à l'axe apex-base de la cellule. Des autophagosomes sont assez nombreux (◀◀). Les cellules épidermiques sont étroitement accolées dans leur partie apicale et séparées dans leur partie basale. La lame basale peu nette (◀) est d'épaisseur irrégulière, un hémocyte en est proche (★). x5150.

3 - Surface apicale d'un régénérat en phase 8. L'épicuticule externe est en cours de dépôt. Dans l'espace exuvial, on trouve un matériel fibrillaire, granulaire et une couche continue qui recouvre le régénérat (▶). x33600.

Cc, épicuticule externe ; CR, chambre de régénération ; E, épiderme ; He, hémolymphe ; N, noyau.



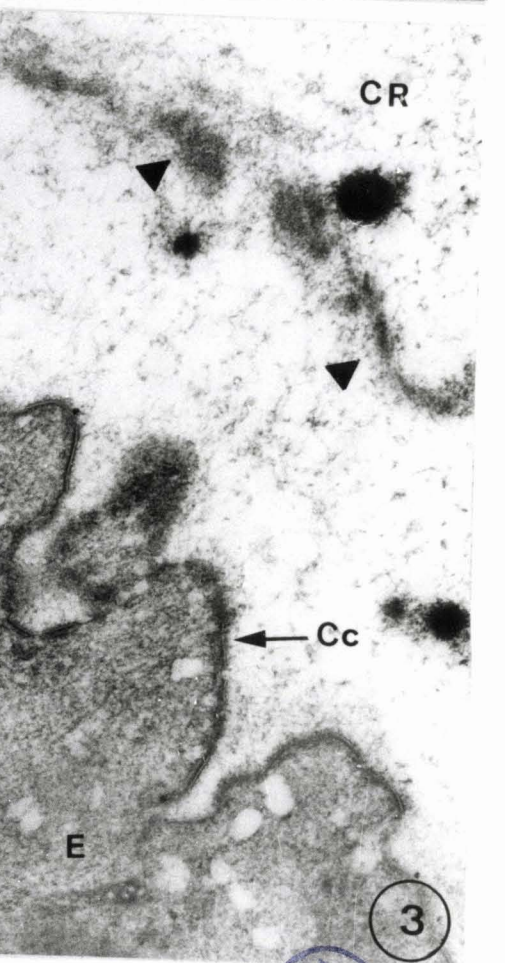
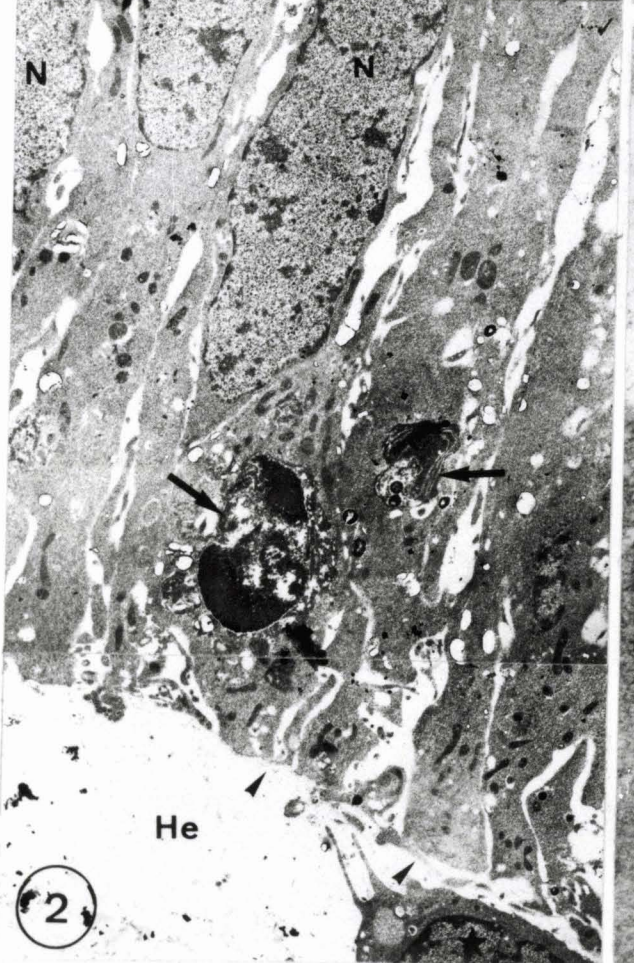
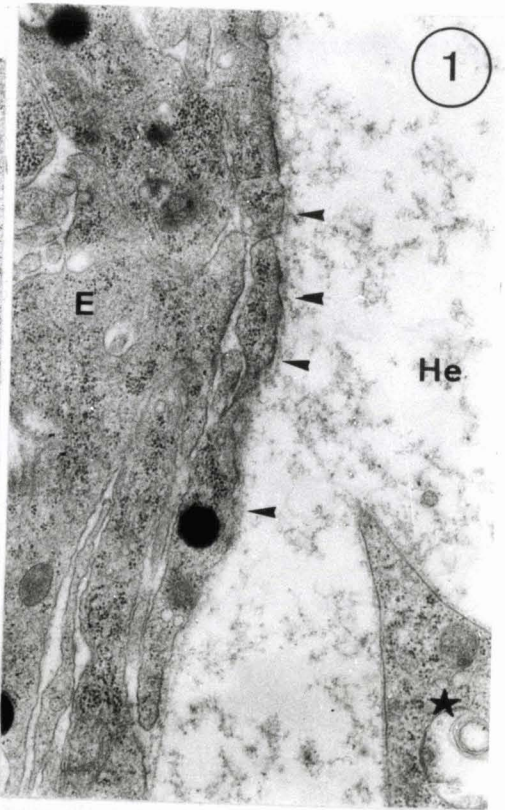


PLANCHE IX

RESULTATS DES COLORATIONS HISTOCHIMIQUES ACCOMPAGNEES OU NON D'UN TRAITEMENT ENZYMATIQUE.

1 - Méthode à la chloramine T-Schiff. Cette méthode qui permet la détection des protéines donnent une coloration plus intense de l'épiderme du régénérat que de la chambre de régénération. Cette coupe en partie tangentielle au-dessus de l'épiderme illustre bien l'aspect en réseau du matériel de la chambre contiguë à l'épiderme (➡). Des mitoses (▶) sont visibles dans l'épiderme du régénérat.

2 - Méthode HID. Elle révèle la présence de GAGs sulfatés qui semblent n'être présents qu'au niveau de l'épiderme du régénérat puisque le contenu de la chambre de régénération ne se colore pas (*).

3 et 4 - Méthode à l'acide périodique - Schiff.

3 - APS. Cette méthode met en évidence les groupements vic-glycol dans la chambre de régénération (*), l'épiderme du régénérat et de la coxa, l'hémolymphe.

4 - Action de la chitinase de *Streptomyces griseus* avant l'APS. La coloration disparaît dans la chambre de régénération (*) et donc la chitine a été hydrolysée. Dans les deux cas, l'épiderme coxal demeure fortement coloré (←).

5 et 6 - Méthode au bleu alcian pH 2,5. Le bleu alcian se lie aux GAGs acides.

5 - Le bleu alcian colore assez intensément le matériel de la chambre de régénération (*), le contour des cellules présentes dans la chambre et la face interne de la cuticule du moignon (←). L'épiderme du régénérat est également coloré, en particulier la face apicale des cellules épidermiques.

6 - Action de la hyaluronidase de *Streptomyces griseus* avant la coloration au bleu alcian. La coloration de la chambre de régénération est assez fortement diminuée (*) ainsi que la face interne de la cuticule et la face apicale des cellules épidermiques.

2, même échelle que **1** ; **4, 5, 6,** même échelle que **3.** E, épiderme.

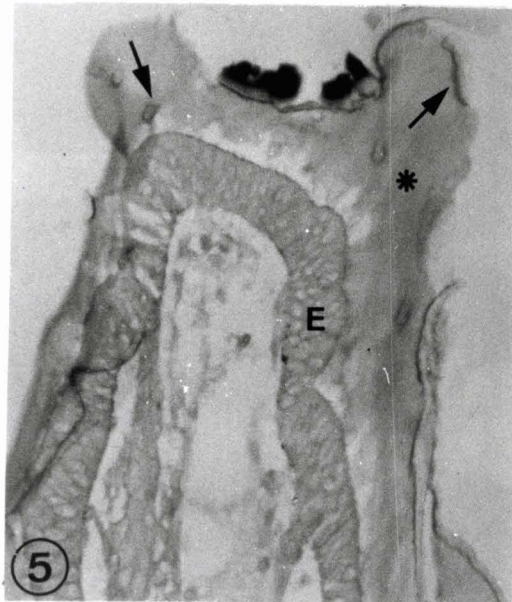
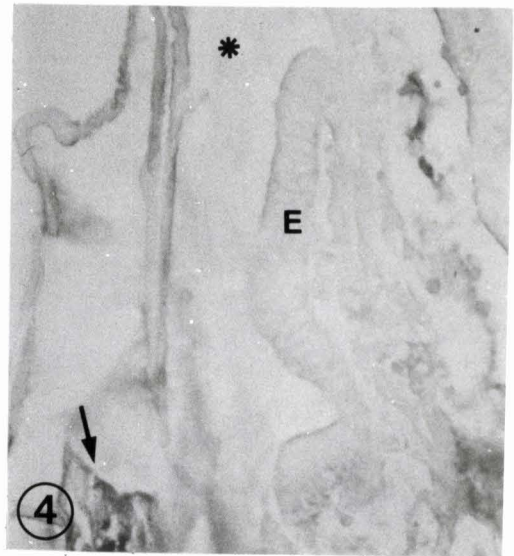
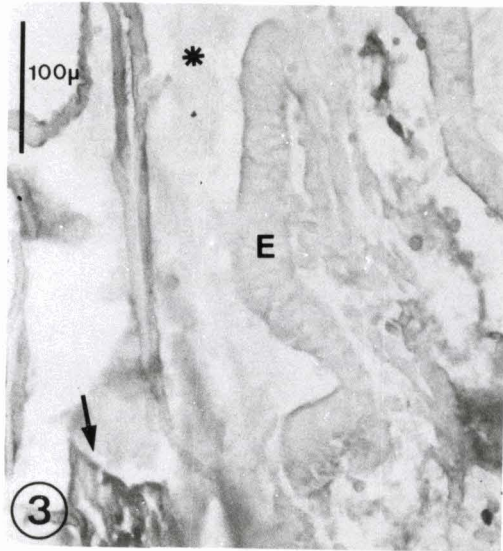
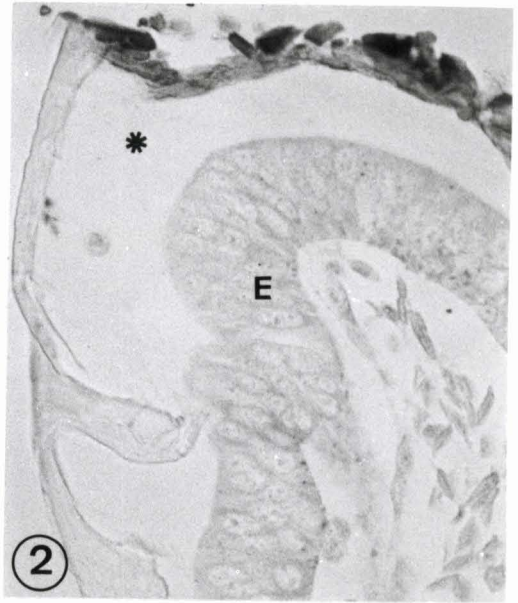
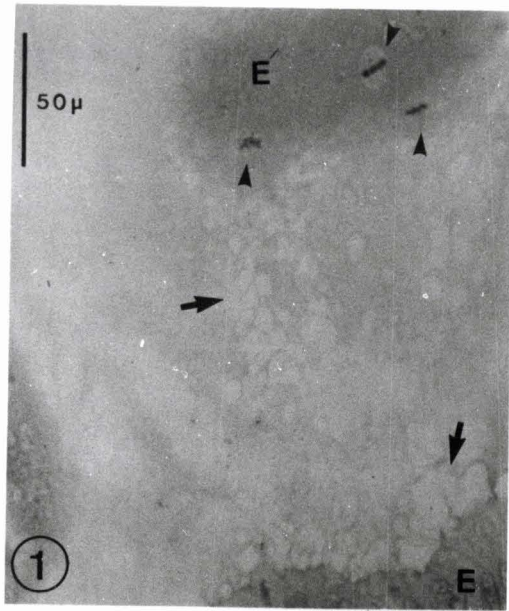


PLANCHE X

RESULTATS DE L'ACTION DE LECTINES ET D'ANTICORPS SUR DES COUPES HISTOLOGIQUES DU REGENERAT.

1 - Coupe témoin traitée avec du PBS et du sérum de mouton anti-lapin-FITC. Aucune fluorescence n'est observée au niveau de l'épiderme et de la chambre de régénération. (Régénérat en phase 5)

2 à 4 - Lectines. (Coupes de régénérat en phase 5)

2 - Con A. Avec cette lectine, la chambre de régénération, la face interne de la cuticule du moignon (➡), l'hémolymphe, les hémocytes, les membranes plasmiques des cellules épidermiques du régénérat et plus particulièrement la face apicale (↔) fluorescent.

3 - WGA. La chambre de régénération et la face interne de la cuticule du moignon fluorescent (↔). Seule la face apicale des cellules épidermiques du régénérat fluoresce (↔). (◀ : cuticule)


4 - HPA. La fluorescence est très forte. La chambre de régénération, la face interne de la cuticule du moignon (➡), le contour des cellules présentes dans la chambre, la face apicale des cellules épidermiques du régénérat ainsi que quelques unes de ces cellules fluorescent (↔).

5 et 6 - Anticorps. (Coupes de régénérat en phase 6)

5 - Anti-fibronectine plasmatique humaine. La face apicale des cellules épidermiques du régénérat (↔) et le matériel de la chambre de régénération fluorescent.

6 - Anti-collagène IV. La face apicale des cellules épidermiques du régénérat fluoresce assez fortement (↔), la fluorescence est également observable au niveau de la chambre de régénération et à la face interne de la cuticule du moignon (↔).

1, 2, 3, 4 - Même échelle.

 CR, chambre de régénération ; E, épiderme du régénérat ; He, hémolymphe.

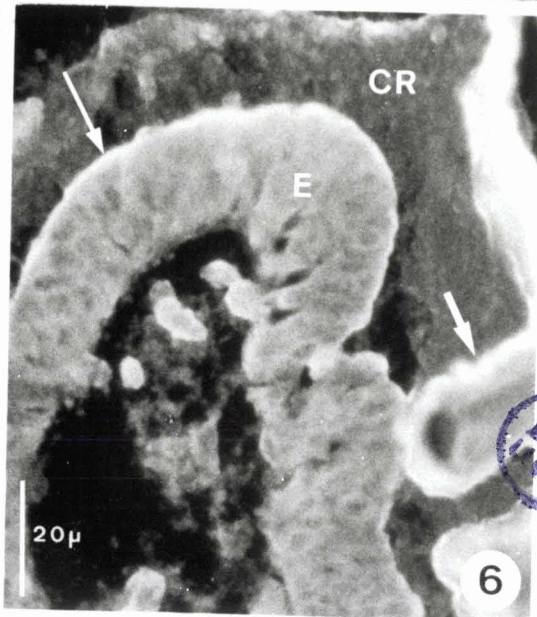
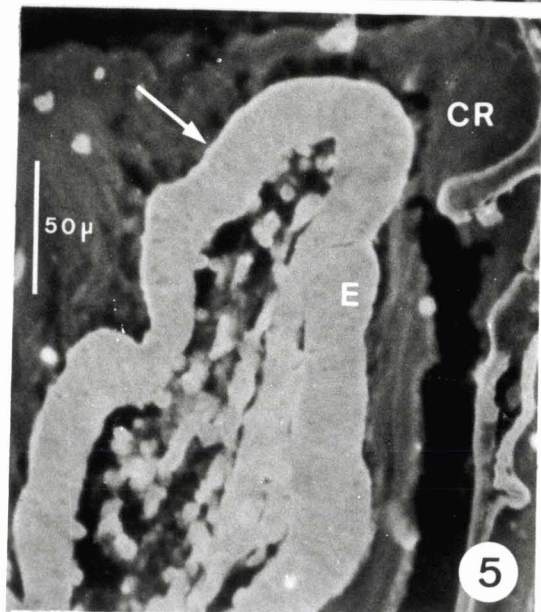
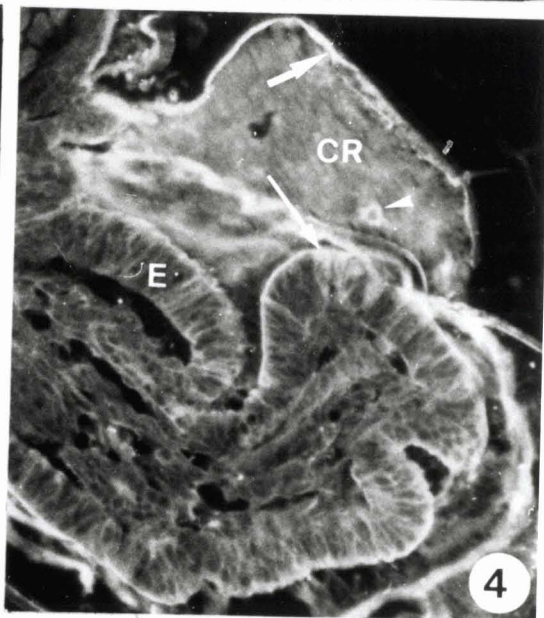
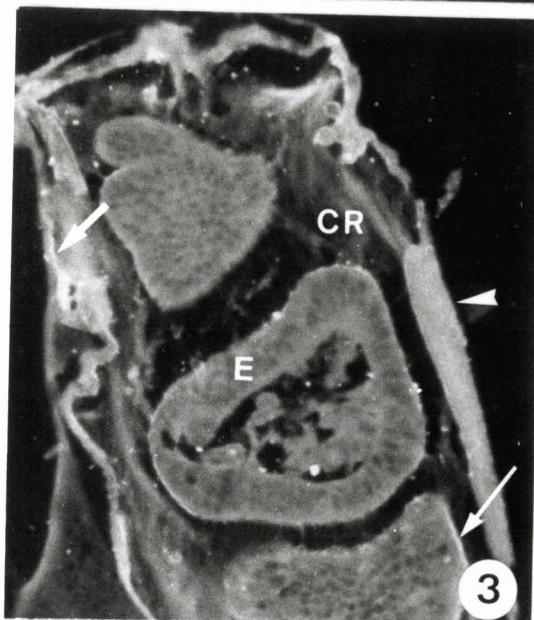
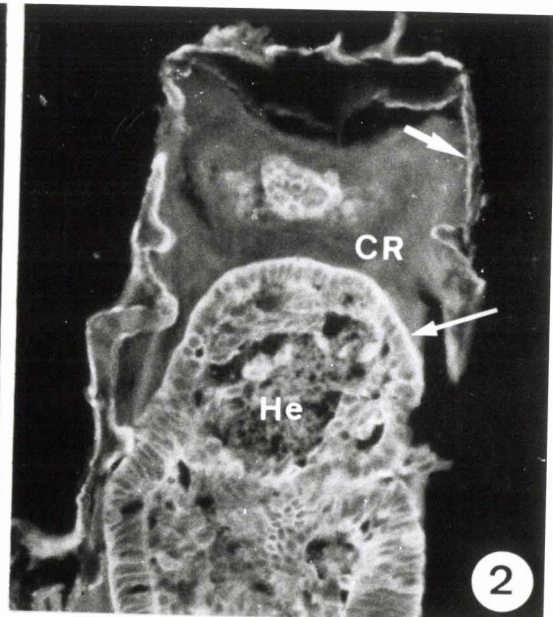
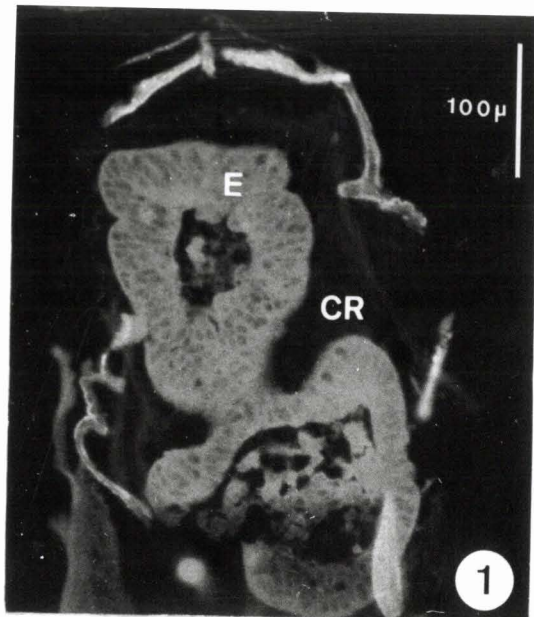


PLANCHE XI

RESULTATS DE LA FIXATION DE LECTINES LIEES A LA FLUORESCEINE SUR DES REGENERATS EN PHASE 7.

Dans les 2 cas, la face dorsale est à gauche et la face ventrale à droite.

1 - Fixation de Con A. Avec cette lectine, qui révèle la présence de mannose, la chambre de régénération, les membranes plasmiques des cellules épidermiques, des cellules présentes à l'intérieur du régénérat ainsi que les cellules présentes dans la chambre de régénération fluorescent (◀).

2 - Fixation de WGA. Avec cette lectine qui révèle la présence de Glc Nac, le matériel de la chambre est plus fortement fluorescent. Un liseré fluorescent (◀) continu borde la face apicale des cellules épidermiques du régénérat. Le contour des cellules présentes dans la chambre de régénération fluoresce (◀◀). La cuticule des trachées fluoresce également.

1 et 2 - Même échelle.

CR, chambre de régénération ; E, épiderme ; T, trachées.



BU
LILLE

PLANCHE XII

ASPECTS ULTRASTRUCTURAUX OBTENUS AVEC LE ROUGE DE RUTHENIUM.

Le rouge de ruthénium a été ajouté aux fixateurs (2-6-10) ou, pour les autres photographies, injecté avant la fixation dans la chambre de régénération d'un moignon coxo-trochantérien en phase 4.

1 et 2 - Sternite fixé sans (1) ou avec (2) du rouge de ruthénium. La lame basale (►) très épaisse (250 nm) est fortement soulignée par le rouge de ruthénium ainsi que les membranes plasmiques dans leur partie basale (◄). 1 : x9550 ; 2 : x4700.

3 - Phagosome observé dans l'épiderme du régénérat en formation 2 jours après l'injection. x11500.

4 et 5 - 1 heure après l'injection, le matériel de la chambre apparaît constitué de filaments de taille variable. Des granules d'environ 50 nm sont disposés autour d'une zone plus dense aux électrons (◄). x38000.

6 - Sur des bourgeons en phase 3, des zones très denses aux électrons sont présentes à la face apicale de l'épiderme (◄). x19400.

7 à 9 - La fixation a eu lieu 1 jour après l'injection.

7 - Dans la chambre de régénération, des vésicules membranaires (◄) sont accolées aux cellules épidermiques. x19100.

8 - Dans la chambre de régénération, au-dessus de l'épiderme, des zones denses aux électrons sont visibles (◄). x22000. Des petites vésicules revêtues sont présentes à la surface apicale des cellules épidermiques (◄) (encart. x14400)

9 - Les cellules, présentes dans la chambre de régénération et qui semblent être des hémocytes, possèdent au sein du cytoplasme des zones très denses aux électrons (◄). x5800.

10 - Sur des bourgeons de régénération en phase 6, les membranes plasmiques latérales sont fortement soulignées (◄). x4000.

Cu, cuticule ; CR, chambre de régénération ; E, épiderme ; N, noyau ; oe, oenocyte.

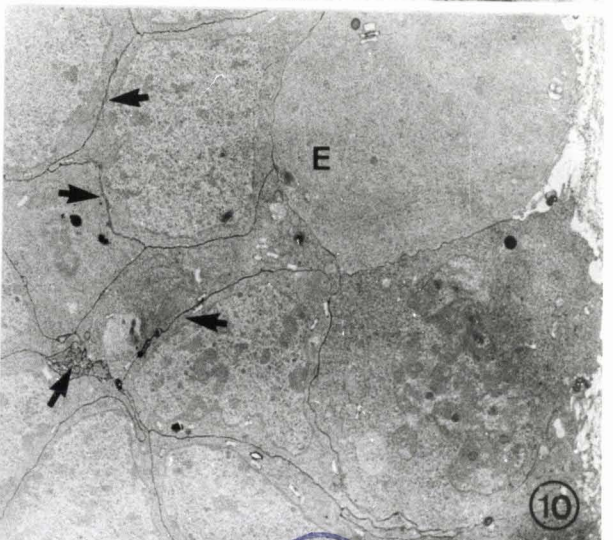
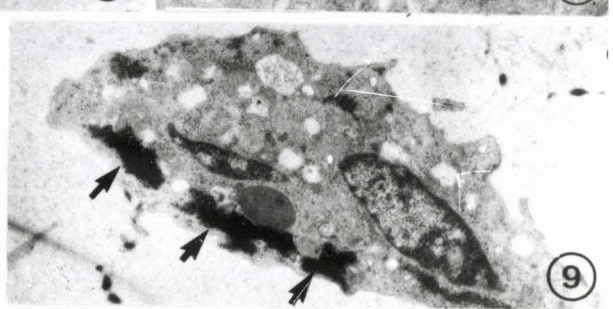
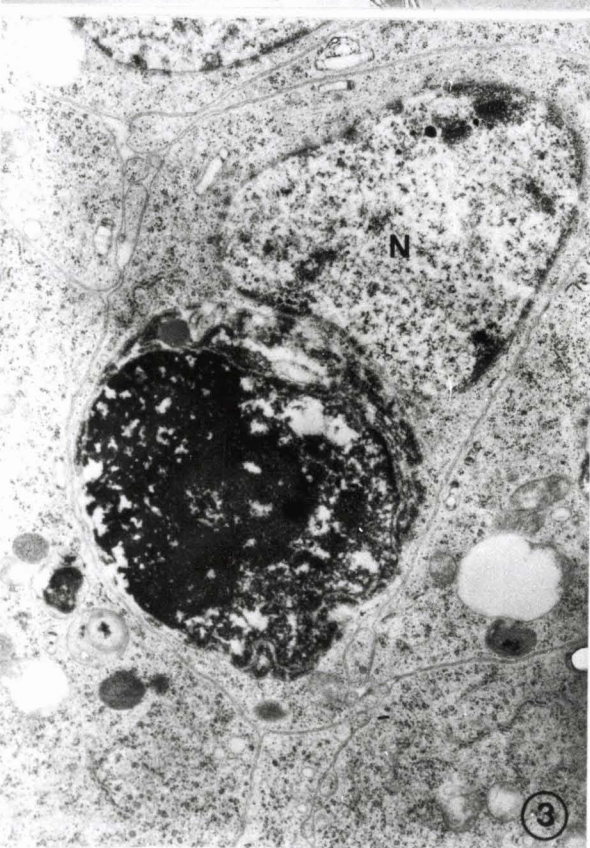
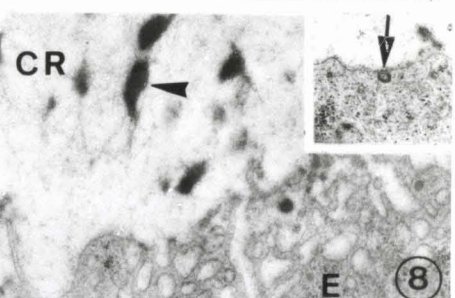
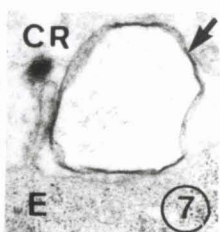
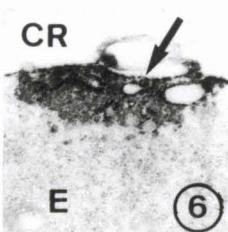
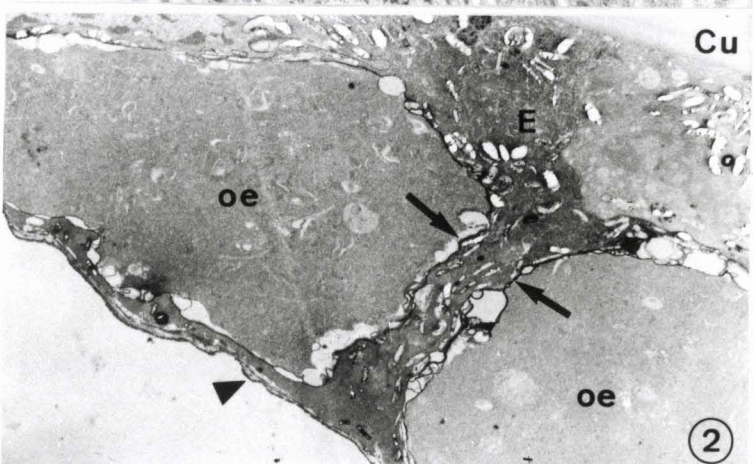
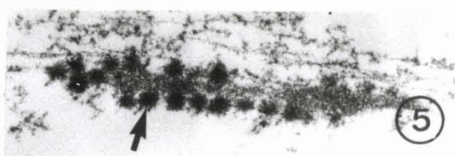
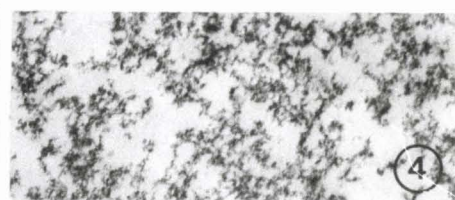
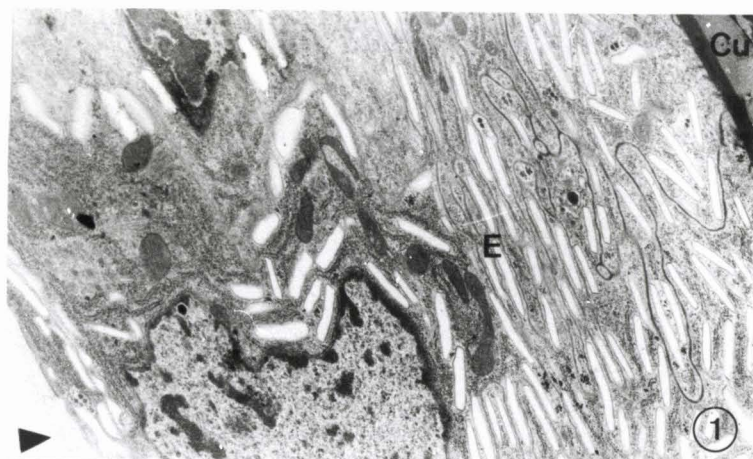


PLANCHE XIII

ASPECTS ULTRASTRUCTURAUX OBTENUS AVEC L'ACIDE TANNIQUE.

1 - Le matériel de la chambre de régénération, d'aspect fibrillaire, semble constituer deux couches, les fibres de la couche proches de l'épiderme sont plus fines (★). Les membranes plasmiques des cellules épidermiques sont soulignées par endroits (←), ainsi que celles des hémocytes de la couche interne du caillot. Certaines cellules épidermiques sont très denses aux électrons (✱). L'hémolymphe est également très marquée. x4250.

2 - Dans la chambre de régénération. des zones plus ou moins denses sont observables (★) . x7200.

3 - L'épaisseur des fibres de la chambre de régénération est très variable (grossissement de la couche ★ de la figure 1). x58000.

4 - Grossissement des membranes plasmiques et de l'espace intercellulaire fortement denses aux électrons. x70500.

Ca, caillot ; CR, chambre de régénération ; E, épiderme ; He, hémolymphe.



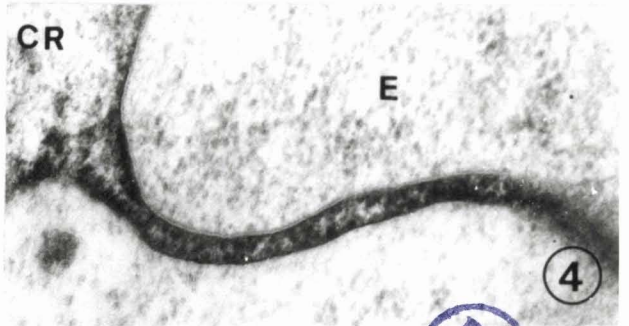
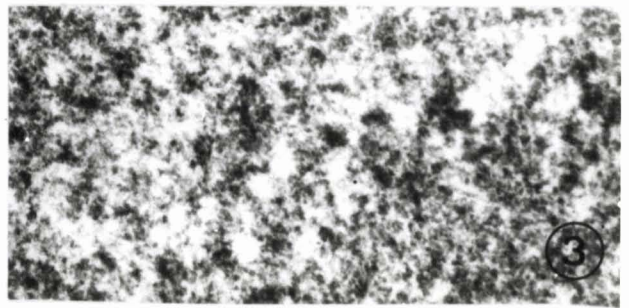
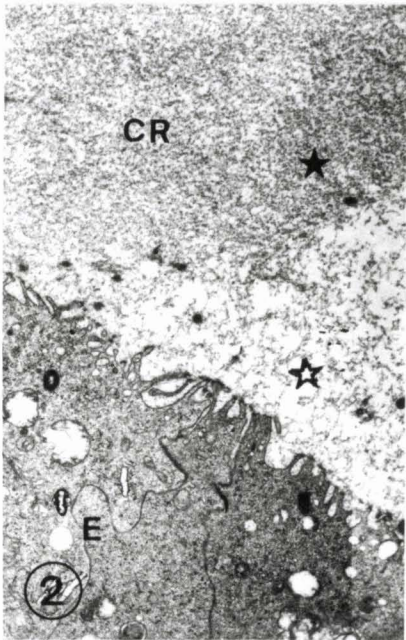
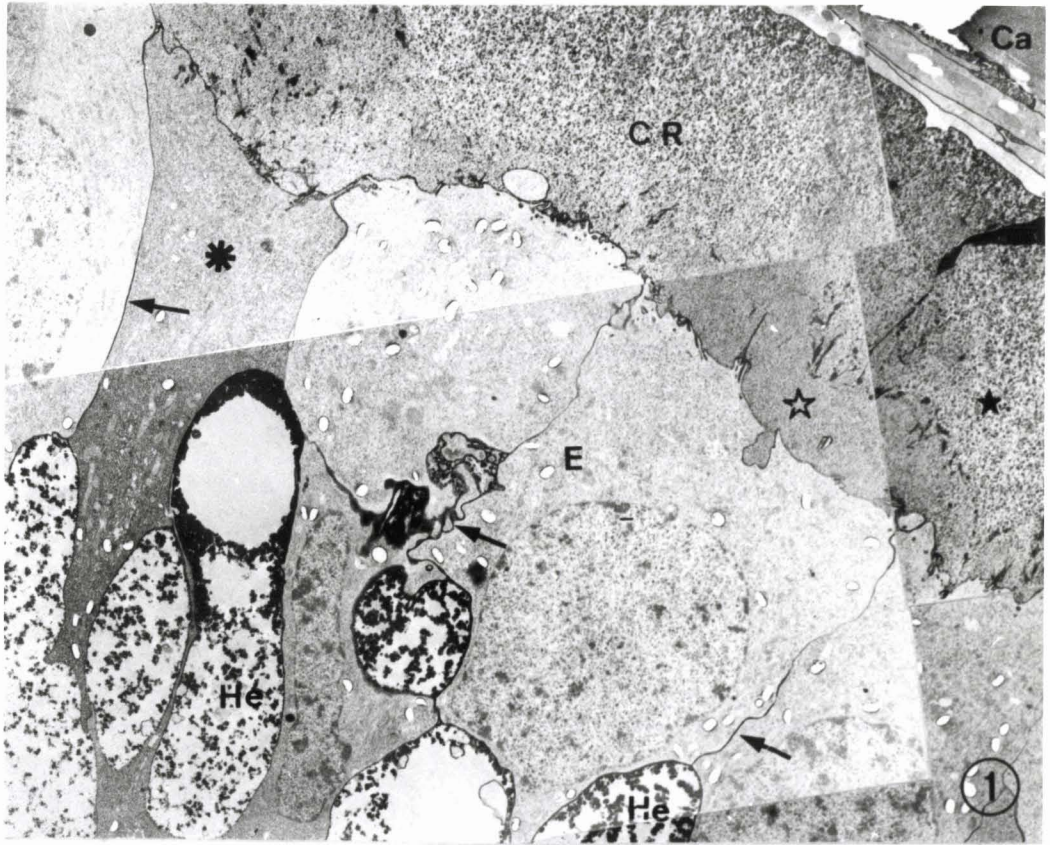


PLANCHE XIV

ISOLEMENT DE MEMBRANES PLASMIQUES D'EPIDERME.

1 et 2 - Aspects ultrastructuraux des culots de centrifugation. Les tergites broyés à l'homogénéiseur de Potter subissent trois centrifugations successives : 1ère, 1000 g, 10 minutes ; 2ème, 10000 g, 10 minutes ; 3ème, 100000g, 60 minutes.

1 - Culot de la 2ème centrifugation.

a. De nombreux éléments cellulaires sont présents : pigments (p), mitochondries (m) et de grands fragments de membranes plasmiques. (mp). x7400.

b. Fragments de membranes plasmiques à plus fort grossissement ainsi qu'une coupe tangentielle de jonction septée. x22400.

2 - Culot de la 3ème centrifugation.

a. Le culot contient presque exclusivement des vésicules de taille variant de 0,1 à 0,6 μm . x5000.

b. A plus fort grossissement, les membranes qui composent ces vésicules présentent des aspects différents. Certaines présentent des doubles membranes (\leftarrow) et doivent provenir de jonctions intercellulaires. Dans la plupart des cas, une seule membrane constitue ces vésicules qui présentent également des grains. x26000.

3 et 4 - Analyse électrophorétique.

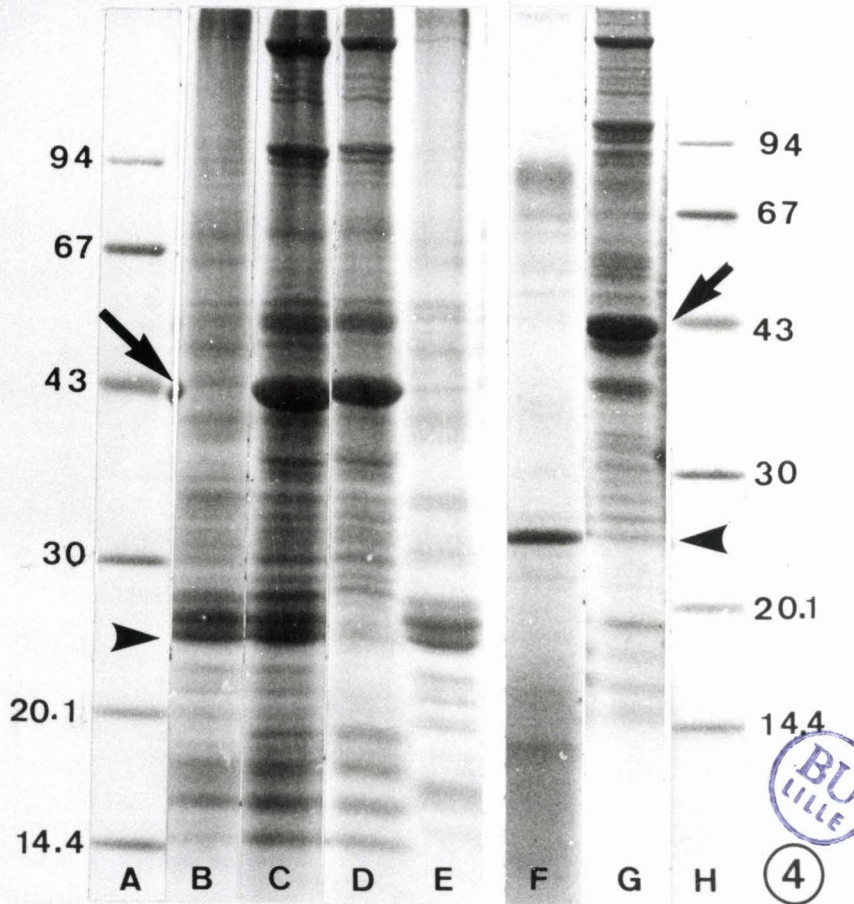
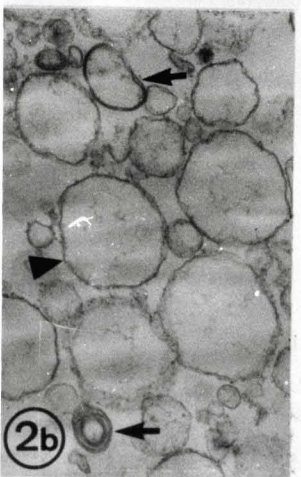
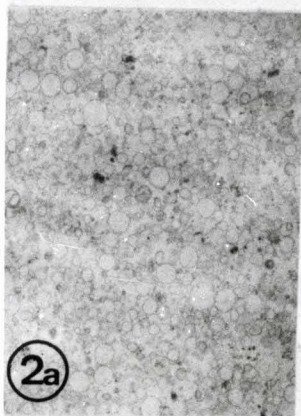
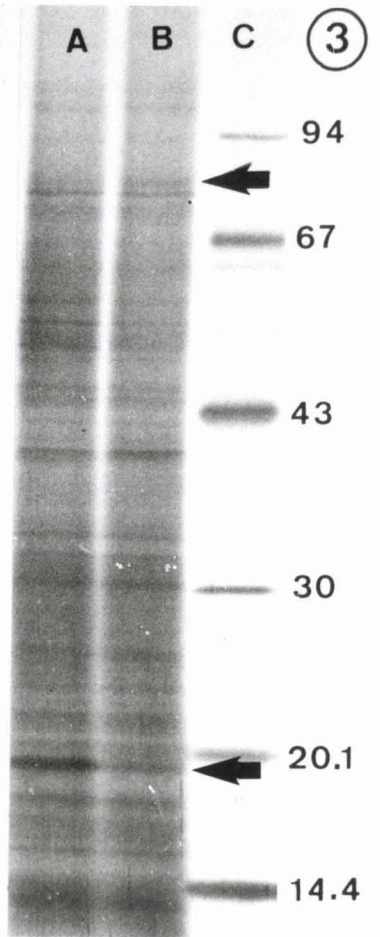
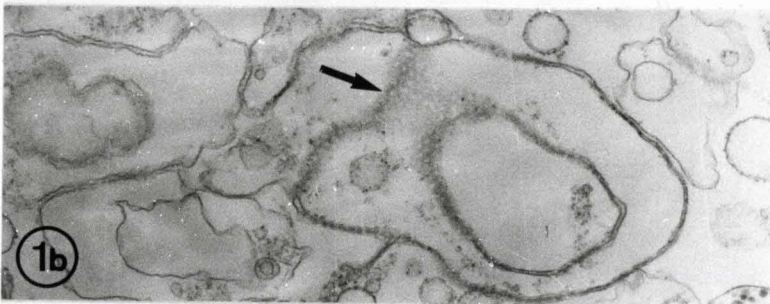
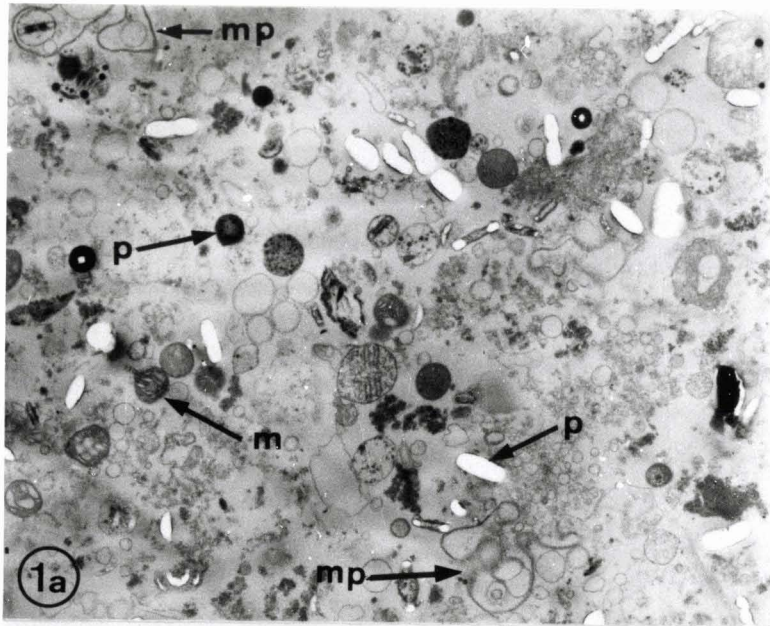
3 - Analyse des culots de centrifugation qui ont servi à immuniser les souris.

Membranes plasmiques de tergite (A) et sternite (B). Marqueurs de poids moléculaire en Kd(C). Les flèches indiquent les seules différences quantitatives observées entre tergite et sternite (coloration à l'argent).

4 - Analyse de sternite entier (B), de tergite entier (C), de cuticule (D) et d'épiderme (E) de tergite, d'hémolymphe (F), de muscles (G). Marqueurs de poids moléculaire en Kd (A et H).

\rightarrow bande majeure des muscles qui se retrouve au niveau des tergites entiers (C) et de la cuticule de tergite (D).

\blacktriangleright bande majeure de l'hémolymphe qui se retrouve au niveau des sternites entiers(B), tergites entiers (C) et épidermes de tergites (E).



BU
LILLE

PLANCHE XV

ASPECTS DES REGENERATS APRES INJECTION D'HEPARINE.

1.2.3 - Régénérats d'animaux qui ont reçu 0,15 mg d'héparine au stade IV.

1 et 2 - Autotomie 1 jour après l'injection.

1 - Au stade V, un ergot est visible sur la face ventrale du trochanter (←→).

2 - Même régénérat aux stades V (a) et VI (b)

2a - Le régénérat de très petite taille est constitué d'une coxa, d'un trochanter et d'une tige où l'onychium est reconnaissable (→→).

2b - Bien que le régénérat soit petit, tous les articles sont présents. La déficience ventrale du fémur, qui est très court, et du tibia met en relation le tarse et le trochanter (←→). L'onychium est très gros (←→). Un ergot est apparu au niveau du trochanter (◀).

3 - Autotomie 35 jours après l'injection. Animal en stade VI.

3a - Le fémur est court. Dans la membrane articulaire tibio-tarsale du côté dorso-postérieur, un petit appendice articulé est présent (←→).

3b - Aspect du petit appendice à plus fort grossissement.

3c - La membrane articulaire fémoro-tibiale très grande du côté ventral (★) présente en son centre un mamelon à cuticule sclérotisée(←→).

4.5 - Aspects histologiques de moignons coxo-trochantériens de phasme chez qui l'autotomie a été provoquée 1 à 2 jours après l'injection d'héparine.

4 - Injection de 0,5 mg d'héparine.

Moignon fixé 1 jour après l'autotomie. Le caillot n'est pas encore bien formé. Un matériel abondant et fortement colorable par le bleu alcian est visible (←) entre les nombreux hémocytes accumulés au niveau de la plaie.

5 - Injection de 0,25 mg d'héparine.

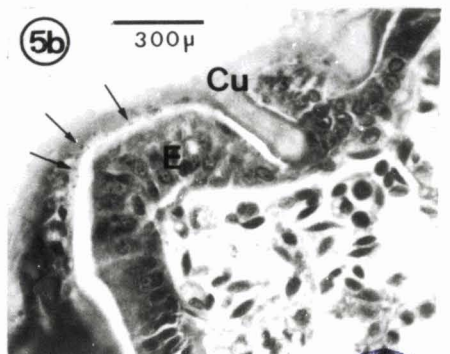
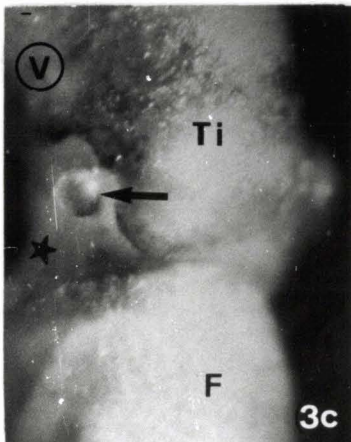
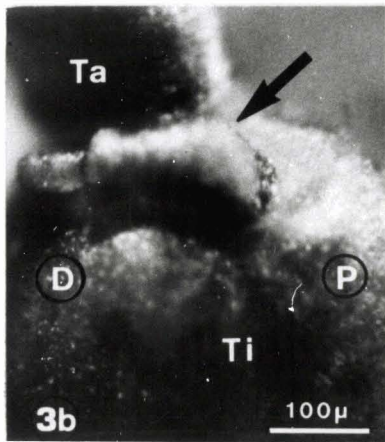
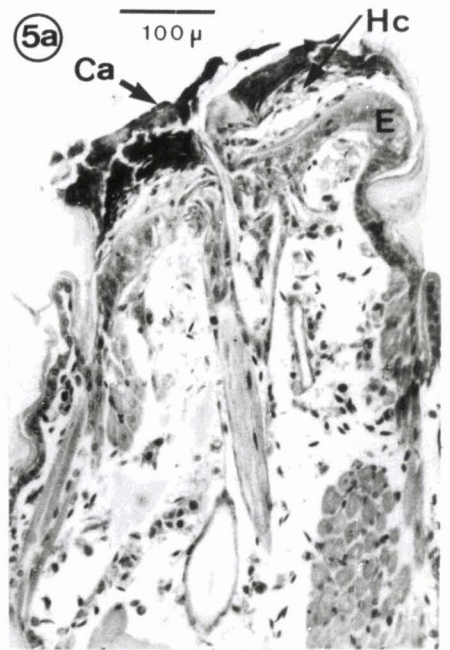
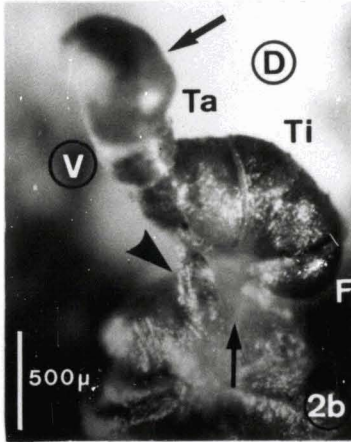
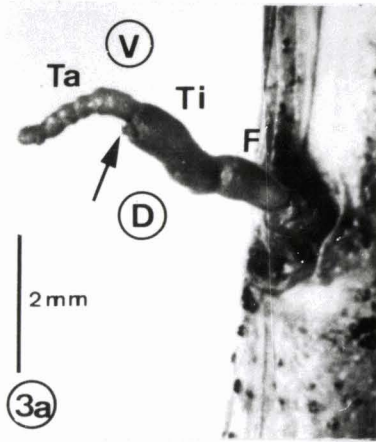
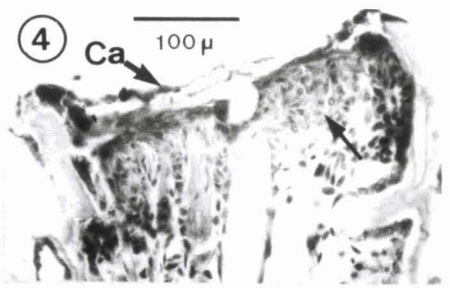
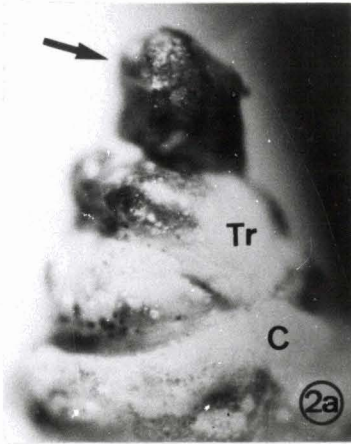
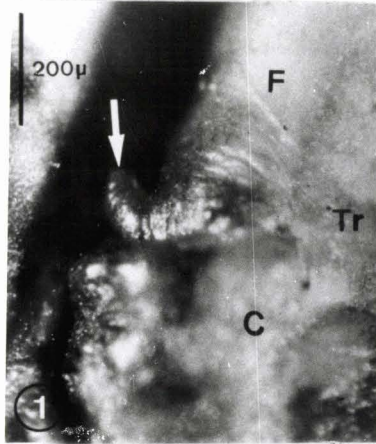
Moignon fixé 12 jours après l'autotomie.

5a - Le caillot est très épais et de nombreux hémocytes sont encore bien visibles à sa face interne (→). La continuité épidermique est rétablie. Le régénérat est en phase 2 mais la hauteur de l'épiderme trochantérien est moindre que chez un animal simplement autotomisé.

5b - De nombreux granules sont visibles entre l'épiderme et la cuticule (→).

1 et 2a - Même échelle. 3c, même échelle que 3b.

C, coxa ; Ca, caillot ; Cu, cuticule ; D, dorsal ; E, épiderme ; F, fémur ; Hc, hémocytes ; p, postérieur ; Tr, trochanter ; Ti, tibia.



BU
LILLE

PLANCHE XVI

RESULTATS HISTOLOGIQUES ET MORPHOLOGIQUES OBTENUS APRES L'INJECTION DE ROUGE DE RUTHENIUM DANS LA CHAMBRE DE REGENERATION D'UN REGENERAT EN PHASE 4 D'ANIMAUX EN STADE IV.

Pour toutes les figures, la face ventrale est à gauche et la face dorsale à droite.

1 à 6 - Dose injectée : 0,1 µg de rouge de ruthénium.

1 - Dans ce moignon fixé 28 jours après l'injection, un amas de cellules (✱) occupe la place du régénérat.

2 - Dans ce moignon fixé 36 jours après l'injection, l'amas de cellules entoure le régénérat dont l'épiderme est peu distinct (→→).

3 - Les cellules épidermiques du régénérat constituent une couche très mince (←←). Un petit amas cellulaire (→→) persiste entre l'apex du régénérat et le niveau d'autotomie.

4 - Dans ce moignon fixé 57 jours après l'injection, un amas cellulaire est présent (←), le matériel de la chambre de régénération est pratiquement inexistant (✱) et une cuticule est sécrétée par les cellules épidermiques (▶). Une autre couche cuticulaire est détachée de l'épiderme (▼).

5 - L'épiderme tergal du mésothorax a sécrété une nouvelle cuticule (NC). L'ancienne cuticule (AC) a été partiellement digérée excepté au niveau d'une plage brune (PB).

6 - Les coupes histologiques ont été réalisées au stade V (1ère intermue post-opératoire), on y observe un régénérat segmenté (R) et une autre formation montrant des digitations (←←).

7 - Dose injectée : 0,2 µg de rouge de ruthénium.

Régénérat adulte d'environ 2 mm constitué : d'un onychium très net (←) dirigé vers l'axe médio-ventral de l'animal et d'une partie située dans l'axe proximal distal de la coxa (▼) partie qui a peu évolué. a, vue ventrale; b, vue dorsale; c, vue postéro-dorsale.

1 et 5 - Même échelle ; 3, 4, 6 - Même échelle que 2.

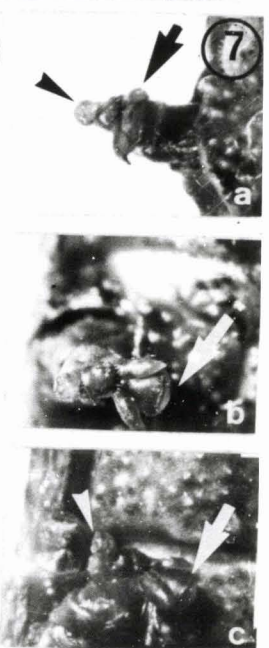
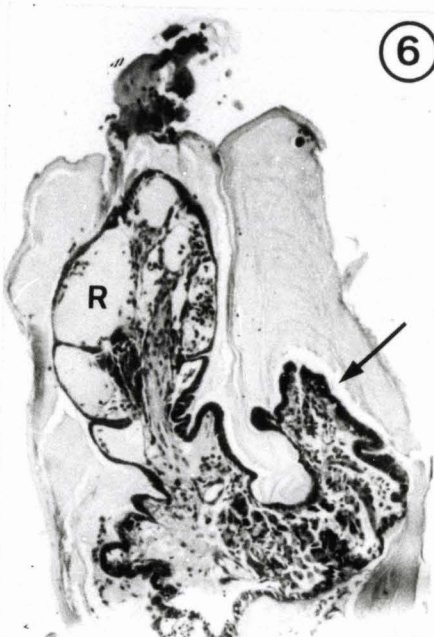
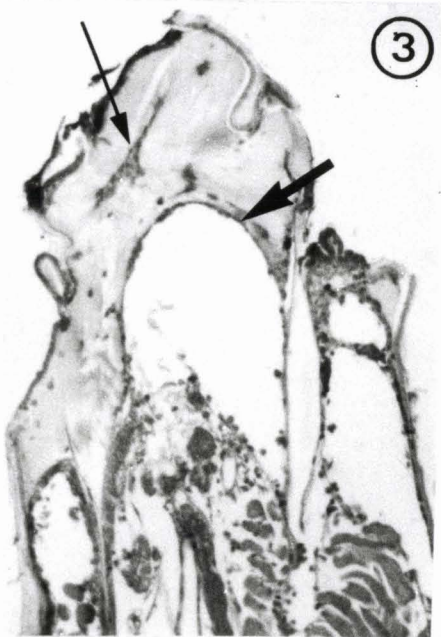
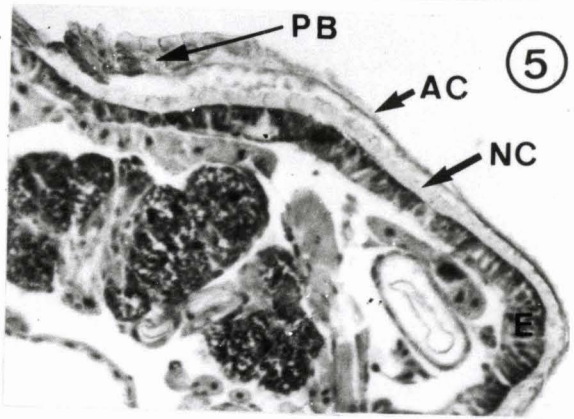
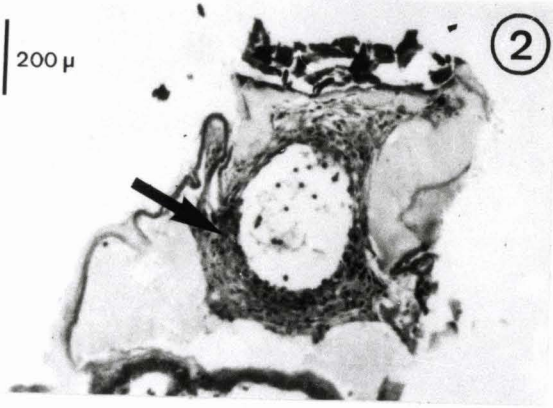
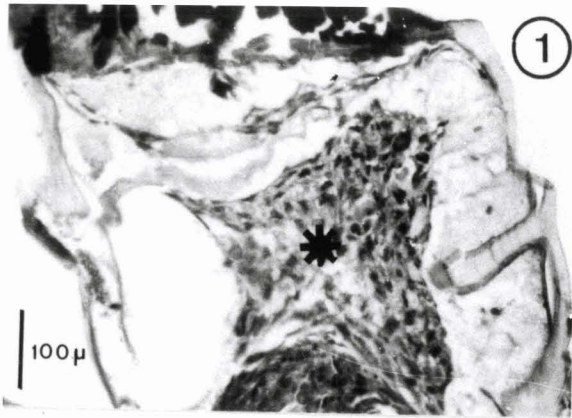


PLANCHE XVII

ASPECTS HISTOLOGIQUES DE MOIGNONS COXO-TROCHANTERIENS D' ANIMAUX EN STADE IV APRES L'INJECTION DE MEMBRANES PLASMIQUES D'EPIDERMME DANS LA CHAMBRE DE REGENERATION.

Le côté de l'injection est signalé par un astérisque.

1 et 2 - Injection ventrale de membranes plasmiqes d'épiderme tergal (100 ng de protéines) dans des moignons coxo-trochantériens en phase 4.
Fixation 5 jours après l'injection.

La ligne de rétraction qui normalement devrait se situer au milieu de la coxa est toujours en haut de la coxa (◀). Des excroissances (←→) sont visibles du côté injecté (1) ou à l'opposé (2).

3 (a, b) et 4 - Injection ventrale de membranes plasmiqes de faces dorsales de fémurs (50 ng de protéines) dans des moignons coxo-trochantériens en phase 5 (3) et 6 (4).

Fixation 8 jours après l'injection.

La ligne de rétraction qui devrait se situer au bas de la coxa a peu bougé (◀).

3 - Le bourgeon de régénération a continué son évolution. **a,** Des digitations épidermiques sont visibles sur la face dorsale du tibia (←). **b,** l'allure du tarse est anormale (→). Le matériel de la chambre est très fibreux (→→) et une partie du matériel injecté forme une masse nécrotique (←→).

4 - Une excroissance est visible dans la partie proximale du bourgeon de régénération (→→)

5 - Injection dorsale de membranes plasmiqes de faces ventrales de fémurs (20 ng de protéines) dans des moignons coxo-trochantériens en phase 3.

Fixation 12 jours après l'injection.

La ligne de rétraction est toujours en haut de la coxa (▶) alors que le régénérat est replié. L'épiderme du régénérat est très digité. L'épiderme coxal est recouvert d'un matériel fibreux (←) qui apparaît détaché de l'épiderme, matériel qui ne se retrouve pas au-dessus de l'épiderme du régénérat.

Toutes les photographies sont à la même échelle. d, côté dorsal ; v, côté ventral.

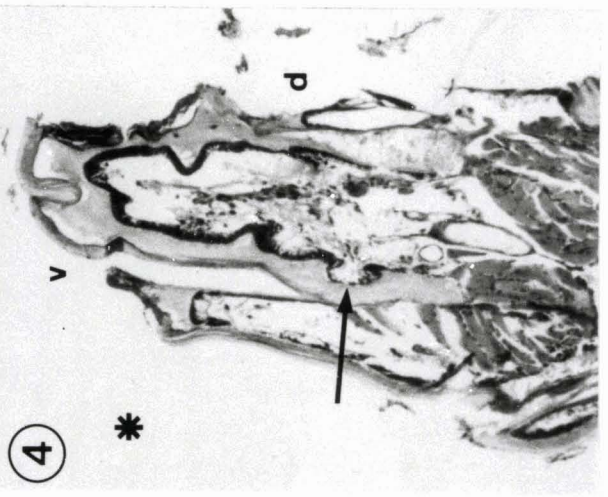
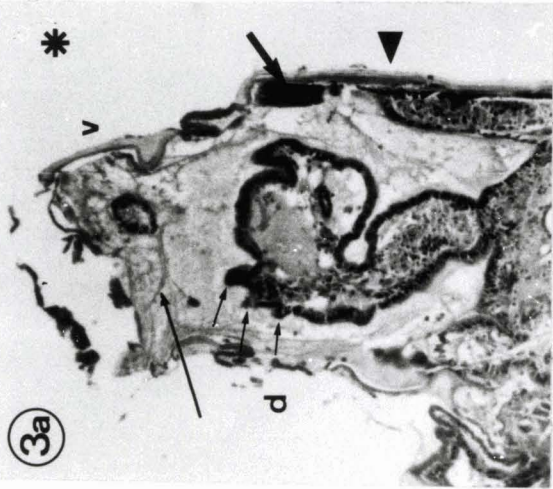
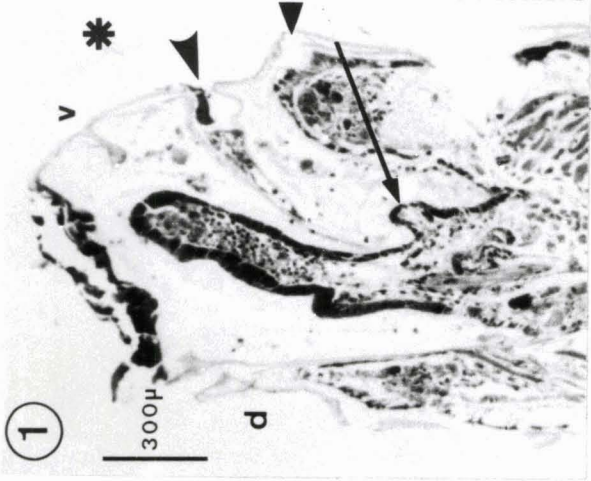
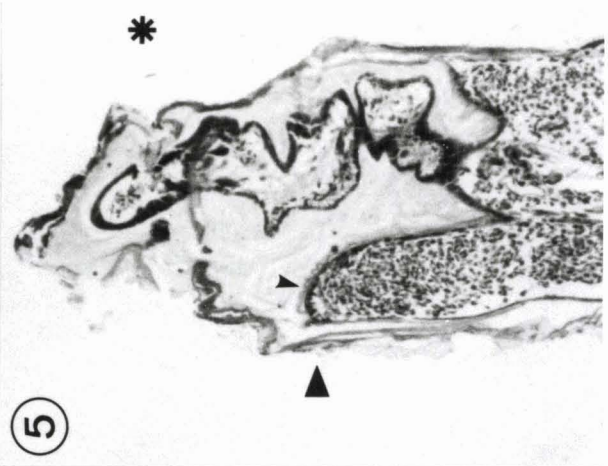
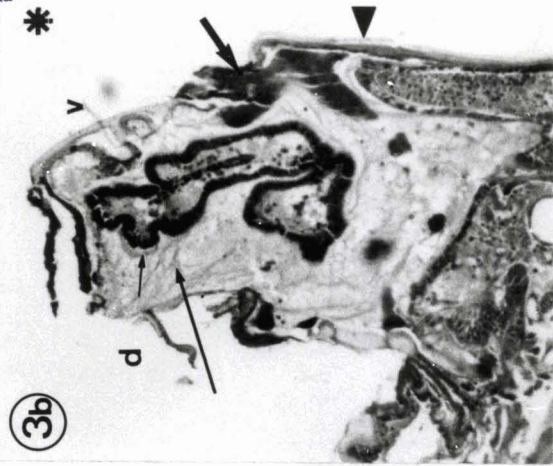
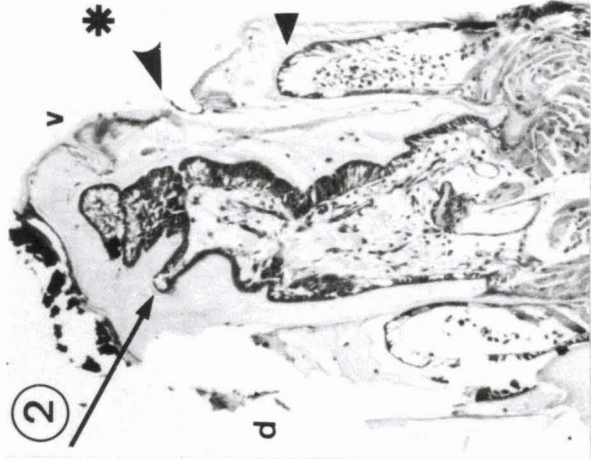


PLANCHE XVIII

ASPECTS DE REGENERATS OBTENUS APRES INJECTIONS AU STADE IV DE MEMBRANES PLASMIQUES D'EPIDERME.

1 a et b - Régénérats observés au stade V après l'injection de membranes plasmiques de tergites (100 ng de protéines) du côté ventral dans des chambres de régénération de bourgeons en phases 3 (a) ou 4 (b).

1a - L'extrémité distale du régénérat s'est nécrosée, le fémur est très court et la membrane articulaire fémoro-tibiale est grande du côté dorsal (←).

1b - Déficience antéro-ventrale du tibia qui donne un aspect enroulé à l'extrémité distale du régénérat.

2 a, b et c - Régénérat observé au stade VI après l'injection de membranes plasmiques de sternites (100 ng de protéines) du côté dorsal avec lésion du bourgeon de régénération qui était en phase 4. Même échelle.

2a - Le régénérat possède un tibia court qui présente une déficience dorsale (←) et un tarse avec 2 articles visibles ventralement ; vue postérieure.

2b - Le régénérat présente une membrane fémoro-tibiale qui atteint la base du tarse (←); vue dorsale.

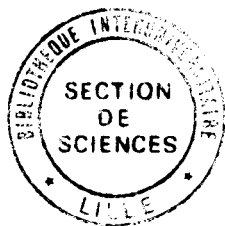
2c - Le tibia, très court, présente une déficience dorsale (←); vue postérieure.

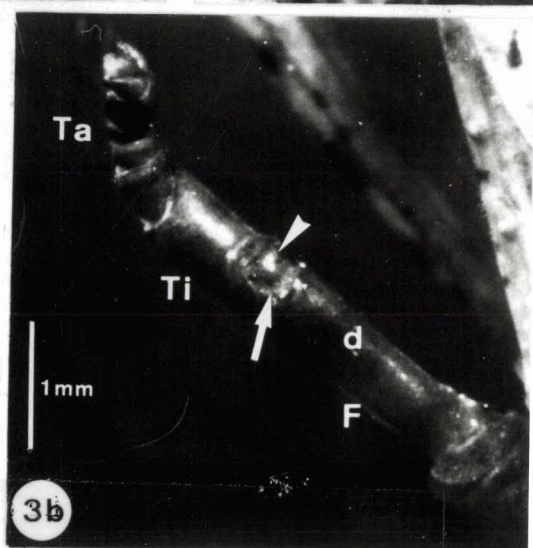
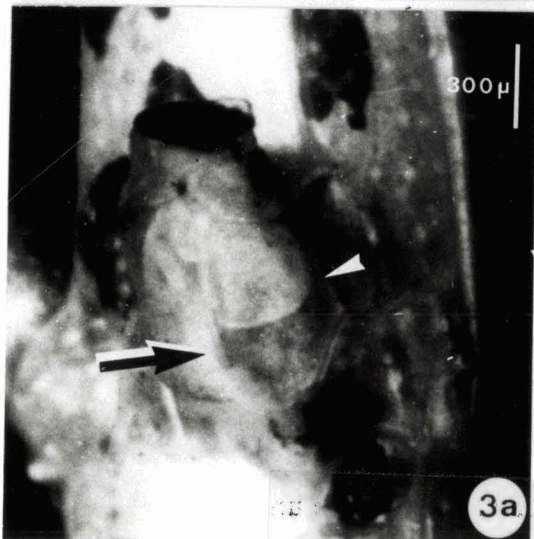
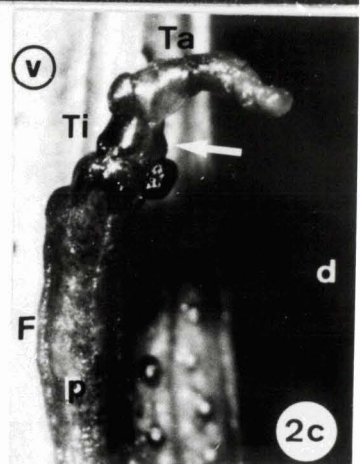
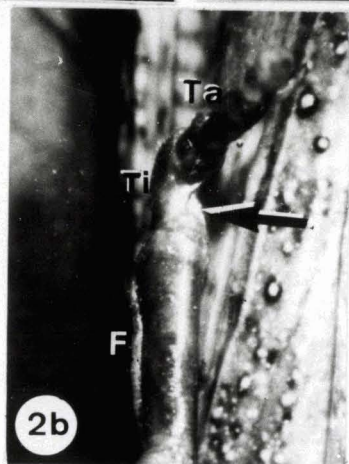
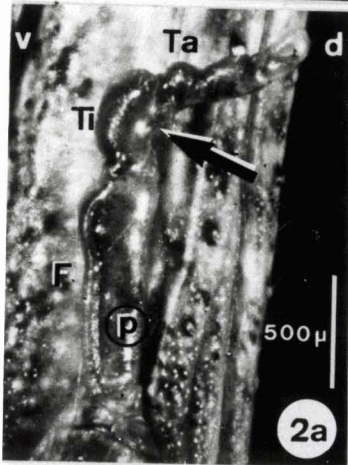
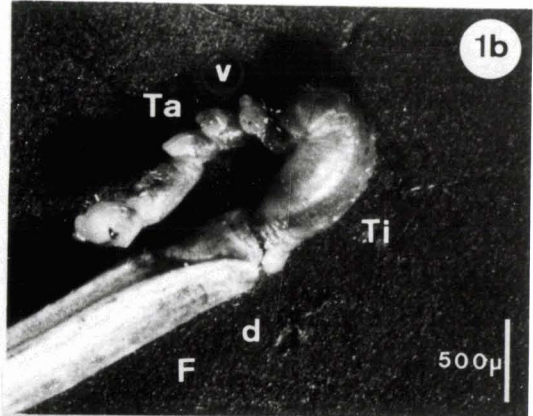
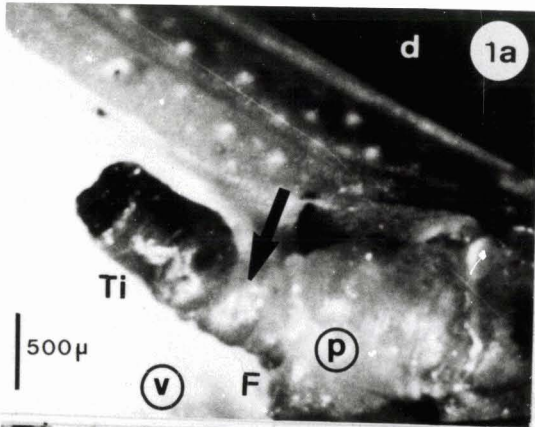
3 - Injection dorsale de membranes plasmiques de faces ventrales de fémurs:

3a - 50 ng de protéines injectés dans des bourgeons de régénération en phase 5, Moignon coxo-trochantérien d'un animal en stade IV fixé 12 jours après l'injection. La ligne de rétraction de l'épiderme se situe au 1/3 de la coxa (◀). Sur le régénérat, une formation a évolué en direction proximale et atteint le segment mésothoracique (←).

3b - 20 ng de protéines injectés dans des bourgeons de régénération en phase 3, Régénérat en vue dorsale (stade V). Le tibia court présente une déficience postérieure distale et un renflement dorsal proximal (◀). La membrane articulaire fémoro-tibiale est bien développée (→).

d, dorsal ; F, fémur ; p, postérieur ; Ti, tibia ; Ta, tarse ; v, ventral.





Chez le phasme, *Carausius morosus*, nous avons tenté de caractériser l'information de position des cellules épidermiques d'un régénérat de patte mis en place après une autotomie. Des études histologiques, ultrastructurales et cytochimiques, révèlent la présence, dans la gangue qui entoure le régénérat, de chitine non liée à des protéines, de glycosaminoglycanes non sulfatés tels l'acide hyaluronique et/ou la chondroïtine, de sucres. Des glycoprotéines apparentées à la fibronectine et au collagène IV des Vertébrés sont associées à la face apicale des cellules du régénérat. Aucune régionalisation de répartition des sucres des surfaces épidermiques n'a été observée. Des anti-sérums contenant des anticorps dirigés contre des antigènes présumés spécifiques de position ne révèlent aucune spécificité.

Nous avons tenté de perturber la morphogenèse régénératrice par l'injection de substances susceptibles d'agir sur des constituants des surfaces cellulaires et de modifier l'expression de l'information de position. L'héparine injectée dans le corps de l'animal retarde la cicatrisation et entraîne des perturbations qui semblent affecter les cellules et/ou la physiologie de l'animal. Les autres substances: rouge de ruthénium, extraits de membranes plasmiques d'épiderme, lectines, injectées dans la chambre de régénération ont également entraîné des perturbations morphologiques et un allongement de l'intermue. Dans tous les cas, on observe des déficiences de tout ou partie de la zone proximale du régénérat. L'augmentation de la durée de l'intermue semble liée à une perturbation du métabolisme endocrine.