



HAL
open science

**Etude de la prolifération cellulaire et de sa régulation
chez l'embryon âgé et la jeune larve du triton
Pleurodeles Waltlii Michah : conception et réalisation
d'un système automatique d'analyse
microphotométrique des populations cellulaires**

Gérard Brugal

► **To cite this version:**

Gérard Brugal. Etude de la prolifération cellulaire et de sa régulation chez l'embryon âgé et la jeune larve du triton *Pleurodeles Waltlii Michah* : conception et réalisation d'un système automatique d'analyse microphotométrique des populations cellulaires. Modélisation et simulation. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 1976. tel-00287042

HAL Id: tel-00287042

<https://theses.hal.science/tel-00287042>

Submitted on 10 Jun 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Numéro d'enregistrement
au C.N.R.S. :

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ SCIENTIFIQUE
ET MÉDICALE DE GRENOBLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

(SCIENCES NATURELLES)

par **Gérard BRUGAL**

Etude de la prolifération cellulaire et de sa
régulation chez l'embryon âgé et la
jeune larve du triton Pleurodeles waltlii
Michah. Conception et réalisation d'un
système automatique d'analyse
microphotométrique des populations
cellulaires

Soutenu le 3 DÉCEMBRE 1976 devant la Commission d'examen :

MM.	P. SENDEL	Président
	M. BALLS	
	J.C. BISCONTE	Rapporteurs
	P. CHIBON	
	C. ROSENFELD	
	J.P. BERTRANDIAS	Examineurs

UNIVERSITE SCIENTIFIQUE
ET MEDICALE DE GRENOBLE

Monsieur Gabriel CAU : Président
Monsieur Pierre JULLIEN : Vice Président

MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT DE L'U.S.M.G.

PROFESSEURS TITULAIRES

MM. ARNAUD Paul	Chimie
AUBERT Guy	Physique
AYANT Yves	Physique approfondie
Mme BARBIER Marie-Jeanne	Electrochimie
MM. BARBIER Jean-Claude	Physique Expérimentale
BARBIER Reynold	Géologie appliquée
BARJON Robert	Physique nucléaire
BARNOUD Fernand	Biosynthèse de la cellulose
BARRA Jean-René	Statistiques
BARRIE Joseph	Clinique chirurgicale
BEAUDOING André	Clinique de Pédiatrie et Puériculture
BERNARD Alain	Mathématiques Pures
Mme BERTRANDIAS Françoise	Mathématiques Pures
MM. BERTRANDIAS Jean-Paul	Mathématiques Pures
BEZES Henri	Pathologie chirurgicale
BLAMBERT Maurice	Mathématiques Pures
BOLLIET Louis	Informatique (IUT B)
BONNET Georges	Electrotechnique
BONNET Jean-Louis	Clinique ophtalmologique
BONNET-EYHARD Joseph	Clinique gastro-entérologique
Mme BONNIER Marie-Jeanne	Chimie générale
MM. BOUCHERLE André	Chimie et toxicologie
BOUCHEZ Robert	Physique nucléaire
BOUSSARD Jean-Claude	Mathématiques appliquées
BOUTET DE MONTVEL Louis	Mathématiques pures
BRAVARD Yves	Géographie
CABANEL Guy	Clinique rhumatologique et hydrologique
CALAS François	Anatomie
CARLIER Georges	Biologie végétale
CARRAZ Gilbert	Biologie animale et pharmacodynamie
CAU Gabriel	Médecine légale et toxicologie
CAUQUIS Georges	Chimie organique
CHABAUTY Claude	Mathématiques Pures
CHARACHON Robert	Clinique Oto-rhino-laryngologique
CHATEAU Robert	Clinique de neurologie
CHIBON Pierre	Biologie animale
COEUR André	Pharmacie chimique et chimie analytique
CONTAMIN Robert	Clinique gynécologique
COUDERC Pierre	Anatomie pathologique
Mme DEBELMAS Anne-Marie	Matière médicale
MM. DEBELMAS Jacques	Géologie générale
DEGRANGE Charles	Zoologie
DELORMAS Pierre	Pneumophtisiologie

MM. DEPORTES Charles	Chimie minérale
DESRE Pierre	Métallurgie
DESSAUX Georges	Physiologie animale
DODU Jacques	Mécanique appliquée (IUT A)
DOLIQUE Jean-Michel	Physique des plasmas
DREYFUS Bernard	Thermodynamique
DUCROS Pierre	Cristallographie
DUGOIS Pierre	Clinique de dermatologie et syphiligraphie
GAGNAIRE Didier	Chimie physique
GALLISSOT François	Mathématiques Pures
GALVANI Octave	Mathématiques Pures
GASTINEL Noël	Analyse numérique
GAVEND Michel	Pharmacologie
GEINDRE Michel	Electroradiologie
GERBER Robert	Mathématiques Pures
GERMAIN Jean-Pierre	Mécanique
GIRAUD Pierre	Géologie
JANIN Bernard	Géographie
KAHANE André	Physique générale
KLEIN Joseph	Mathématiques pures
KOSZUL Jean-Louis	Mathématiques pures
KRAVTCHENKO Julien	Mécanique
KUNTZMANN Jean	Mathématiques appliquées
LACAZE Albert	Thermodynamique
LACHARME Jean	Biologie végétale
Mme LAJZEROWICZ Janine	Physique
MM. LAJZEROWICZ Joseph	Physique
LATREILLE René	Chirurgie générale
LATURAZE Jean	Biochimie pharmaceutique
LAURENT Pierre	Mathématiques appliquées
LEDRU Jean	Clinique médicale B
LLIBOUTRY Louis	Géophysique
LOISEAUX Pierre	Sciences nucléaires
LONGEQUEUE Jean-Pierre	Physique nucléaire
LOUP Jean	Géographie
Melle LUTZ Elisabeth	Mathématiques Pures
MM. MALGRANGE Bernard	Mathématiques Pures
MALINAS Yves	Clinique obstétricale
MARTIN-NOEL Pierre	Clinique cardiologique
MAZARE Yves	Clinique médicale A
MICHEL Robert	Minéralogie et Pétrographie
MICOUD Max	Clinique maladies infectieuses
MOURIQUAND Claude	Histologie
MOUSSA André	Chimie nucléaire
MULLER Jean-Michel	Thérapeutique (néphrologie)
NEEL Louis	Physique du Solide
OZENDA Paul	Botanique
PAYAN Jean-Jacques	Mathématiques Pures
PEBAY-PEYROULA Jean-Claude	Physique
RASSAT André	Chimie systématique
RENARD Michel	Thermodynamique
REVOL Michel	Urologie
RINALDI Renaud	Physique
DE ROUGEMONT Jacques	Neuro-chirurgie
SEIGNEURIN Raymond	Microbiologie et Hygiène
SENGEL Philippe	Zoologie

MM. SIBILLE Robert	Construction mécanique (IUT A)
SOUTIF Michel	Physique générale
TANCHE Maurice	Physiologie
TRAYNARD Philippe	Chimie générale
VAILLANT François	Zoologie
VALENTIN Jacques	Physique nucléaire
VAUQUOIS Bernard	Calcul électronique
Mme VERAIN Alice	Pharmacie galénique
MM. VERAIN André	Physique
VEYRET Paul	Géographie
VIGNAIS Pierre	Biochimie médicale
YOCCOZ Jean	Physique nucléaire théorique

PROFESSEURS ASSOCIES

MM. CLARK Gilbert	Spectrométrie physique
CRABBE Pierre	CERMO
ENGLMAN Robert	Spectrométrie physique
HOLTZBERG Frédéric	Basses températures
DEMBICKI Eugéniuz	Mécanique
MATSUSHIMA Yozo	Mathématiques Pures

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Mlle AGNIUS-DELORE Claudine	Physique pharmaceutique
ALARY Josette	Chimie analytique
MM. AMBROISE-THOMAS Pierre	Parasitologie
BELORIZKY Elie	Physique
BENZAKEN Claude	Mathématiques appliquées
BIAREZ Jean-Pierre	Mécanique
BILLET Jean	Géographie
BOUCHET Yves	Anatomie
BRUGEL Lucien	Energétique (IUT A)
BUISSON René	Physique (IUT A)
BUTEL Jean	Orthopédie
COHEN ADDAD Pierre	Spectrométrie physique
COLOMB Maurice	Biochimie
CONTE René	Physique (IUT A)
DEPASSEL Roger	Mécanique des fluides
FONTAINE Jean-Marc	Mathématiques Pures
GAUTHIER Yves	Sciences Biologiques
GAUTRON René	Chimie
GIDON Paul	Géologie et Minéralogie
GLENAT René	Chimie organique
GROULADE Joseph	Biochimie médicale
HACQUES Gérard	Calcul numérique
HOLLARD Daniel	Hématologie
HUGONOT Robert	Hygiène et Médecine préventive
IDELMAN Simon	Physiologie animale
JOLY Jean-René	Mathématiques Pures
JULLIEN Pierre	Mathématiques appliquées
Mme KAHANE Josette	Physique
MM. KRAKOWIACK Sacha	Mathématiques appliquées
KUHN Gérard	Physique (IUT A)
LE ROY Philippe	Mécanique (IUT A)
LUU DUC Cuong	Chimie organique

MM. MAYNARD Roger	Physique du solide
Mme MINIER Colette	Physique (IUT A)
MM. PELMONT Jean	Biochimie
PERRIAUX Jean-Jacques	Géologie et Minéralogie
PFISTER Jean-Claude	Physique du solide
Mlle PIERY Yvette	Physiologie animale
MM. RAYNAUD Hervé	M.I.A.G.
REBECQ Jacques	Biologie (CUS)
REYMOND Jean-Charles	Chirurgie générale
RICHARD Lucien	Biologie végétale
Mme RINAUDO Marguerite	Chimie macromoléculaire
MM. ROBERT André	Chimie papetière
SARRAZIN Roger	Anatomie et chirurgie
SARROT-REYNAULD Jean	Géologie
SIROT Louis	Chirurgie générale
Mme SOUTIF Jeanne	Physique générale
MM. STREGLITZ Paul	Anesthésiologie
VIALON Pierre	Géologie
VAN CUTSEM Bernard	Mathématiques appliquées

MAITRES DE CONFERENCES ET MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM. AMBLARD Pierre	Dermatologie
ARMAND Gilbert	Géographie
ARMAND Yves	Chimie (IUT A)
BACHELOT Yvan	Endocrinologie
BARGE Michel	Neuro chirurgie
BARJOLLE Michel	M.I.A.G.
BEGUIN Claude	Chimie organique
Mme BERIEL Hélène	Pharmacodynamie
MM. BOST Michel	Pédiatrie
BOUCHARLAT Jacques	Psychiatrie adultes
Mme BOUCHE Liane	Mathématiques (CUS)
MM. BRODEAU François	Mathématiques (IUT B)
CHAMBAZ Edmond	Biochimie médicale
CHAMPETIER Jean	Anatomie et organogénèse
CHARDON Michel	Géographie
CHERADAME Hervé	Chimie papetière
CHIAVERINA Jean	Biologie appliquée (EFP)
CONTAMIN Charles	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
CORDONNIER Daniel	Néphrologie
COULOMB Max	Radiologie
CROUZET Guy	Radiologie
CYROT Michel	Physique du solide
DELOBEL Claude	M.I.A.G.
DENIS Bernard	Cardiologie
DOUCE Roland	Physiologie végétale
DUSSAUD René	Mathématiques (CUS)
Mme ETERRADOSSI Jacqueline	Physiologie
MM. FAURE Jacques	Médecine légale
FAURE Gilbert	Urologie
GAUTIER Robert	Chirurgie générale
GENSAC Pierre	Botanique
GIDON Maurice	Géologie
GROS Yves	Physiques (IUT A)

MM. GUITTON Jacques	Chimie
HICTER Pierre	Chimie
IVANES Marcel	Electricité
JALBERT Pierre	Histologie
JUNIEN-LAVILLAVROY Claude	O.R.L.
KOLCHIE Lucien	Hématologie
LE NOC Pierre	Bactériologie-virologie
LEROY Philippe	IUT A
MACHE Régis	Physiologie végétale
MAGNIN Robert	Hygiène et médecine préventive
MALLION Jean-Michel	Médecine du travail
MARECHAL Jean	Mécanique (IUT A)
MARTIN-BOUYER Michel	Chimie (CUS)
MICHOULLIER Jean	Physique (IUT A)
NEGRE Robert	Mécanique (IUT A)
NEMOZ Alain	Thermodynamique
NOUGARET Marcel	Automatique (IUT A)
PARAMELLE Bernard	Pneumologie
PECCOUD François	Analyse (IUT B)
PEFFEN René	Métallurgie (IUT A)
PERRET Jean	Neurologie
PERRIER Guy	Géophysique - Glaciologie
PHELIP Xavier	Rhumatologie
RACHAIL Michel	Médecine interne
RACINET Claude	Gynécologie et obstétrique
RAMBAUD André	Hygiène et hydrologie
RAMBAUD Pierre	Pédiatrie
Mme RENAUDET Jacqueline	Bactériologie
MM. ROBERT Jean-Bernard	Chimie Physique
ROMIER Guy	Mathématiques (IUT B)
SHOM Jean-Claude	Chimie générale
STOEBNER Pierre	Anatomie pathologique
VROUSOS Constantin	Radiologie

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIES

M. COLE Antony	Sciences nucléaires
----------------	---------------------

Fait à SAINT MARTIN D'HERES, AVRIL 1976.

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE

Président : M. Philippe TRAYNARD
Vice-Président : M. Pierre-Jean LAURENT

PROFESSEURS TITULAIRES

MM. BENOIT Jean	Radioélectricité
BESSON Jean	Electrochimie
BLOCH Daniel	Physique du solide
BONNETAIN Lucien	Chimie Minérale
BONNIER Etienne	Electrochimie et Electrometallurgie
BOUDOURIS Georges	Radioélectricité
BRISSONNEAU Pierre	Physique du solide
BUYLE-BODIN Maurice	Electronique
COUMES André	Radioélectricité
DURAND Francis	Métallurgie
FELICI Noël	Electrostatique
FOULARD Claude	Automatique
LESPINARD Georges	Mécanique
MOREAU René	Mécanique
PARIAUD Jean-Charles	Chimie-Physique
PAUTHENET René	Physique du solide
PERRET René	Servomécanismes
POLOUJADOFF Michel	Electrotechnique
SILBER Robert	Mécanique des Fluides

PROFESSEUR ASSOCIE

M. ROUXEL Roland Automatique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. BLIMAN Samuel	Electronique
BOUVARD Maurice	Génie Mécanique
COHEN Joseph	Electrotechnique
LACOUME Jean-Louis	Géophysique
LANCIA Roland	Electronique
ROBERT François	Analyse numérique
VEILLON Gérard	Informatique Fondamentale et appliquée
ZADWORNY François	Electronique

MAITRES DE CONFERENCES

MM. ANCEAU François	Mathématiques Appliquées
CHARTIER Germain	Electronique
GUYOT Pierre	Chimie Minérale
IVANES Marcel	Electrotechnique
JOUBERT Jean-Claude	Physique du solide
MORET Roger	Electrotechnique Nucléaire
PIERRARD Jean-Marie	Mécanique
SABONNADIÈRE Jean-Claude	Informatique Fondamentale et appliquée
Mme SAUCIER Gabrièle	Informatique Fondamentale et appliquée

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M. LANDAU Ioan Automatique

CHERCHEURS DU C.N.R.S. (Directeur et Maîtres de Recherche)

MM. FRUCHART Robert

Directeur de Recherche

ANSARA Ibrahim

Maître de Recherche

CARRE René

Maître de Recherche

DRIOLE Jean

Maître de Recherche

MATHIEU Jean-Claude

Maître de Recherche

MUNIER Jacques

Maître de Recherche

Pleurodeles waltlii MICHAH.



A Michèle et Christophe

AVANT - PROPOS

Avant d'exposer les résultats de mon travail, j'ai le plaisir d'exprimer, à Monsieur le Professeur P. CHIBON, ma profonde gratitude pour les conseils et les encouragements de tous ordres qu'il m'a prodigués sans cesse en dirigeant mes recherches. Sa disponibilité permanente à mon égard et sa très grande amabilité ont facilité mon travail de façon déterminante. Auprès de lui, et grâce à la confiance qu'il m'a accordée, j'ai beaucoup appris des divers aspects du métier de chercheur. Je le prie de trouver en ce mémoire le témoignage de ma reconnaissance et de mon attachement.

Je remercie très vivement Monsieur le Professeur P. SENDEL de me faire bénéficier de sa compétence en acceptant de présider le Jury chargé d'examiner mon travail. Je lui suis particulièrement reconnaissant de m'avoir accueilli dans son Laboratoire et de m'avoir, en de nombreuses circonstances, aidé et encouragé. Pour cela, et pour les enseignements qu'il m'a donnés tout au long de ma formation d'embryologiste, je le prie, ainsi que Madame M. KIENY-SENDEL, d'accepter ma respectueuse gratitude.

I am extremely grateful to Professor M. BALLS, from the University of Nottingham, for his agreement to be a member of my Jury and to make a report on my work. It is an honour for me to benefit of his acknowledged competence in the field of cell proliferation in Amphibian tissues.

Je suis très reconnaissant à Monsieur le Professeur J. C. BISCONTE d'avoir accepté de juger de mon travail. Ses recherches, ainsi que les discussions très stimulantes que nous avons eues en diverses occasions, m'ont beaucoup encouragé à développer les aspects technologiques et méthodologiques de mes travaux.

Je remercie très vivement le Docteur C. ROSENFELD de l'honneur qu'il me fait en acceptant de distraire de son temps pour participer au Jury chargé d'examiner mon travail.

Je suis tout particulièrement reconnaissant à Monsieur le

Professeur J. P. BERTRANDIAS de s'être intéressé à mon travail et d'avoir accepté de le juger. Son aide et ses conseils m'ont été très précieux et ont enrichi mon travail d'aspects mathématiques essentiels.

Je tiens également à remercier vivement Monsieur le Professeur J. PELMONT dont le dynamisme et la foi en la Recherche stimulent tous ceux qui l'entourent. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude pour le temps qu'il m'a consacré et pour toutes les idées et les encouragements dont il m'a fait bénéficier. J'exprime également mes remerciements aux personnes de son Laboratoire qui m'ont aidé avec sympathie et efficacité.

Je remercie très vivement Monsieur le Professeur GASTINEL de s'être intéressé à mon travail et de m'avoir permis de concrétiser mes projets en me donnant accès aux multiples possibilités du Département de Mathématiques Appliquées et du Centre Inter-Universitaire de Calcul. Je remercie très sincèrement les personnes de son Laboratoire, et notamment Messieurs CHASSERY, BOUTTAZ, DROUET, EBERHART et SERPAGGI, qui m'ont aidé de façon déterminante.

Que mes collègues et amis du Laboratoire de Zoologie et Biologie Animale qui m'ont encouragé et aidé avec sympathie, trouvent ici l'expression de mes remerciements cordiaux et amicaux.

SOMMAIRE

	<u>Pages</u>
<u>PREAMBULE</u>	1
<u>INTRODUCTION ET REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	4
<u>INTRODUCTION</u>	5
- Prolifération cellulaire et développement embryonnaire	5
- Contrôle et régulation de l'activité mitotique	7
Mécanismes moléculaires de la division cellulaire	8
Inhibition par contact	10
Substances stimulatrices ou inhibitrices de la prolifération cellulaire	11
- But des recherches entreprises chez l'embryon de pleurodèle	13
- Bibliographie	16
<u>CHAPITRE - I -</u>	21
La cinétique de la prolifération cellulaire embryonnaire. Aspects méthodologiques	
- Indice de marquage : "Signification des variations périodiques de l'indice de marquage en fonction du temps dans les tissus embryonnaires"	22
Matériel et méthodes	22
Résultats	22
Conclusion	25
- Coefficient de prolifération : "Méthode mathématique d'évaluation du coefficient de prolifération dans les populations cellulaires embryonnaires en croissance exponentielle"	26
Modèle mathématique	26
Résultats	29
- Effets de la durée de disponibilité de la thymidine tritiée sur les paramètres de la prolifération cellulaire : "Durée de disponibilité de la thymidine exogène chez la larve et le jeune du triton	

	<u>Pages</u>
<u>Pleurodeles waltlii Michah."</u>	30
Résumé	30
Summary	30
Introduction	30
Matériel et méthodes	31
Résultats	33
Interprétation et discussion	37
Bibliographie	40
<u>CHAPITRE - II -</u>	<u>42</u>
Evolution de la cinétique de prolifération cellulaire au cours de l'organogenèse	
- "Relations entre la prolifération et la différen- tiation cellulaires : étude autoradiographique chez les embryons et les jeunes larves de <u>Pleurodeles</u> <u>waltlii Michah.</u> (Amphibien, Urodèle)"	43
Introduction	43
Matériel et méthodes	44
Résultats	45
Discussion et conclusion	58
Bibliographie	63
<u>CHAPITRE - III -</u>	<u>64</u>
Effets de la température sur la cinétique de proliféra- tion cellulaire de l'embryon	
- "Etude autoradiographique de l'influence de la tempé- rature sur la prolifération cellulaire chez les embryons âgés de <u>Pleurodeles waltlii Michah.</u> (Amphi- bien, Urodèle)"	65
Summary	65
Résumé	65
Introduction	65
Matériel et méthodes	66
Résultats	67
Discussion et conclusion	80
Bibliographie	83
<u>CHAPITRE - IV -</u>	<u>86</u>
Mise en évidence de facteurs antimitotiques (chalones) dans les tissus différenciés	
- Effets des extraits bruts d'intestin et de foie de	

triton adulte sur l'activité mitotique dans les tissus correspondants de l'embryon : " Effects of adult intestine and liver extracts on the mitotic activity of corresponding embryonic tissues of <u>Pleurodeles waltlii</u> Michah. (Amphibia, Urodela)"	87
- Début de purification des extraits intestinaux de triton adulte. Mise en évidence de deux facteurs antimitotiques : "Existence of two-chalone like substances in intestinal extract from the adult newt, inhibiting embryonic intestinal cell proliferation."	93
Abstract	93
Introduction	93
Materials and methods	94
Results	96
Discussion	106
References	108
- Spécificité zoologique des chalones intestinales	110
Matériel et méthodes	110
Résultats et interprétation	111
Conclusion	115
Bibliographie	116
 <u>CHAPITRE - V -</u>	 117
Régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaires	
- Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires dans l'intestin embryonnaire et larvaire : "Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires dans l'intestin embryonnaire et larvaire de <u>Pleurodeles waltlii</u> Michah. I - Développement normal"	118
Résumé	119
Summary	120
Introduction	121
Matériel et méthodes	123
Résultats	127
Discussion	140
Bibliographie	145
"Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires dans l'intestin embryonnaire et larvaire de <u>Pleurodeles waltlii</u> Michah. II -	

	<u>Pages</u>
Effets des chalones intestinales extraites de l'intestin de pleurodèle adulte"	150
Résumé	151
Summary	152
Introduction	153
Matériel et méthodes	156
Résultats	159
Interprétation et discussion	171
Bibliographie	179
- Les chalones intestinales : conclusion et hypothèse : "Presence of intestinal chalones"	181
Intestinal cell proliferation and differentiation in pleurodeles embryos	182
Presence of mitotic inhibitors in intestinal extract from the adult newt	183
Biochemical properties of the intestinal mitotic inhibitors	184
Effects of repeated injections of intestinal mitotic inhibitors on embryonic cell proliferation	185
Conclusions	187
Literature cited	188
<u>CHAPITRE - VI -</u>	<u>191</u>
Conception et réalisation d'un système automatique d'analyse microphotométrique des populations cellulaires	
- Aspect technologique : "Le S.A.M.B. : un nouveau système d'acquisition de l'image donnée par un microscope pour l'analyse morphométrique et densitométrique"	192
Résumé	193
Summary	194
Introduction	195
Schéma de principe	196
Module de balayage	198
Module de commande	201
Performances et applications	206
Bibliographie	207
- Application à l'analyse des populations cellulaires : "Un nouveau système d'analyse densitométrique et morphologique des préparations microscopiques. Applica-	

	<u>Pages</u>
tion à la reconnaissance et au comptage automatiques des cellules dans les différentes phases du cycle mitotique"	209
Résumé	210
Summary	211
Introduction	212
Matériel et méthodes	215
Résultats	228
Discussion	240
Bibliographie	244
<u>CONCLUSIONS GENERALES ET RESUME</u>	248
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	249
- Système d'analyse microphotométrique à balayage	249
- Relations entre la prolifération cellulaire et la différenciation	250
- Effets de la température sur la prolifération cel- lulaire	252
- Régulation de la prolifération cellulaire	254
- Conclusion et hypothèse	259
<u>RESUME</u>	261

PREAMBULE

Ce travail, consacré à l'étude de la prolifération cellulaire embryonnaire et à la mise au point des instruments de recherche correspondants, m'a été confié par Monsieur le Professeur P. CHIBON et a été réalisé au sein de l'équipe "Biologie du Développement" qu'il dirige dans le Laboratoire de Zoologie et Biologie Animale (Directeur, Professeur P. SENDEL) de l'Université Scientifique et Médicale de Grenoble.

Ce mémoire est un recueil des articles originaux suivants, publiés ou en cours de publication :

- 1970 - Signification des variations périodiques de l'indice de marquage en fonction du temps dans les tissus embryonnaires C. R. Acad. Sci., Paris, 270:998-1001 (en collaboration avec P. CHIBON).
- 1970 - Méthode mathématique d'évaluation du coefficient de prolifération dans les populations cellulaires embryonnaires en croissance exponentielle. C. R. Acad. Sci., Paris, 270:1603-1606 (en collaboration avec J.P. BERTRANDIAS).
- 1971 - Etude autoradiographique de l'influence de la température sur la prolifération cellulaire chez les embryons âgés de Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibien, Urodèle). Wilhelm Roux'Archiv, 168:205-225.
- 1971 - Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires : étude autoradiographique chez les embryons et les jeunes larves de Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibien, Urodèle). Develop. Biol., 24:301-321.
- 1973 - Durée de disponibilité de la thymidine exogène chez la larve et le jeune du triton Pleurodeles waltlii Michah. Ann. Embryol. Morph., 6:81-92 (en collaboration avec P. CHIBON).
- 1973 - Effects of adult intestine and liver extracts on the mitotic activity of corresponding embryonic tissues of Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibia, Urodela). Cell Tissue Kinet., 6:519-524.

- 1975 - Existence of two chalone-like substances in intestinal extract from the adult newt, inhibiting embryonic intestinal cell proliferation. Cell Tissue Kinet., 8:171-187 (en collaboration avec J. PELMONT).
- 1976 - Presence of intestinal chalones. In : Stem cells of Renewing Cell Populations. A.C. CAIRNIE; P.K. LALA et D.G. OSMOND eds. Academic Press, New York et Londres, p: 41-50.
- 1976 - Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires dans l'intestin embryonnaire et larvaire de Pleurodeles waltlii Michah.. I : Développement normal. Wilhelm Roux Archiv (soumis pour publication).
- 1976 - Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires dans l'intestin embryonnaire et larvaire de Pleurodeles waltlii Michah.. II : Effets des chalones intestinales extraites de l'intestin de pleurodèle adulte. Wilhelm Roux'Archiv (soumis pour publication)
- 1976 - Le S.A.M.B.: un nouveau système d'acquisition de l'image donnée par un microscope pour l'analyse morphométrique et densitométrique. Automatisme (sous presse)(en collaboration avec R. BOUTTAZ et J. M. CHASSERY).
- 1976 - Un nouveau système d'analyse densitométrique et morphologique des préparations microscopiques. Application à la reconnaissance et au comptage automatiques des cellules dans les différentes phases du cycle mitotique. Histochem. (soumis pour publication)(en collaboration avec J.M. CHASSERY).

Les articles suivants qui ont un caractère de revue ou qui concernent des sujets scientifiques distincts du sujet principal, ainsi que ceux qui ont été développés dans des publications ultérieures déjà citées, n'ont pas été insérés dans ce mémoire :

- 1969 - Etude autoradiographique de l'action de la température et de la thyroxine sur la durée des cycles mitotiques dans l'embryon âgé et la jeune larve de Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibien, Urodèle). C. R. Acad. Sci., Paris, 269: 70-73 (en collaboration avec P. CHIBON).

- 1974 - Présence, dans l'intestin du triton adulte Pleurodeles waltlii Michah., de deux facteurs antimitotiques naturels (chalones) actifs sur la prolifération cellulaire de l'intestin embryonnaire. C. R. Acad. Sci., Paris, 278:2831-2834 (en collaboration avec J. PELMONT).
- 1975 - Effets de la température sur la prolifération cellulaire et l'organogenèse chez les embryons et les larves d'Amphibiens. Bull. Soc. Zool. Fr.(suppl. 1):31-48.
- 1975 - Effets du LSD-25 sur le cycle cellulaire d'embryons de Pleurodeles waltlii Michah. traités en fin de gastrulation C. R. Acad. Sci., Paris, 281:1987-1990 (en collaboration avec M. BELANGER et P. CHIBON)
- 1975 - Présence, dans l'intestin du triton adulte Pleurodeles waltlii Michah., de deux facteurs antimitotiques naturels actifs sur la prolifération cellulaire de l'intestin embryonnaire. Bull. Soc. Zool. Fr., 101:129-134.
- 1976 - Introduction à la microphotométrie. Reichert O. W. ed. (sous presse).

Ces travaux ont bénéficié de l'aide financière du C.N.R.S. (ATP N° 1799 "Pharmacodynamie et chimiothérapie de la division cellulaire" ; ATP N° 1751 "Traitement, transmission et stockage des images") et de l'I.N.S.E.R.M. (AT N° 36 "Cinétique cellulaire normale et pathologique).

INTRODUCTION

ET

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

L'embryologie, à ses débuts, consistait en une simple description des formes. La croissance différentielle des ébauches et des organes suffisait à expliquer les transformations du germe et le développement d'un être vivant apparaissait alors comme un phénomène continu et progressif. Au niveau cellulaire, au contraire, l'embryogenèse apparaît comme la succession périodique de générations de cellules comportant une alternance entre la duplication de l'ADN et la mitose. La notion de cycle cellulaire, introduite en 1953 par HOWARD et PELC, a ouvert de nouvelles perspectives aux recherches embryologiques. En effet, le cycle cellulaire, ou cycle mitotique, est apparu dès lors comme l'occasion (sinon le mécanisme) offerte à chaque cellule embryonnaire de disparaître en donnant naissance à deux cellules-filles éventuellement différentes de la cellule-mère, ou différentes l'une de l'autre, par l'expression sélective de certains de leurs gènes. Bien que rarement formulée, l'hypothèse est ainsi née que les cycles mitotiques, qui fournissent les cellules nécessaires à l'édification d'un être vivant, pourraient constituer à la fois l'horloge du développement et le mécanisme de diversification des lignées cellulaires. Nos recherches s'inscrivent dans le cadre des travaux entrepris par de nombreux auteurs pour comprendre les relations entre l'activité mitotique, la spécialisation et la différenciation des cellules. Ces travaux font l'objet de la brève revue bibliographique suivante.

I PROLIFÉRATION CELLULAIRE ET DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

Les travaux les plus nombreux, consacrés aux modifications de la prolifération cellulaire au cours du développement, ont concerné les stades précoces de l'embryogenèse. Les recherches de GRAHAM (1966) et GRAHAM et MORGAN (1966) chez le xénope, de SIGNORET et LEFRESNE (1974) chez l'axolotl et de LABROUSSE (1971) chez le pleurodèle révèlent que les cycles mitotiques de segmentation ne comportent pas de phase G_1 mais qu'une phase G_2 , de durée variable selon les espèces, sépare la mitose de la fin de la phase de synthèse de l'ADN. Des résultats comparables ont été obtenus par GAMOW et PRESCOTT (1970) chez la souris. La phase G_1 n'apparaît dans le cycle cellulaire des blastomères qu'à la

fin de la segmentation. Au cours de la gastrulation et de la neurulation, la durée des phases G_1 , S et G_2 du cycle cellulaire s'allonge de façon remarquable (GRAHAM et MORGAN, 1966 ; DESNIZKY, 1974) alors que la durée de la mitose varie beaucoup moins. C'est aussi pendant la gastrulation que des différences régionales d'activité mitotique se manifestent dans les feuilletts embryonnaires. Le neurectoderme présente notamment une synchronisation partielle de la prolifération de ses cellules et une vague d'activité mitotique accompagne l'invagination du mésoderme (OZATO, 1969 ; DESNIZKY, 1974). Les particularités de l'activité mitotique des blastomères ont été mises en relation avec leur activité génétique par les travaux expérimentaux de FLICKINGER (1971) qui révèlent que la qualité et la quantité des ARN synthétisés aux stades précoces du développement dépendent du nombre et de la vitesse des divisions cellulaires. En particulier, une diminution de la vitesse de division, corrélative à un allongement de la phase G_2 , se traduirait par une diminution du nombre d'ARN différents synthétisés et par une augmentation du nombre des copies de ces ARN. Un tel mécanisme pourrait expliquer, selon l'auteur, les restrictions de la compétence des feuilletts embryonnaires au cours du développement et les modifications de cette compétence par les sels $LiCl$ et $NaHCO_3$ qui perturbent aussi le déroulement des cycles cellulaires.

Les travaux consacrés à l'étude de la prolifération cellulaire aux divers stades de l'organogenèse ont consisté, principalement, à définir les relations entre l'activité mitotique et le déroulement de la différenciation, afin de vérifier le postulat selon lequel toute cellule qui se différencie cesse de se diviser. A cet égard, des situations différentes ont été observées selon les tissus : dans le cas de la myogenèse (STOCKDALE et HOLTZER, 1961 ; OKAZAKI et HOLTZER, 1966) l'activité mitotique des myoblastes cesse avant le début de la synthèse de myoglobine ; inversement, les érythroblastes se divisent encore après le début de la synthèse de l'hémoglobine (GRASSO et WOODWARD, 1967). La contradiction apparente entre ces résultats a fait progresser l'idée selon laquelle la différenciation des cellules est un phénomène graduel. En effet, l'apparition des protéines structurales et fonctionnelles caractérisant la différenciation d'une cellule est la manifestation de l'acquisition plus précoce d'un équipement

enzymatique particulier dépendant lui-même de l'activation préalable de certains gènes. Le rôle éventuel des cycles cellulaires successifs dans l'établissement de cette séquence de différenciation a été souligné par HOLTZER et col. (1972). Cet auteur a émis l'hypothèse que le démasquage des gènes, qui représente une modification du programme génétique reçu par une cellule à sa naissance, ne peut s'effectuer qu'au cours du processus de synthèse d'ADN, c'est-à-dire pendant la phase S du cycle cellulaire. Les gènes impliqués dans l'expression phénotypique de l'état différencié seraient ainsi démasqués par étapes successives au cours de cycles cellulaires particuliers, ou "quantal cell cycles", qu'il conviendrait de distinguer des cycles mitotiques n'ayant pour fonction que la multiplication du nombre des cellules ("proliferative cell cycles").

Les travaux consacrés à l'étude de la prolifération cellulaire au cours du développement s'accordent à reconnaître aux cycles mitotiques un rôle déterminant dans la diversification des lignées cellulaires aux stades précoces de l'embryogenèse et dans le déroulement de la différenciation aux stades plus tardifs de l'organogenèse. Cependant, la question se pose de savoir quels sont les mécanismes qui assurent la régulation et le contrôle de l'activité mitotique ?

II CONTRÔLE ET RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ MITOTIQUE

La fécondation déclenche l'activité mitotique de l'oeuf ; dès cet instant, le nombre des cellules constituant l'embryon croît de façon tout d'abord exponentielle puis la prolifération cellulaire décline à mesure que les lignées cellulaires se diversifient et se différencient pour constituer les ébauches puis les organes de l'adulte. Cependant, même chez les animaux dont la croissance est limitée, certaines cellules conservent pendant toute la vie une activité mitotique pour assurer le renouvellement et la réparation éventuelle des tissus. Ces manifestations de l'homéostasie tissulaire ont été décrites dans le foie (HARKNESS, 1952), le rein (THRELFALL et col., 1967) et divers autres organes de Mammifères adultes (ABERCROMBIE, 1957 ; BULLOUGH, 1962) ainsi que dans les tissus embryonnaires (WEISS et MATOLTSY, 1959 ; SENDEL et THEVENET, 1966). Les observations de ces auteurs

conduisent à penser que l'activité mitotique d'une cellule est contrôlée au moins par les cellules voisines, sinon par l'ensemble des cellules du tissu auquel elle appartient, et éventuellement par les tissus voisins.

Les travaux relatifs aux mécanismes régulateurs de l'activité mitotique concernent, soit les événements moléculaires qui conduisent à la mitose, soit les interactions cellulaires qui, par l'intermédiaire des contacts membranaires ou des médiateurs chimiques humoraux, conduisent à une altération de l'activité mitotique des cellules.

1) Mécanismes moléculaires de la division cellulaire

La mitose marque le terme d'une succession périodique et obligatoire d'évènements moléculaires constituant le cycle cellulaire. Parmi ceux-ci, la synthèse des enzymes nécessaires à la duplication de l'ADN, la synthèse de l'ADN et sa combinaison avec les protéines nucléaires, la condensation de la chromatine en chromosomes et la synthèse des protéines mitotiques du fuseau achromatique, sont des activités moléculaires qui ont retenu l'attention de nombreux chercheurs. L'information nécessaire à la réalisation de ces activités siège dans les gènes ; néanmoins, l'existence de "gènes mitotiques" s'exprimant périodiquement, au cours du cycle cellulaire, par des mécanismes de répression et d'activation (JACOB et MONOD, 1961 et BRITTEN et DAVIDSON, 1969 ; 1971), reste encore très controversée. Cependant, MALT (1969) a démontré que la synthèse d'ARN est le premier évènement moléculaire décelable qui précède l'activité mitotique compensatrice du rein après néphrectomie unilatérale : cette synthèse pourrait traduire l'activation de gènes mitotiques. Depuis ces expériences, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des synthèses d'ARN (actinomycine D) et de protéines (Puromycine, cycloheximide) (EPIFANOVA et col., 1971 a ; 1971 b ; FARBER et col., 1972) ainsi que la description et l'étude de mutants mitotiques (CULOTTI et HARTWELL, 1971 ; KONYUKOV et SAZHINA, 1971 ; GALLIEN, 1974), ne laissent aucun doute sur la dépendance directe du cycle cellulaire vis-à-vis d'une séquence de gènes particuliers, ou "mitoton" (MAZIA, 1961).

Dans le cas particulier de l'activité mitotique des embryons en segmentation, le concept de "mitoton" ne semble pas en accord avec les résultats de BRACHET et col. (1963) selon lesquels les premières divisions de l'oeuf fécondé ne sont pas accompagnées de synthèses d'ARN. Cependant, les travaux du même auteur ont montré que l'oeuf contient l'information nécessaire à ces divisions sous forme d'ARN messagers synthétisés au cours de l'ovogenèse et réprimés jusqu'à la fécondation. La synthèse de nouveaux ARN messagers commence peu avant la gastrulation (BRACHET, 1967) ce qui explique que l'actinomycine D, qui ne perturbe pas le déroulement des cycles mitotiques de segmentation, inhibe sévèrement la gastrulation et le développement ultérieur (BRACHET et col., 1964 ; FLICKINGER et col., 1970).

La division des blastomères de l'embryon en segmentation peut être considérée comme une activité contrôlée uniquement au niveau moléculaire par le programme fixé dans les ARN messagers de l'ovocyte et dont chaque cellule hérite au moins partiellement pendant les premiers cycles mitotiques. En effet, il ne semble pas exister, pendant cette période initiale du développement, de contrôle d'ensemble de l'activité mitotique des blastomères : les petites variations individuelles de la durée des phases de leurs cycles mitotiques provoquent une désynchronisation progressive de leur prolifération qui devient asynchrone au stade de la gastrulation. L'absence d'interactions cellulaires au cours de la segmentation se manifeste d'ailleurs par l'organisation de la morula d'Amphibien, par exemple, dont les cellules constituent un ensemble sphérique obéissant à des lois physiques simples et passives (agrégats de bulles de savon).

Les interactions entre cellules se manifestent dès la gastrulation par les mouvements morphogénétiques et les premiers phénomènes d'induction. C'est également durant cette période que se manifestent les premières différences régionales de l'activité mitotique au sein des feuilletts embryonnaires (MALEYVAR et LOWERY, 1973). L'apparition, au début de la gastrulation, de la phase G_1 considérée comme la période du cycle mitotique pendant laquelle la cellule est sensible aux conditions de son environnement (VONDERHAAR et TOPPER, 1974), est certainement à mettre en rapport avec l'instauration des relations

intercellulaires et l'apparition des propriétés antigéniques spécifiques dans les lignées cellulaires. Ainsi, dès le stade de la gastrulation, la régulation de la prolifération cellulaire s'intègre dans le cadre des mécanismes encore mal connus qui harmonisent la morphogenèse, la différenciation et le nombre des cellules d'un embryon ; elle relève donc probablement des relations intercellulaires qui s'établissent par contact ou par l'intermédiaire de substances stimulatrices ou inhibitrices de l'activité mitotique.

2) Inhibition par contact

En 1954, ABERCROMBIE et HEAYSMAN ont observé que les mouvements des fibroblastes cultivés in vitro cessent immédiatement lorsque ces cellules entrent en contact. Ce même phénomène a été constaté dans le cas des cellules épithéliales cutanées (LASH, 1955) et des cellules musculaires (ABERCROMBIE et HEAYSMAN, 1957). L'inhibition des mouvements cellulaires dans les cultures confluentes s'accompagne d'une inhibition de l'activité mitotique (ABERCROMBIE et AMBROSE, 1962), c'est pourquoi de nombreux auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle l'inhibition par contact pourrait représenter un mécanisme physiologique de régulation de la prolifération cellulaire (STOKER et RUBIN, 1967 ; DU PRAW, 1969). Cette hypothèse est en accord avec le fait que les cellules tumorales, qui semblent échapper aux mécanismes de régulation de l'activité mitotique, ne manifestent pas (ou à un faible degré) de phénomène d'inhibition par contact (ABERCROMBIE et AMBROSE, 1962 ; STOKER, 1969). FURCHT et SCOTT (1974) ont observé que la structure de la membrane diffère entre les cellules susceptibles d'inhibition par contact et celles qui sont réfractaires à cette inhibition ; ils ont supposé, de ce fait, que la division cellulaire pourrait être sous la dépendance des enzymes de la membrane. Les travaux concernant l'inhibition par contact s'accordent à attribuer à ce mécanisme un rôle essentiel dans la régulation de l'activité mitotique in vitro ; cependant aucun résultat expérimental ne permet d'envisager l'existence d'un mécanisme comparable in vivo ; un tel processus paraît a priori incompatible avec le fait que l'intense activité mitotique qui accompagne le développement embryonnaire ou la régéné-

ration concerne des cellules établissant entre elles des contacts par la totalité de leur membrane.

3) Substances stimulatrices ou inhibitrices de la prolifération cellulaire

Depuis 20 ans, les résultats expérimentaux concernant la régulation de l'activité mitotique par des médiateurs chimiques sont discutés par référence à la théorie de WEISS et KAVANAU (1957). Ces auteurs postulent que chaque cellule synthétise une substance stimulatrice ("template") et une substance inhibitrice ("antitemplate") de l'activité mitotique. Ces facteurs seraient doués de spécificité tissulaire. La substance stimulatrice resterait intracellulaire alors que la substance inhibitrice diffuserait à l'extérieur de la cellule où elle serait rapidement détruite. L'inhibition de l'activité mitotique apparaîtrait comme le résultat de l'inactivation de la substance stimulatrice par la substance inhibitrice ; ainsi, la substance stimulatrice pourrait être interprétée comme l'inducteur spécifique des gènes mitotiques et la substance inhibitrice comme une hormone tissulaire. Selon WEISS et KAVANAU, le taux de substance stimulatrice serait suffisant, au début du développement, pour provoquer le déroulement des divisions de segmentation. Au cours de l'embryogenèse ultérieure, le taux de substance inhibitrice augmenterait en provoquant une réduction progressive de l'activité mitotique des cellules jusqu'à ce qu'un équilibre finisse par s'établir dans les tissus de l'adulte. Cet équilibre serait rompu chaque fois que la concentration en substance inhibitrice serait abaissée par des pertes cellulaires permettant ainsi une activité mitotique réparatrice qui disparaîtrait avec la restauration de l'équilibre. Depuis que cette théorie a été émise, de nombreux travaux expérimentaux ont été entrepris pour rechercher d'éventuelles substances stimulatrices ou inhibitrices de la prolifération cellulaire.

Les extraits embryonnaires et les sérums sont connus pour stimuler l'activité mitotique des cellules cultivées in vitro (PAUL, 1970). Certains facteurs actifs ont été isolés (MATSUHASHI et SEZAKI, 1975) mais leur éventuelle spécificité tissulaire

est encore mal établie. Si des substances stimulatrices de la prolifération cellulaire existent (autres que certaines hormones et de certains antigènes), elles semblent impliquées dans les relations entre tissus et particulièrement entre mésenchyme et épithélium. De nombreux travaux ont montré en effet que l'activité mitotique d'un épithélium cultivé in vitro n'est maintenue qu'en présence de mésenchyme (voir revue dans BULLOUGH, 1975). L'influence du mésenchyme s'exercerait par l'intermédiaire d'un facteur ("mesenchymal factor") de nature probablement glycoprotéique ayant pour effet de favoriser la synthèse de l'ADN et la mitose dans les cellules épithéliales (LEVINE et col., 1973).

Les substances inhibitrices de l'activité mitotique ont fait l'objet d'un grand nombre de travaux depuis que BULLOUGH et LAURENCE (1964) ont rapporté que les extraits aqueux d'épiderme inhibent l'activité mitotique de l'épiderme en cours de cicatrisation. Dès 1962, BULLOUGH avait proposé le nom de "chalone" pour désigner les substances responsables de l'inhibition de l'activité mitotique dans un tissu ; il réutilisait ainsi un mot proposé sans succès par SCHAFER au 17ème Congrès International de Médecine (Londres 1913) pour désigner toute substance hormonale ayant une action dépressive ou inhibitrice sur son effecteur. A la suite du premier Symposium international sur les Chalones (Brook Lodge, USA, 1972. Actes publiés dans Natl. Cancer Inst. Monogr. 38, 1973), le terme de chalone est réservé à toute substance qui :

- inhibe spécifiquement la prolifération cellulaire du tissu dans lequel elle est produite ;
- ne présente pas de spécificité zoologique (parmi les Vertébrés) ;
- bloque ou ralentit le déroulement de la phase G_1 , ou de la phase G_2 , du cycle cellulaire.

Des substances répondant à cette définition ont été décrites dans tous les tissus à l'exception du tissu nerveux et du tissu musculaire strié (voir revue par LOZZIO et col., 1975 ; HOUCK, 1976) ; néanmoins, aucune chalone n'a été complètement purifiée à ce jour en raison principalement de la complexité et de la durée particulièrement longue des tests biologiques encore nécessaires à leur caractérisation. Malgré le manque d'information concernant la nature biochimique et le mode d'action des chalones, les

travaux consacrés aux chalcones épidermiques conduisent à penser que ces substances constituent le signal physiologique normal induisant les cellules génératrices à cesser de se diviser et à se différencier. La question se pose donc de savoir si la synthèse éventuelle de tels inhibiteurs au cours du développement embryonnaire pourrait constituer l'un des mécanismes responsables du sévère ralentissement de l'activité mitotique accompagnant la différenciation dans les lignées cellulaires ? Cette hypothèse mérite d'être testée expérimentalement puisque, dans une courte note, BISCHOFF (1964) rapporte que les extraits de duodénum d'embryons de poulet âgés de 19 jours d'incubation inhibent in vitro et in vivo la prolifération cellulaire de l'épithélium intestinal d'embryons âgés de 14 jours. De la même façon, les extraits de muqueuse gastrique de poulet nouveau-né inhibent in vitro l'activité mitotique de l'épithélium gastrique embryonnaire (PHILPOTT, 1971).

III BUT DES RECHERCHES ENTREPRISES CHEZ L'EMBRYON DE PLEURODÈLE

Dans le domaine de l'embryologie expérimentale, la prolifération des cellules a été longtemps considérée comme une activité simplement destinée à fournir les cellules constituant le matériau que des facteurs inducteurs et morphogènes transforment et organisent en un ensemble harmonieux et fonctionnel. Les travaux rapportés brièvement dans cette revue ont infirmé cette conception et conduisent à penser que les cycles mitotiques jouent un rôle probablement essentiel dans le déterminisme de l'embryogenèse. Nos recherches, concernant la prolifération cellulaire et sa régulation chez l'embryon âgé et la jeune larve du triton Pleurodeles waltlii Michah., ont été entreprises afin de tester cette hypothèse et de contribuer plus particulièrement à la compréhension des problèmes suivants :

- Quels sont les valeurs des paramètres de la prolifération cellulaire chez l'embryon et comment évoluent-elles au cours de l'organogenèse ?

- Quels sont les effets de la température sur l'activité mitotique embryonnaire ?

- Quelles sont les relations entre la prolifération cellulaire et la différenciation ?

- Quels sont les mécanismes assurant la régulation de l'activité mitotique ?

- Quelles sont les conséquences de modifications expérimentales de l'activité mitotique sur le déroulement de la différenciation ?

L'embryon de l'Amphibien Urodèle Pleurodeles waltlii Michah. présente, pour une telle étude, des avantages remarquables par la facilité de son élevage, le nombre élevé d'embryons fournis par chaque ponte et se développant de façon synchrone, et la facilité d'intervention sur le germe qui n'est protégé que par une gangue muqueuse aisée à enlever. Les étapes du développement du pleurodèle, décrites avec précision (GALLIEN et DUROCHER, 1957), sont définies à partir de critères morphologiques faciles à observer. Enfin, comme tous les Urodèles, le pleurodèle est constitué de cellules de grandes dimensions et présentant de fortes affinités tinctoriales ; elles se prêtent ainsi favorablement à toutes les méthodes de l'histologie et aux comptages.

Les méthodes d'étude de la prolifération cellulaire sont fondées principalement sur le comptage de très nombreuses cellules afin d'établir pour chaque population considérée : l'indice mitotique, l'indice de marquage et la courbe de variation du pourcentage de mitoses marquées après un traitement bref des cellules par un précurseur de l'ADN (thymidine tritiée). La mise en oeuvre de ces méthodes, qui nécessite la confection de nombreuses préparations histologiques et histo-autoradiographiques, est à la fois longue et fastidieuse. La nécessité d'automatiser, au moins partiellement, les comptages de cellules et le désir de les rendre très objectifs ont conduit certains auteurs à associer au microscope divers systèmes d'analyse et de comptage (MAYALL et MENDELSON, 1970 ; BISCONTE, 1973). L'introduction des méthodes microphotométriques de dosage de l'ADN des noyaux cellulaires (CASPERSSON, 1936 ; POLLISTER et RIS, 1947) ainsi que les progrès réalisés dans l'analyse mathématique des formes (MATHERON, 1969) ont ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine de l'automatisation des comptages de cellules. Etant donné que les cellules en phase G_1 , S et G_2 du cycle mitotique se distinguent par leur contenu en ADN et que les cellules en phase M se caractérisent par la condensation de la chromatine

en chromosomes, nous avons envisagé la réalisation d'un système automatique d'analyse microphotométrique et morphologique permettant de reconnaître et de compter les cellules d'une population dans les différentes phases du cycle mitotique. Des travaux méthodologiques et technologiques ont donc été entrepris dans ce domaine, parallèlement à l'étude fondamentale de la prolifération cellulaire embryonnaire et de sa régulation.

BIBLIOGRAPHIE

- ABERCROMBIE, M. - Localized formation of new tissue in an adult Mammal. Symp. Soc. exp. Biol., 11:235-254 (1957).
- ABERCROMBIE, M. et AMBROSE, E. J. - Surface properties of cancer cells. Cancer Res., 22:525-548 (1962).
- ABERCROMBIE, M. et HEAYSMAN, E. M. - Social behavior of cells in tissue culture. II - Monolayering of fibroblasts. Exp. Cell Res., 6:293-306 (1954).
- ABERCROMBIE, M. et HEAYSMAN, E. M. - Social behavior of cells in tissue culture. III - Mutual influence of sarcoma cells and fibroblasts. Exp. Cell Res., 13:276-291 (1957).
- BISCHOFF, R. - Inhibition of mitosis by homologous tissue extracts. J. Cell Biol., 23:10A (1964).
- BISCONTE, J.-C. - Histogenèse du système nerveux central chez le rat. Etudes chronoarchitectoniques par radioautographie quantitative Thèse, Montpellier (1973).
- BRACHET, J. - Biochemical changes during fertilization and early embryonic development. In : Cell Differentiation. A CIBA Foundation Symposium. (1967).
- BRACHET, J.; DENIS, H. et VITRY, F. - The effects of Actinomycin D and Puromycin on morphogenesis in Amphibian eggs and Acetabularia mediterranea. Develop. Biol., 9:398-434 (1964).
- BRACHET, J.; FICQ, A. et TENCER, R. - Amino acid incorporation into proteins of nucleate and anucleate fragments of sea urchin eggs Effect of parthenogenetic activation. Exp. Cell Res., 32:168-176 (1963).
- BRITTEN, R.J. et DAVIDSON, E.H. - Gene regulation of higher cells : a theory. Science, 165:349-357 (1969).
- BRITTEN, R.J. et DAVIDSON, E.H. - Repetitive and non-repetitive DNA sequences and a speculation on the origins of evolutionary novelty. The Quarterly Rev. Biol., 46:111-138 (1971).
- BULLOUGH, W.S. - The control of mitotic activity in adult Mammalian tissues. Biol. Rev., 37:307-342 (1962).
- BULLOUGH, W.S. - Mitotic control in adult Mammalian tissues. Biol. Rev., 50:99-127 (1975).

- BULLOUGH, W.S. et LAURENCE, E.B. - The production of epidermal cells. Symp. Zool. Soc. Londres, 12:1-23. (1964).
- CASPERSSON, T. - Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkernes. Scand. Arch. Physiol., 73 (suppl. 8):1-151 (1936).
- CULOTTI, J. et HARTWELL, L.H. - Genetic control of the cell division cycle in yeast. III - Seven genes controlling nuclear division. Exp. Cell Res., 67:389-401 (1971).
- DESNIZKY, A.G. - Cell cycle in the early development of axolotl. C. R. Acad. Nauk. URSS, 3:287-289 (1974).
- DU PRAW, E.J. - The physiology of cell division. In : Cell and Molecular Biology. 591-662, Academic Press, New York et Londres (1969).
- EPIFANOVA, O.I.; SMOLENSKAYA, I.N.; SEVASTIANOVA, M.V.; KURDYUMOVA, A.C. et MAKAROVA, G.F. - Patterns of RNA and protein synthesis in the mitotic cycle of cell culture as studied using specific inhibitors : the S period and entry into mitosis. "Cytologia"; 13:1323-1331 (1971 a).
- EPIFANOVA, O.I.; SMOLENSKAYA, I.N.; SEVASTIANOVA, M.V.; KURDYUMOVA, A.C. et MAKAROVA, G.F. - Patterns of RNA and protein synthesis in the mitotic cycle of cell culture as studied using specific inhibitors : progression of cells through mitosis and entry into the S period of the next cycle. "Cytologia"; 13:1332-1339 (1971 b).
- FARBER, J.; STEIN, G. et BASERGA, R.- The regulation of RNA synthesis during mitosis. Biochem. Biophys. Res. Comm., 47:790-797 (1972)
- FLICKINGER, R.A. - Cell division and transcription in developing frog embryos. In : Developmental Aspects of the Cell Cycle. (CAMERON, I.L.; PADILLA, G.M. et ZIMMERMAN, A.M. eds). 161-190 (1971).
- FLICKINGER, R.A.; LAUTH, M.R. et STAMBROOK, P.J. - An inverse relation between the rate of cell division and ARN synthesis per cell in developing frog embryos. J. Embryol. exp. Morphol., 23:571-582 (1970).
- FURCHT, L.T. et SCOTT, R.E. - Influence of cell cycle and cell movement on the distribution of intramembranous particles in contact inhibited and transformed cells. Exp. Cell Res., 88: 311-318 (1974).

- GALLIEN, L. - Syndrome de létalité et expression au cours de l'ontogénèse de la mutation létal mitotique (lm) chez l'Urodèle Pleurodeles waltlii Michah.. C.R. Acad. Sci., Paris, 279:1709-1712 (1974).
- GALLIEN, L. et DUROCHER, M. - Table chronologique du développement de Pleurodeles waltlii. Bull. Biol. Fr. et Belg., 91:97-114 (1957).
- GAMOW, I.E. et PRESCOTT, D.M. - The cell life cycle during early embryogenesis of the mouse. Exp. Cell Res., 59:117-123 (1970).
- GRAHAM, C.F. - The regulation of DNA synthesis and mitosis in multinucleate frog eggs. J. Cell Biol., 1:363-374 (1966).
- GRAHAM, C.F. et MORGAN, R.W. - Changes in the cell cycle during early Amphibian development. Develop. Biol., 14:439-460 (1966).
- GRASSO, J.A. et WOODWARD, J.W. - DNA synthesis and mitosis in erythropoietic cells. J. Cell Biol., 33:645-649 (1967).
- HARKNESS, R.D. - Changes in the liver of the rat after partial hepatectomy. J. Physiol., 117:267-277 (1952).
- HOLTZER, H.; WEINTRAUB, H.; MAYNE, R. et MOCHAN, B. - The cell cycle cell lineages, and cell differentiation. In : Current Topics in Developmental Biology, 7:229-255 Academic Press, New York et Londres (1972).
- HOUCK, J. - Chalmers. North-Holland Publishing, Amsterdam et American Elsevier Publishing, New York, 510 p (1976).
- HOWARD, A. et PELC, S.R. - Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. Heredity (suppl. 6):261-273 (1953).
- JACOB, F. et MONOD, J. - Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol., 3:318-356 (1961).
- KONYUKHOV, B.V. et SAZHINA, M.V. - Genetic control over the duration of G₁ phase. Experientia, 27:970-971 (1971).
- LABROUSSE, J-P. - Synthèse de l'acide désoxyribonucléique chromosomique dans l'oeuf fécondé de Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibien, Urodèle) étudiée après injection de thymidine tritiée. C. R. Acad. Sci., Paris, 272:1518-1521 (1971).

LASH, J.W. - Studies of wound closure in Urodeles. J. exp. Zool., 128:13-28 (1955).

LEVINE, S.; PICTET, R. et RUTTER, W.S. - Control of cell proliferation and cytodifferentiation by a factor reacting with the cell surface. Nature New Biol., 246:49-52 (1973).

LOZZIO, B.B.; LOZZIO, C.B.; BAMBERGER, E.G. et LAIR, S.V. - Regulators of cell division : endogenous mitotic inhibitors of Mammalian cells. Intern. Rev. Cytol., 42:1-47 (1975).

MALEYVAR, R.P. et LOWERY, R. - The patterns of mitosis and DNA synthesis in the presumptive neurectoderm of Xenopus laevis Daudin In : The Cell Cycle in Development and Differentiation. (BALLS M. et BILLET, F.S. eds), Cambridge University Press, 249-255 (1973).

MALT, R.A. - Compensatory growth of the kidney. New England J. Med., 280:1446-1459 (1969).

MATHERON, G. - Théorie des ensembles aléatoires. Cahiers Centre Morphologie Mathématique, Ecole des Mines, Paris, 4 (1969).

MATSUHASHI, S. et SEZAKI, M. - Isolation of two fractions from chick embryo extract which promote epidermal growth. Proc. Japan Acad 51:279-284 (1975).

MAYALL, B.H. et MENDELSON, M.L. - Deoxyribonucleic acid cytophotometry of stained human leucocytes. II - The mechanical scanner of CYDAC, the theory of scanning cytophotometry and the magnitude of the residual errors. J. Histochem. Cytochem., 18:383-407 (1970).

MAZIA, D. - Mitosis and the physiology of cell division. In : The Cell, (BRACHET, J. et MIRSKEY, A.E. eds). Academic Press, New York et Londres (1961).

OKAZAKI, K. et HOLTZER, H. - Myogenesis : fusion, myosin synthesis and the cell cycle. Proc. Nat. Acad. Sci., 56:1484-1490 (1966).

OZATO, K. - Cell cycle in the primary induction of chick embryos. Embryologia, 10:312-317 (1969).

PAUL, J. - Cell and tissue culture. E and S Livingstone, Edimbourg et Londres (1970).

PHILPOTT, G.W. - Tissue-specific inhibition of cell proliferation in embryonic stomach epithelium in vitro. Gastroenterol., 61:25-34 (1971).

- POLLISTER, A.W. et RIS, H. - Nucleoprotein determination in cytological preparations. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 12: 147-157 (1947).
- SENGEL, P. et THEVENET, A. - Sur les modalités de la cicatrisation de l'ectoderme dorsal en la présence et en l'absence du tube neural chez l'embryon de poulet. C. R. Acad. Sci., Paris, 263: 278-280 (1966).
- SIGNORET, J. et LEFRESNE, J. - Détermination par incorporation de thymidine tritiée des phases du cycle cellulaire chez le germe d'axolotl en période synchrone de segmentation. C. R. Acad. Sci Paris, 279:1189-1191 (1974).
- STOCKDALE, F.F. et HOLTZER, H. - DNA synthesis and myogenesis. Exp. Cell Res., 24:508-520 (1961).
- STOKER, M.G.P. - Regulation systems in cell culture. In : A CIBA Foundation Symp., 264-275 (1969).
- STOKER, M.G.P. et RUBIN, H. - Density dependent inhibition of cell growth in culture. Nature, 215:171-172 (1967).
- THRELFALL, G.; TAYER, D.M. et BUCK, A. - Studies of changes in growth and DNA synthesis in rat kidney during experimentally induced hypertrophy. Amer. J. Path., 50:1-14 (1967).
- VONDERHAAR, B.K. et TOPPER, Y.J. - A role of the cell cycle in hormone -dependent differentiation. J. Cell Biol., 63:707-712 (1974).
- WEISS, P. et KAVANAU, J.L. - A model of growth and growth control in mathematical terms. J. gen. Physiol., 41:1-47 (1957).
- WEISS, P. et MATOLTSY, A.G. - Wound healing in chick embryos in vivo and in vitro. Develop. Biol., 1:302-326 (1959).
-

CHAPITRE - I -

LA CINÉTIQUE DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE EMBRYONNAIRE : ASPECTS MÉTHODOLOGIQUES

- INDICE DE MARQUAGE

" Signification des variations périodiques de l'indice de marquage en fonction du temps dans les tissus embryonnaires "

- COEFFICIENT DE PROLIFÉRATION ET MODÈLE MATHÉMATIQUE

" Méthode mathématique d'évaluation du coefficient de prolifération dans les populations cellulaires embryonnaires en croissance exponentielle "

- EFFETS DE LA DURÉE DE DISPONIBILITÉ DE LA THYMINES TRITIÉE SUR LES PARAMÈTRES DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

" Durée de disponibilité de la thymidine exogène chez la larve et le jeune du triton Pleurodeles waltlii Michah. "

EMBRYOLOGIE EXPÉRIMENTALE. — *Signification des variations périodiques de l'indice de marquage en fonction du temps dans les tissus embryonnaires.*
 Note (*) de MM. Gérard Brugal et Pierre Chibon, présentée par M. Louis Gallien.

Les courbes de variation de l'indice de marquage en fonction du temps écoulé après une injection de thymidine tritiée à des embryons de *Pleurodèle* sont périodiques, et diffèrent notablement des courbes homologues obtenues dans les populations cellulaires stables. Elles sont caractéristiques des populations cellulaires en croissance de type exponentiel.

De nombreux auteurs ont établi et interprété les courbes de variation de l'indice de marquage en fonction du temps dans les populations cellulaires stables ⁽¹⁾. Dans les populations cellulaires croissantes, les courbes homologues n'ont été établies, à notre connaissance, que dans quelques tissus cancéreux ⁽²⁾. Bien qu'elles diffèrent notablement des précédentes leur signification n'a pas été précisée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — La méthode autoradiographique, déjà appliquée aux embryons de *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien Urodèle) [⁽³⁾, ⁽⁴⁾], nous a permis d'établir, dans trois tissus, les courbes de variation de l'indice de marquage en fonction du temps écoulé après une injection de thymidine tritiée à des embryons au stade 34 de Gallien et Durocher ⁽⁵⁾ élevés à 12, 17, 23 ou 26 °C.

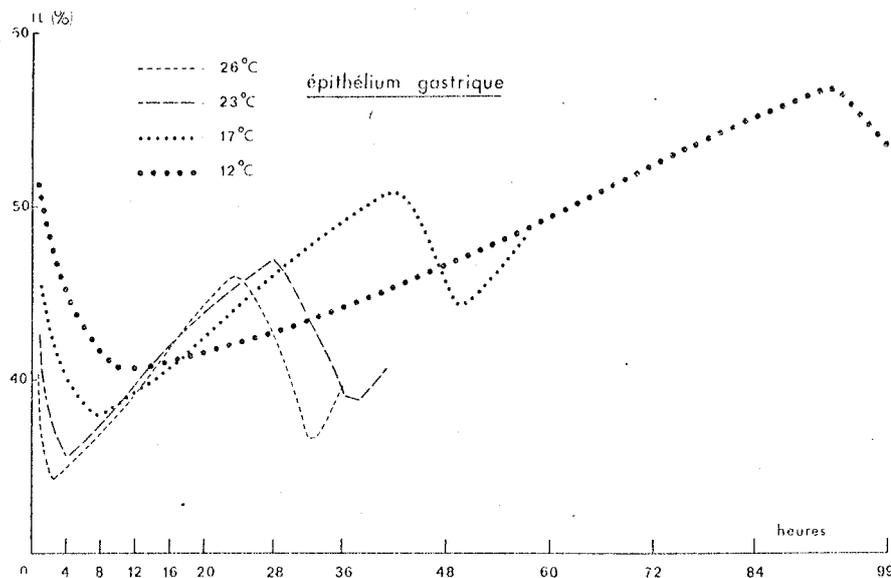


Fig. 1. — Variations de l'indice de marquage dans l'épithélium gastrique au stade 34, à différentes températures

RÉSULTATS. — La figure 1 montre les courbes obtenues à différentes températures pour l'épithélium gastrique. Des courbes de même type ont été obtenues pour le mésenchyme de la base du bourgeon de membre antérieur et le télencéphale. Elles diffèrent par leur niveau moyen et l'amplitude de leurs variations, mais pré-

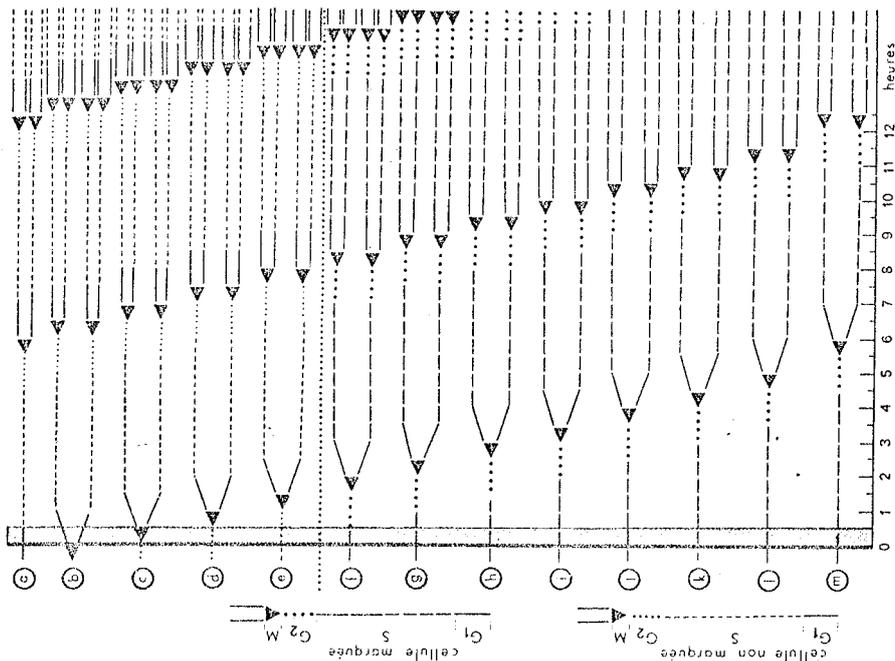


Fig. 2 a. — Représentation graphique de la prolifération asynchrone d'une population cellulaire en croissance exponentielle. L'intervalle de temps figuré en pointillés représente la période de disponibilité de la thymidine tritiée (dT 3H).

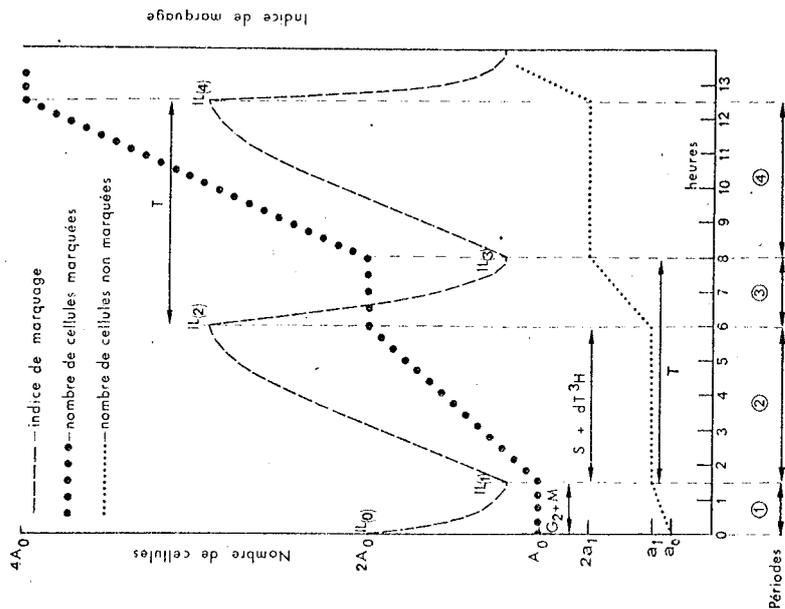


Fig. 2 b. — Variations de l'indice de marquage et du nombre de cellules marquées et non marquées dans la population de la figure 2 a (Voir légende dans le texte).

sentent toutes une succession de minimums et de maximums. Nous avons pensé que la forme de ces courbes est à mettre en relation avec le mode de croissance éventuellement exponentiel des populations cellulaires embryonnaires. Nous avons vérifié cette hypothèse à l'aide d'un modèle graphique théorique.

Interprétation théorique. — Le modèle graphique que nous avons construit comprend deux figures complémentaires (fig. 2 a et 2 b).

La figure 2 a représente la prolifération asynchrone de cellules ordonnées selon leur position dans le cycle mitotique ; au moment $t = 0$ elles sont mises en présence de thymidine tritiée durant une brève période. L'accroissement du nombre des cellules dans une telle population suit une progression géométrique définie par une fonction exponentielle.

La figure 2 b traduit l'accroissement du nombre de cellules marquées et de cellules non marquées ainsi que les variations consécutives de l'indice de marquage dans la population cellulaire de la figure 2 a.

Le modèle théorique montre que l'indice de marquage varie de façon périodique au cours du temps dans une population cellulaire en croissance exponentielle. En effet, pendant une première période dont la durée est égale à la somme des durées des phases G_2 et M , seules les cellules non marquées qui sont en phase G_2 (cellules d et e) ou M (cellule c) au moment $t = 0$ se multiplient : le nombre des cellules non marquées croît de a_0 à a_1 ($a_0 < a_1 < 2 a_0$, car les cellules a et b qui sont en phase G_1 ne se multiplient pas au cours de cette période). Par conséquent, l'indice de marquage décroît de $IL_0 = A_0/(a_0 + A_0)$ à $IL_1 = A_0/(a_1 + A_0)$. Au cours d'une seconde période dont la durée est égale à celle de la phase S augmentée de la durée de disponibilité de la thymidine tritiée, seules les cellules marquées (cellules f à m) se divisent ; leur nombre passe de A_0 à $2 A_0$. De ce fait, l'indice de marquage augmente de IL_1 à $IL_2 = 2 A_0/(a_1 + 2 A_0)$. Durant la période suivante, toutes les cellules non marquées se divisent : leur nombre croissant de a_1 à $2 a_1$, l'indice de marquage diminue à nouveau jusqu'à la valeur $IL_3 = 2 A_0/(2 a_1 + 2 A_0) = IL_1$. Au cours des périodes suivantes, les cellules marquées et non marquées se divisant alternativement, l'indice de marquage oscille entre les valeurs $A_0/(a_1 + A_0)$ et $2 A_0/(a_1 + 2 A_0)$. Le temps séparant deux minimums ou deux maximums successifs est donc égal au temps de génération (T).

Comparaison entre les courbes expérimentales et la courbe théorique. — Dans les populations cellulaires réelles, il est certain que la durée du cycle mitotique et de ses phases présente une variabilité au cours des divisions successives ; par conséquent, l'ordre que nous avons considéré comme maintenu dans le modèle graphique subit, en réalité, une perturbation qui s'accroît avec le temps. De ce fait, l'amplitude des variations de l'indice de marquage s'amortit progressivement sans que la périodicité soit altérée. En dépit de cet amortissement progressif, les courbes expérimentales sont tout à fait comparables, par leur forme, à la courbe théorique. Elles doivent donc permettre de calculer graphiquement la durée du cycle cellulaire et de ses phases conformément à la figure 2 b. Nous avons effectué ce calcul à chaque température dans les trois tissus étudiés ; les résultats obtenus sont portés dans

TABLEAU
*Comparaison des durées du cycle mitotique et de ses phases calculées
d'après les courbes des mitoses marquées (MM) et d'après les courbes de l'indice de marquage (IL)
dans trois tissus à différentes températures*

Tissus	Température en °C	Durées en heures							
		G ₂ + M		S		T		G ₁	
		MM	IL	MM	IL	MM	IL	MM	IL
Mésenchyme de la base du bour- geon de membre	12	12	10-14	79	72-80	91	—	0	—
	17	8	8-10	31	27-31	40	35-40	1	0-5
	23	4	4-6	16	15-18	24	22-26	4	0-7
	26	2	2	14	12-16	22	23-26	6	5-12
Télocéphale	12	12	12-14	81	76-84	93	—	0	—
	17	6	5-7	38	35-40	48	47-50	4	0-9
	23	3	3-5	24	19-24	32	32-34	5	3-12
	26	1,5	1-3	21	18-22	30	30-32	7,5	5-13
Epithélium gastrique	12	9,5	10-14	82,5	79-82	92	—	0	—
	17	7	7-11	34	32-36	42	41-43	1	0-4
	23	4	3-5	24	23-25	32	32-35	4	2-9
	26	2,5	2-3	20	20-22	29	29-31	6,5	4-9

le tableau. Ils sont en bon accord avec ceux que nous avons déduits des courbes de variation du pourcentage de mitoses marquées (4) et confirment ainsi l'analogie entre les courbes expérimentales et la courbe théorique.

CONCLUSION. — La périodicité des variations de l'indice de marquage au cours du temps dans les populations cellulaires embryonnaires permet le calcul graphique du temps de génération (T), de la durée des phases S, G₂ + M et G₁. La forme générale des courbes obtenues caractérise les populations cellulaires en croissance de type exponentiel.

(*) Séance du 2 février 1970.

(1) D. E. WIMBER, in : Cell Proliferation, L. F. Lamerton et R. J. M. Fry, Blackwell Sc. Pub., Oxford, 1963, p. 1-17.

(2) B. CLARKSON, K. OTA, T. OHKITA et A. O'CONNOR, *Cancer*, 18, 1965, p. 1189-1213.

(3) P. CHIBON, *Comptes rendus*, 267, Série D, 1968, p. 203-205.

(4) P. CHIBON et G. BRUGAL, *Comptes rendus*, 269, Série D, 1969, p. 70-73.

(5) L. GALLIEN et M. DUROCHER, *Bull. Biol. Fr. et Belg.*, 91, 1957, p. 97-114.

(Laboratoire de Zoologie, Faculté des Sciences de Grenoble,
Domaine Universitaire, 38-Saint-Martin-d'Hères, Isère.)

EMBRYOLOGIE EXPÉRIMENTALE. — *Méthode mathématique d'évaluation du coefficient de prolifération dans les populations cellulaires embryonnaires en croissance exponentielle.* Note (*) de MM. Gérard Brugal et Jean-Paul Bertrandias, présentée par M. Louis Gallien.

Dans les populations cellulaires en croissance exponentielle, le coefficient de prolifération peut être évalué à l'aide d'une relation simple si l'on connaît, outre l'indice de marquage ou l'indice mitotique, le temps de génération et la durée des phases S, G₂ ou M. Chez les embryons de Pleurodèle au stade 34, la valeur de ce coefficient est indépendante de la température mais particulière à chaque tissu.

La connaissance du coefficient de prolifération (proportion de cellules en activité mitotique) et de ses variations au cours du développement dans les populations cellulaires embryonnaires, permet de comprendre certains mécanismes de l'embryogénèse. Les diverses méthodes de calcul du coefficient de prolifération qui ont été utilisées, à notre connaissance (1), sont difficilement applicables, *in vivo*, à des embryons de petite taille dont les cellules se divisent rapidement. Nous avons donc été conduits à établir un modèle mathématique permettant le calcul de ce coefficient dans les populations cellulaires de ce type.

MODÈLE MATHÉMATIQUE. — Le modèle mathématique est établi pour une population cellulaire dans laquelle :

— La probabilité pour qu'une cellule née au temps $t = t_0$ soit encore présente au temps $t = t_0 + u$ est un nombre $R(u)$ ne dépendant que de la variable positive u ;

— Toute cellule qui disparaît donne naissance à deux cellules, ce qui implique l'absence de mortalité ou de migration cellulaires.

Si l'on représente par $v(t) \Delta t$ le nombre de cellules qui apparaissent entre t et $t + \Delta t$ et par $m(t) \Delta t$ le nombre de cellules qui disparaissent entre t et $t + \Delta t$, le nombre de cellules qui disparaissent dans l'intervalle de temps $t, t + \delta$ est représenté par la relation :

$$\int_t^{t+\delta} m(u) du = \frac{1}{2} \int_t^{t+\delta} v(u) du = \int_0^t v(t-z) [R(z) - R(z+\delta)] dz + \int_t^\infty \frac{a(z-t)}{R(z-t)} [R(z) - R(z+\delta)] dz + o(\delta)$$

a étant la densité de répartition des âges des cellules à l'instant $t = 0$.

En faisant tendre δ vers zéro, on en déduit, si v est continue et dans des conditions assez générales sur les fonctions a et R :

$$(1) \quad \frac{1}{2} v(t) = - \int_0^t v(t-u) dR(u) - \int_t^\infty \frac{a(u-t)}{R(u-t)} dR(u).$$

Cette équation intégrale permet, connaissant a et R , de calculer $v(t)$ puis le nombre total $N(t)$ de cellules à l'instant t

$$N(t) = N(0) + \int_0^t [v(u) - m(u)] du = N(0) + \frac{1}{2} \int_0^t v(u) du.$$

Si l'on suppose que, parmi les cellules arrivant à l'âge T (temps de génération), il y en a une proportion p qui vont se diviser à nouveau, les autres restant au repos mitotique, on peut écrire :

$$R(u) = \begin{cases} 1 & \text{si } 0 \leq u < T \\ 1 - p & \text{si } t \geq T \end{cases} \quad \text{d'où} \quad \begin{cases} \frac{1}{2} v(t) = p a(T - t) & \text{si } 0 \leq t < T \\ \frac{1}{2} v(t) = p v(t - T) & \text{si } t \geq T. \end{cases}$$

Par suite :

$$(2) \quad \begin{cases} v(t) = v(\tau) [2p]^n & \text{si } t = \tau + nT \text{ avec } 0 \leq \tau < T \\ \left. \begin{aligned} v(t) &= v(0) [2p]^{t/T} & \text{si } a(T - t) &= v(0) [2p]^{(t/T)-1} \\ N(t) &= N(0) [2p]^{t/T} & \text{si } N(0) &= \frac{1}{2} v(0) \frac{T}{\text{Log } 2p} \end{aligned} \right\}$$

Ce dernier cas correspond à la *croissance exponentielle stationnaire*.

Si l'on se place dans ces conditions, le nombre $A(t)$ des cellules actives est :

$$A(t) = \int_{t-T}^t pv(u) du = pv(0) \frac{T}{\text{Log } 2p} \left(1 - \frac{1}{2p}\right) [2p]^{t/T} \quad \text{dès que } t > T.$$

On remarque alors que la proportion P de cellules en activité mitotique est *constante* et donnée par la relation :

$$P = \frac{A(t)}{N(t)} = 2p - 1.$$

Dans une population en croissance exponentielle selon la loi (2) on peut exprimer les coefficients p et P en fonction de l'indice de marquage (IL) ou de l'indice mitotique (IM), du temps de génération (T) et de la durée des phases G_2 ou M . En effet, si l'on admet que les durées G_1 , S , G_2 et M des phases du cycle mitotique sont constantes pour les cellules actives, le nombre des cellules en phase S ou M au temps $t > T$ est donné par les relations :

$$N_M(t) = p \int_{t-T}^{t-T+M} v(u) du = pv(0) \frac{T}{\text{Log } 2p} [(2p)^{(t-T+M)/T} - (2p)^{(t-T)/T}];$$

$$N_S(t) = p \int_{t-G_1-S}^{t-G_1} v(u) du = pv(0) \frac{T}{\text{Log } 2p} [(2p)^{(t-G_1)/T} - (2p)^{(t-G_1-S)/T}].$$

On en déduit des évaluations de l'indice de marquage et de l'indice mitotique qui sont :

$$\text{IM} = N_M(t)/N(t) = 2p[(2p)^{-1+M/T} - (2p)^{-1}] = (2p)^{M/T} - 1$$

$$(3) \quad \text{IM} \simeq \frac{M}{T} \text{Log } 2p \quad \text{si } M \text{ est petit devant } T$$

$$\text{IL} = N_S(t)/N(t) = 2p[(2p)^{-G_1/T} - (2p)^{-(G_1-S)/T}] = (2p)^{(M+G_2)/T} [(2p)^{S/T} - 1]$$

$$(4) \quad \text{IL} \simeq \frac{S}{T} \text{Log } 2p \left[1 + \text{Log } 2p \frac{M + G_2 + S/2}{T} \right].$$

TABEAU

Valeurs des coefficients p et P déduites de l'indice de marquage (IL) et de l'indice mitotique (IM) dans trois tissus embryonnaires de Pleurodèle, au stade 34

Tissus Températures en °C	Mésenchyme de la base du membre antérieur					Epithélium gastrique					Télocéphale						
	12	17	23	26	12	17	23	26	12	17	23	26	12	17	23	26	
IL	70,4	61	54,1	48,7	62,5	57,1	53,7	45,1	32,7	27,7	25,3	23,2					
S/T	86,8	27,5	66,7	63,6	89,7	81	75	69	87,1	79,2	75	70					
$\frac{M + G_2 + S/2}{T}$	0,566	0,588	0,500	0,449	0,552	0,571	0,500	0,431	0,565	0,521	0,469	0,400					
Log (P + I) ...	0,604	0,586	0,619	0,613	0,537	0,539	0,560	0,541	0,317	0,302	0,295	0,296					
Moyennes de :																	
Log (P + I) ...	0,606					0,544					0,303						
P + I	1,83					1,72					1,35						
P %	91,5					86					67,5						
P %	83					72					35						
Déduit de IL																	
IM	39,7	62,4	54,2	28,8	38,2	61,1	46,6	25,3	27,9	25,2	19,6	10,3					
M/I	65,9	100	83,3	45,5	65,2	107,1	78,1	51,7	86	83,5	62,5	33,3					
$\frac{M + G_2 + S/2}{T}$	0,602	0,624	0,651	0,633	0,586	0,570	0,497	0,489	0,324	0,303	0,314	0,309					
Log (P + I) ...																	
Moyennes de :																	
Log (P + I) ...	0,628					0,561					0,313						
P + I	1,88					1,75					1,37						
P %	94					87,5					68,5						
P %	88					75					37						
Déduit de IM																	

Si l'on connaît l'indice de marquage ou l'indice mitotique, le temps de génération et la durée des phases S et G₂ ou M, les relations (3) et (4) permettent de calculer facilement p et P ; en particulier :

$$P = 2p - 1 = \exp \left[\frac{IM}{M/T} \right] - 1.$$

MATÉRIEL ET MÉTHODE. — La technique autoradiographique, déjà appliquée aux embryons de *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien, Urodèle) [(²), (³)] nous a permis d'évaluer l'indice de marquage et l'indice mitotique une heure après une injection de thymidine tritiée à des embryons au stade 34 de Gallien et Durocher (⁴), élevés à différentes températures. Nous avons considéré comme marqués les noyaux surmontés de plus de 3 grains d'argent métallique. Les indices ont été déterminés dans le mésenchyme de la base du bourgeon de membre antérieur, l'épithélium gastrique et le télencéphale pour lesquels nous connaissons la durée du cycle mitotique et de ses phases (³); en outre, ces tissus semblent représenter des populations cellulaires auxquelles on peut appliquer, en première approximation, le modèle mathématique ci-dessus (⁵).

RÉSULTATS. — Les résultats expérimentaux obtenus ainsi que les valeurs p et P calculées d'après les relations (3) et (4) sont portés dans le tableau. Celui-ci montre que dans les tissus embryonnaires étudiés la valeur de $\text{Log}(P + 1)$, et par conséquent du coefficient de prolifération P , est indépendante de la température, aux erreurs d'expérience près, mais particulière à chaque tissu.

Les valeurs du coefficient de prolifération déduites de l'indice de marquage et de l'indice mitotique sont en bon accord; les premières sont inférieures aux secondes de 3 à 6 % environ. Ceci est principalement dû à ce que la valeur de l'indice de marquage qui, dans une première période décroît très rapidement avec le temps (⁵), est inférieure, dès 1 h après l'injection, à la proportion réelle de cellules en phase S.

Le tableau montre qu'au stade 34, la plupart (83 à 88 %) des cellules du mésenchyme de la base du bourgeon de membre se divisent; par contre 1/4 environ des cellules de l'épithélium gastrique sont en repos mitotique. Dans le télencéphale, 35 à 37 % seulement des cellules sont engagées activement dans un cycle mitotique au stade considéré.

(*) Séance du 9 mars 1970.

(1) M. L. MENDELSON, in : Cell Proliferation, L. F. Lamerton et R. J. M. Fry, Blackwell Sc. Pub. Oxford, 1963, p. 190-210.

(2) P. CHIBON, *Comptes rendus*, 267, Série D, 1968, p. 203-205.

(3) P. CHIBON et G. BRUGAL, *Comptes rendus*, 269, Série D, 1969, p. 70-73.

(4) L. GALLIEN et M. DUROCHER, *Bull. Biol. Fr. et Belg.*, 91, 1957, p. 97-114.

(5) G. BRUGAL et P. CHIBON, *Comptes rendus*, 270, Série D, 1970, p. 998-1001.

(Laboratoire de Zoologie et Département de Mathématiques,
Faculté des Sciences de Grenoble, Domaine Universitaire,
38-Saint-Martin-d'Hères, Isère.)

DURÉE DE DISPONIBILITÉ DE LA THYMINDE EXOGENE CHEZ LA LARVE ET LE JEUNE DU TRITON PLEURODELES WALTII MICHAH.

P. CHIBON et G. BRUGAL*.

*Laboratoire de Zoologie, Université scientifique et médicale de Grenoble,
B.P. 53, 38041 Grenoble Cedex France.*

RÉSUMÉ - La durée de disponibilité de la thymidine tritiée, injectée par voie intrapéritonéale à de jeunes pleurodèles métamorphosés et à des larves au stade 36, a été étudiée par histo-autoradiographie et scintillation en phase liquide. Chez les animaux métamorphosés, la thymidine exogène est disponible pendant 4 heures environ; en outre, un marquage différé de l'ADN, probablement à partir des catabolites tritiés initiaux de la thymidine injectée, s'observe 7 heures après l'administration du précurseur. Chez les larves, la durée de disponibilité du précurseur est de 60 minutes, pendant lesquelles 23 % environ de la thymidine est incorporé dans l'ADN des cellules alors engagées dans la phase S d'un cycle mitotique.

Le fait que la durée de disponibilité de la thymidine exogène est environ 4 fois plus longue chez les animaux adultes que chez les larves, bien qu'ils aient reçu une dose de précurseur 20 fois moins élevée, est à mettre en relation non seulement avec des différences de la vitesse du catabolisme et de l'élimination urinaire de la thymidine entre ces deux stades, mais aussi avec de grandes différences du coefficient de prolifération des tissus en fonction de l'âge et de leur état de différenciation. En effet, selon les organes, 30 à 56 % des cellules sont engagées dans un cycle mitotique chez les jeunes larves alors que, chez les animaux métamorphosés, 5,5 % seulement d'entre elles se divisent dans l'épithélium intestinal qui est certainement le tissu proliférant le plus rapidement.

SUMMARY - Histoautoradiographic and liquid scintillation counting studies of tritiated thymidine availability time, were made in young metamorphosed pleurodeles and in larvae stage 36 injected intraperitoneally. In young metamorphosed animals, the exogenous thymidine is available for about 4 hours; even more, 7 hours after thymidine injection, we observed a delayed labeling of DNA likely due to initial tritiated thymidine catabolites. In larvae, tritiated thymidine is available for 60 minutes and about 23 % of it is incorporated during the cell S phase.

In metamorphosed animals, compared to larvae, tritiated thymidine availability time is 4 times as long although the injected dose is 20 times less. This phenomenon is related to differences in the rate of thymidine catabolism and urinary excretion between these two stages, and to a wide range of differences in cellular proliferation indexes within tissues or organs according to their age and to their differentiated state. Indeed in young larvae 30 to 56 % of cells are involved in a mitotic cycle, while in metamorphosed animals 5.5 % only are dividing in the intestinal epithelium which is the most rapidly proliferating tissue.

INTRODUCTION

La thymidine exogène est utilisée par les cellules pour la synthèse de leur ADN (15, 24, 30) au cours de la phase S de chaque cycle mitotique; c'est pourquoi la thymi-

* Ce mémoire constitue une partie de la Thèse qui sera présentée par l'auteur devant l'Université scientifique et médicale de Grenoble en vue de l'obtention du grade de Docteur ès Sciences.

dine tritiée à haute activité spécifique est communément utilisée pour l'étude histo-autoradiographique de la prolifération cellulaire. En effet, le calcul de la durée du cycle mitotique et de ses phases est réalisé graphiquement à partir des courbes de variation du nombre de mitoses marquées (29) ou de cellules marquées (5) en fonction du temps écoulé après une seule injection de ce précurseur; or, le nombre des cellules qui incorporent la thymidine tritiée augmente

avec la durée de disponibilité de celle-ci dans l'organisme. Pour obtenir des mesures précises de la durée du cycle cellulaire et de ses phases, il est nécessaire que la population des cellules marquées soit petite : pour cela la durée de disponibilité du précurseur doit être courte par rapport à la durée du cycle cellulaire. Pour obtenir la précision optimale, il est en outre nécessaire de tenir compte de cette durée dans le calcul des paramètres de la prolifération cellulaire et, plus particulièrement, de la soustraire à celle de la phase S pour l'ajouter à celle de la phase G1.

C'est pourquoi, dans le cadre d'une étude autoradiographique de la prolifération cellulaire au cours du développement, entreprise chez l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles wallii* Michah. (2, 3, 4, 7, 8), nous avons été conduits à préciser la durée de disponibilité de la thymidine tritiée chez des larves et chez de jeunes animaux métamorphosés. Contrairement à de nombreux auteurs (9, 13, 33) qui, chez les Mammifères, concluent à la brièveté de la période biologique de la thymidine à partir d'observations autoradiographiques indirectes, nous avons évalué ce paramètre en mesurant directement les variations de la radioactivité sanguine, de la radioactivité spécifique et de la radioactivité totale de l'ADN extrait, et en comparant ces variations à celles de l'intensité du marquage autoradiographique des noyaux cellulaires de divers tissus à la suite d'une seule injection de thymidine tritiée. Nous avons pu, en outre, calculer quelle fraction de la thymidine injectée a effectivement été incorporée dans l'ADN des cellules en cours de prolifération.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A - CHEZ DE JEUNES PLEURODÈLES MÉTAMORPHOSÉS (longueur : 7,5 à 9,5 cm, poids : 6 à 9 g) ayant subi, entre 10 et 11 heures, une injection intrapéritonéale de thymidine tritiée, marquée sur le groupement méthyle (activité totale 100 $\mu\text{Ci/ml}$, activité spécifique 5 Ci/mM), à raison de 0,5 $\mu\text{Ci/g}$ de poids frais, trois types d'expériences ont été réalisés.

Dans un premier type d'expérience, nous avons étudié la variation de la radioactivité du sang en fonction du temps écoulé après l'injection, en sacrifiant les animaux à divers intervalles de temps entre 0 et 48 heures. Un

échantillon de 0,01 ml de sang a été prélevé sur chaque animal par ponction dans le bulbe aortique puis versé dans un tube de comptage par scintillation en phase liquide contenant 14 ml de mélange scintillant (4 g de PPO et 0,1 g de diméthyl-POPOP dans 1 l de toluène) et 1 ml d'éthanol absolu. Les caillots sanguins ont été dissociés par vibration dans un bac Ultrasonic NSU 144 et les particules solides ont été maintenues en suspension dans un gel thyxotrope CAB-O-SIL Packard. Les comptages ont été réalisés par fractions de 10 mn pendant 1 heure 30 pour chaque échantillon dans un compteur par scintillation TRI-CARB Packard. Les résultats obtenus, après correction du bruit de fond et du quenching, sont exprimés par le nombre de désintégrations par minute (dpm) pour 0,01 ml de sang. Quatre séries expérimentales de ce type ont été réalisées.

Dans un second type d'expérience, nous avons étudié la variation de la radioactivité totale d'un tissu à renouvellement cellulaire rapide, l'intestin : pour cela, une portion de l'organe a été prélevée chez des animaux sacrifiés par groupes de deux à des intervalles de temps échelonnés entre 0 et 48 heures après l'injection de thymidine tritiée. Les portions d'intestin ont été lavées dans deux bains successifs de la solution opératoire de Holtfreter à 0 °C puis fixés par immersion dans l'azote liquide. L'ADN de chaque échantillon a été extrait dans une solution tampon (chlorure de sodium à 0,15 M et citrate de sodium à 0,015 M) après déprotéinisation par le chloroforme et ultracentrifugation, dosé par spectrophotométrie UV à 260 m μ , précipité par l'alcool isopropylique puis dissout dans le solubilisateur Soluene 100 Packard. Les comptages ont été réalisés par fractions de 10 mn pendant 1 heure par échantillon. Les résultats obtenus, après correction du bruit de fond et du quenching sont exprimés par le nombre de désintégrations par minute pour 0,1 mg d'ADN.

Dans un troisième type d'expérience, nous avons réalisé l'étude histo-autoradiographique du marquage cellulaire dans l'épithélium intestinal : à cette fin, une portion d'intestin a été prélevée chez des animaux sacrifiés entre 0 et 48 h après l'injection, fixée dans le liquide de Smith, puis incluse dans la paraffine et débitée en coupes sériées de 5 μ d'épaisseur. Les préparations histologiques ont été recouvertes de l'émulsion Ilford L4 puis, après 55 jours d'exposition,

DURÉE DE DISPONIBILITÉ DE LA THYMINÉ

les autoradiographies ont été révélées et fixées selon les procédés classiques et colorées par le vert de méthyle et la pyronine (mélange de Pappenheim-Unna). Le comptage des grains d'argent métallique a été réalisé en lumière réfléchie (objectifs Leitz Ultropak) sur la plus grande surface de section des noyaux de l'épithélium intestinal : seuls les noyaux surmontés de plus de 3 grains d'argent métallique ont été considérés comme marqués. Le pourcentage de mitoses marquées a été calculé aux divers intervalles de temps séparant la fixation de l'injection. En outre cette série expérimentale a permis de mesurer la durée du cycle cellulaire et de ses phases dans l'épithélium intestinal à la température de 21 °C et de calculer l'indice de marquage après comptage de 2 000 noyaux marqués, ou non, une heure après l'injection de thymidine tritiée.

B - CHEZ DE JEUNES LARVES DE PLEURODÈLE (longueur : 11 mm) au stade 36 de la table de Gallien et Durocher (17), ayant subi une injection intrapéritonéale de 2.10⁻⁴ ml d'une solution de thymidine tritiée (activité totale 100 µCi/ml, activité spécifique 5 Ci/mM) à raison de 10 µCi/g de poids frais, et élevées à la température de 21 °C, deux types d'expériences ont été réalisés.

Dans une première série expérimentale destinée à l'étude de la variation de la radio-

activité de l'ADN des tissus, des lots de 10 larves ont été fixés par immersion dans l'azote liquide à divers intervalles de temps échelonnés de 0 à 90 mn après l'injection de thymidine tritiée, puis l'ADN de chaque lot a été extrait, dosé par spectrophotométrie, et sa radioactivité a été comptée par scintillation selon la méthode précédemment décrite.

Pour calculer le rendement de la méthode d'extraction de l'ADN, le broyat de 10 à 18 larves, ayant subi 1 heure auparavant une injection de thymidine tritiée, a été réparti en deux fractions égales dont l'une a subi une précipitation par l'acide trichloracétique (TCA) à 10 % et l'autre une extraction de l'ADN précédée ou non d'une incubation pendant 1 heure à 30 °C en présence de DNase ou de RNase. Le rapport entre la radioactivité, mesurée par scintillation, de l'ADN extrait et celle de la fraction précipitable par le TCA (qui contient l'ADN total, des protéines et des composés divers) fournit une bonne mesure du rendement de l'extraction. Les valeurs rassemblées dans le Tableau I permettent de conclure d'une part que la radioactivité observée dans les différentes fractions est bien liée à l'ADN et d'autre part que le rendement de l'extraction est de 32 ± 5 %.

On extrait donc par cette méthode environ un tiers de l'ADN total des larves, ce

TABLEAU I - Comparaison entre la radioactivité de l'ADN et la radioactivité de la fraction précipitable par le TCA, observées après injection de thymidine tritiée (10 µCi/g de poids frais d'une solution à 5 Ci/mM) à des larves de pleurodèle au stade 36.

Lots	Nombre de désintégrations par minute rapporté à 10 larves				Rendement de l'extraction d'ADN % B/A
	Fraction précipitable par le TCA A	ADN extrait		B/A	
		sans action enzymatique préalable B	après action de		
			RNase	DNase	
I	97 391	30 713	28 767	4 403	31,5
II	85 653	27 780			26,9
III	79 730	28 862			36,2
IV	94 542	34 416			36,4
V	74 242	22 050			29,7
VI	95 282	30 014			31,5
VII	107 366	34 250			31,9
moyenne	92 029	29 726			32 ± 5 %

qui est une fraction suffisante pour que les conclusions tirées des expériences réalisées par cette méthode puissent être considérées comme valables.

Dans une seconde série expérimentale, nous avons étudié par la méthode histoautoradiographique la variation de radioactivité des noyaux en fonction du temps : les larves ont été fixées une par une dans le liquide de Smith à divers intervalles de temps après l'injection, puis incluses dans la paraf-

vité du sang en fonction du temps écoulé après l'injection de thymidine tritiée sont de même type dans les 4 séries expérimentales réalisées; l'une de ces courbes est donnée dans la figure 1. Bien que dans chacune des 4 séries expérimentales les animaux utilisés aient eu des poids voisins et que les injections aient été pratiquées à la même heure de la journée (10-11 heures) afin de tenir compte d'éventuelles variations nyctémérales du métabolisme de la thymidine (32), on peut

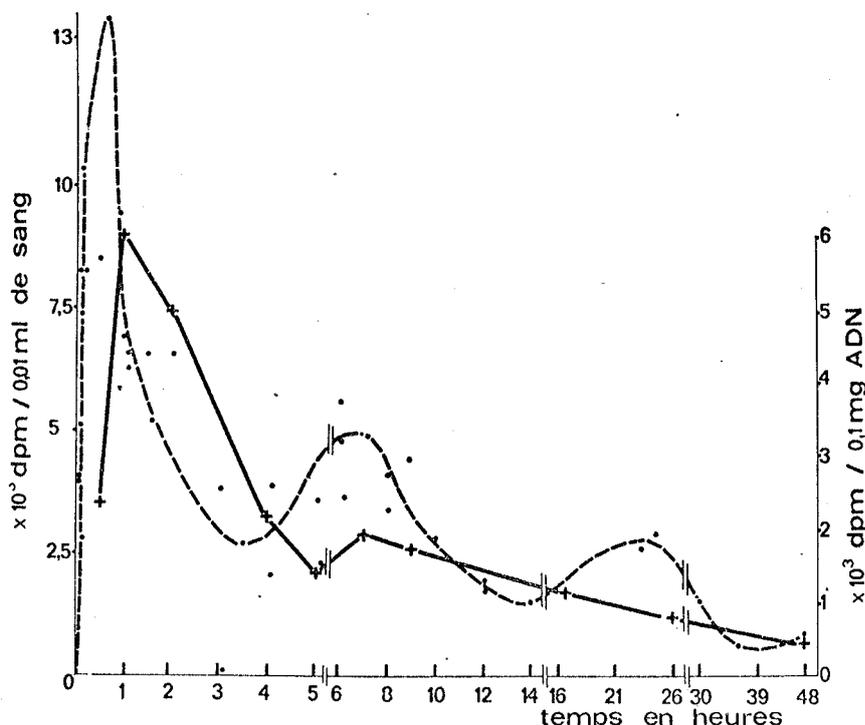


Fig. 1. — Courbe de variation de la radioactivité sanguine exprimée par le nombre de désintégrations par minute (dpm) pour 0,01 ml de sang (-----) et courbe de variation de la radioactivité spécifique de l'ADN de l'intestin exprimée par le nombre de désintégrations par minute (dpm) pour 0,1 mg d'ADN (—), en fonction du temps écoulé après l'injection intrapéritonéale de thymidine tritiée (0,5 μ Ci/g de poids frais) à de jeunes pleurodèles après la métamorphose.

fine et débitées en coupes sériées de 5 μ d'épaisseur. Des préparations autoradiographiques ont été réalisées comme précédemment et exposées pendant 45 jours. Le comptage des grains d'argent a été effectué sur la plus grande surface de section des noyaux de l'épithélium gastrique.

RÉSULTATS

I - Jeunes pleurodèles métamorphosés.

1. Variation de la radioactivité du sang.

Les courbes de variation de la radioacti-

observer, entre les pleurodèles fixés -aux mêmes intervalles de temps, de grandes différences de la radioactivité sanguine, liées probablement à des différences physiologiques individuelles. Néanmoins, les résultats obtenus montrent que la radioactivité sanguine liée au tritium varie en fonction du temps selon une courbe triphasique. Dans l'intervalle de temps étudié, 3 maxima atteignant respectivement 13 500, 4 500 et 3 000 dpm/0,01 ml de sang sont observés respectivement 40 minutes, 6 h et 21 h après l'injection de thymidine tritiée; ils

DURÉE DE DISPONIBILITÉ DE LA THYMININE

sont séparés par 3 minima atteignant 2 700, 1 500 et 750 dpm/0,01 ml de sang observés respectivement 3 h 30, 14 h et 37 h après l'injection. Entre 37 et 48 heures la radioactivité sanguine semble augmenter à nouveau.

2. Incorporation de la thymidine dans l'ADN intestinal.

La courbe de variation de la radioactivité spécifique de l'ADN intestinal en fonction du temps écoulé après l'injection est donnée dans la figure 1 et atteint un premier maximum de 6 000 dpm/0,1 mg d'ADN 1 h après l'injection puis décroît rapidement dans les 4 heures suivantes. Après un second maximum observé 7 heures après l'injection et 3 fois moins élevé que le précédent, la courbe décroît régulièrement jusqu'à 48 heures.

du fait que certaines cellules commencent ou terminent leur phase S durant la période de disponibilité de la thymidine tritiée; nous avons donc été conduits à classer les noyaux marqués en 4 catégories selon l'intensité de leur marquage (4 à 30 grains, 31 à 60 grains, 61 à 90 grains, 91 grains et plus); la proportion de noyaux marqués appartenant aux 4 catégories ainsi définies varie en fonction du temps écoulé après l'injection de thymidine tritiée (Fig. 2). Dès 3 heures après l'injection, 10 % des noyaux marqués sont surmontés de plus de 90 grains d'argent; cette proportion atteint un maximum de 72 % 4 heures après l'injection puis décroît progressivement dès 6 heures pour s'annuler à 48 heures. Inversement, la proportion de noyaux surmontés de moins de 90 grains d'argent atteint un minimum 4 heures après l'injection puis augmente progressivement

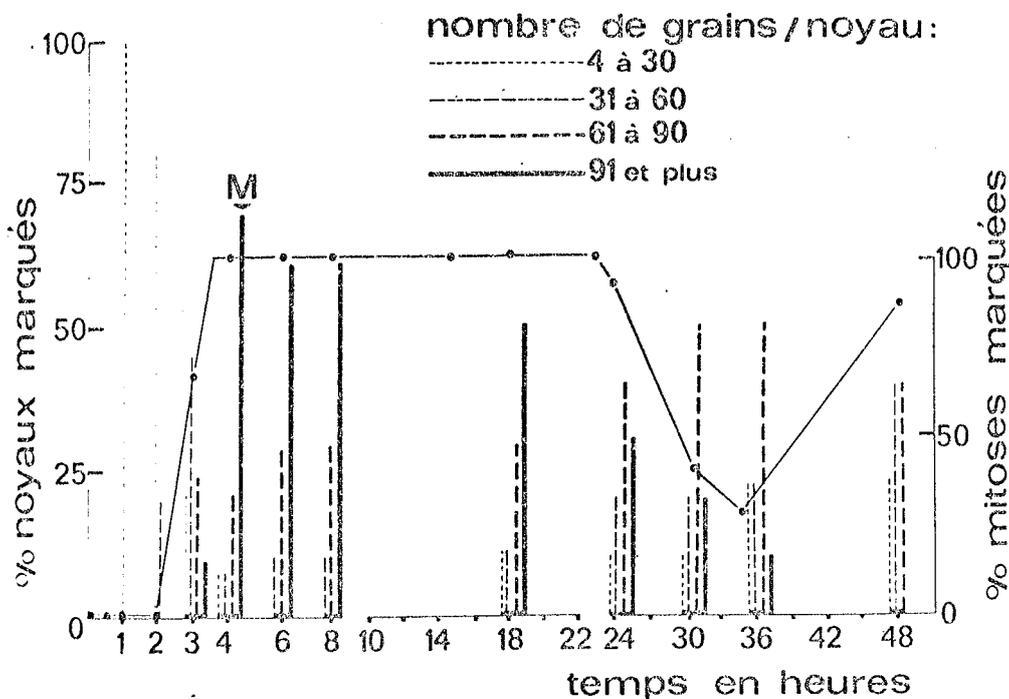


Fig. 2. — Courbe de variation du pourcentage de mitoses marquées (-----) et histogramme de variation du pourcentage de noyaux marqués par 4 à 30, 31 à 60, 61 à 90 et plus de 90 grains d'argent, en fonction du temps écoulé après une injection intrapéritonéale de thymidine tritiée (0,5 μ Ci/g de poids frais) à de jeunes pleurodèles après la métamorphose. La proportion maximale de noyaux marqués par le plus grand nombre de grains (M) s'observe 4 heures après l'injection.

3. Variation du nombre de grains d'argent par noyau.

Sur une même coupe d'épithélium intestinal les noyaux sont inégalement marqués

en fonction du temps jusqu'à 48 heures après l'injection.

4. Durée du cycle cellulaire et de ses phases.

Le calcul graphique, selon la méthode

classique (29), de la durée du cycle cellulaire et de ses phases à partir de la courbe de variation du pourcentage de mitoses marquées de la figure 2, permet de retenir les valeurs suivantes : T = 37 heures, S = 26 h, G₂ = 2 h, M = 2 h et G₁ = 7 heures.

5. Indice de marquage et coefficient de prolifération.

Une heure après l'injection, 3,6 % des noyaux de l'épithélium intestinal sont marqués. Connaissant cet indice ainsi que la durée du temps de génération et de la phase S, il est possible de calculer le coefficient de prolifération du tissu grâce à la relation suivante applicable aux populations cellulaires stables :

Coefficient de prolifération

$$= \frac{\text{indice de marquage}}{\text{durée de S/durée de T}}$$

Les résultats obtenus indiquent que 5,5 % des noyaux de l'épithélium intestinal sont engagés dans un cycle mitotique.

II - Jeunes larves de pleurodèle au stade 36.

1. Variation de l'activité spécifique et de l'activité totale de l'ADN.

La courbe de variation de l'activité spécifique de l'ADN des larves en fonction du temps écoulé après l'injection de thymidine tritiée (Fig. 3) atteint un maximum de 29 600 dpm/0,1 mg d'ADN 20 minutes après l'injection puis décroît jusqu'à la fin de l'intervalle de temps étudié. En revanche, la courbe de variation de l'activité totale de l'ADN en fonction du temps écoulé après l'injection augmente pendant les 50 minutes qui suivent l'injection puis diminue légèrement jusqu'à la fin de l'intervalle de temps étudié. Cette diminution, qui traduit l'abaissement relatif du taux d'ADN radioactif dans le tiers de l'ADN total extrait par la méthode utilisée, montre que l'ADN synthétisé après 50 minutes n'est pas radioactif et que le précurseur n'est donc plus disponible après cet intervalle de temps. Les irrégularités de la courbe de radioactivité totale sont à attribuer aux variations du rendement de la

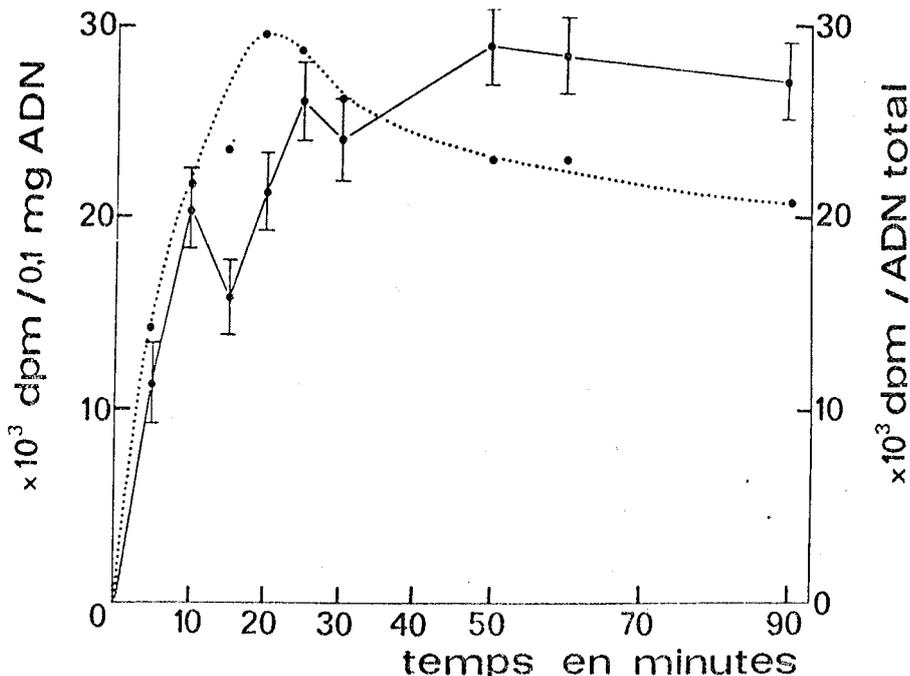


Fig. 3. — Courbes de variation de la radioactivité spécifique (.....) et de la radioactivité totale (—) de l'ADN de larves de pleurodèle au stade 36, exprimées par le nombre de désintégrations par minute (dpm) pour 0,1 mg d'ADN, en fonction du temps écoulé après une injection intrapéritonéale de thymidine tritiée (10 µCi/g de poids frais).

DURÉE DE DISPONIBILITÉ DE LA THYMININE

TABLEAU II - Taux d'incorporation, dans l'ADN, de la thymidine tritiée injectée à de jeunes larves de pleurodèle au stade 36 ($10 \mu\text{Ci/g}$ de poids frais d'une solution à 5 Ci/mM), calculé par le rapport entre la radioactivité, mesurée par scintillation, de l'ADN extrait (compte tenu du rendement de l'extraction) et la radioactivité administrée (égale pour tous les lots à $0,18 \mu\text{Ci}/10$ larves).

Lots	Quantité d'ADN rapportée à 10 larves mg	Nombre de dpm	Activité totale de l'ADN, rapportée à 10 larves μCi	Taux d'incorporation dans l'ADN %
I	0,12	30 713	0,0438	24,3
II	0,12	27 780	0,0431	23,9
III	0,10	28 862	0,0359	19,9
IV	0,10	34 416	0,0426	23,6
V	0,08	22 050	0,0334	18,6
VI	0,10	30 014	0,0429	23,8
VII	0,10	34 250	0,0484	26,9
moyenne	0,10	29 726	0,0414	$23,0 \pm 5 \%$

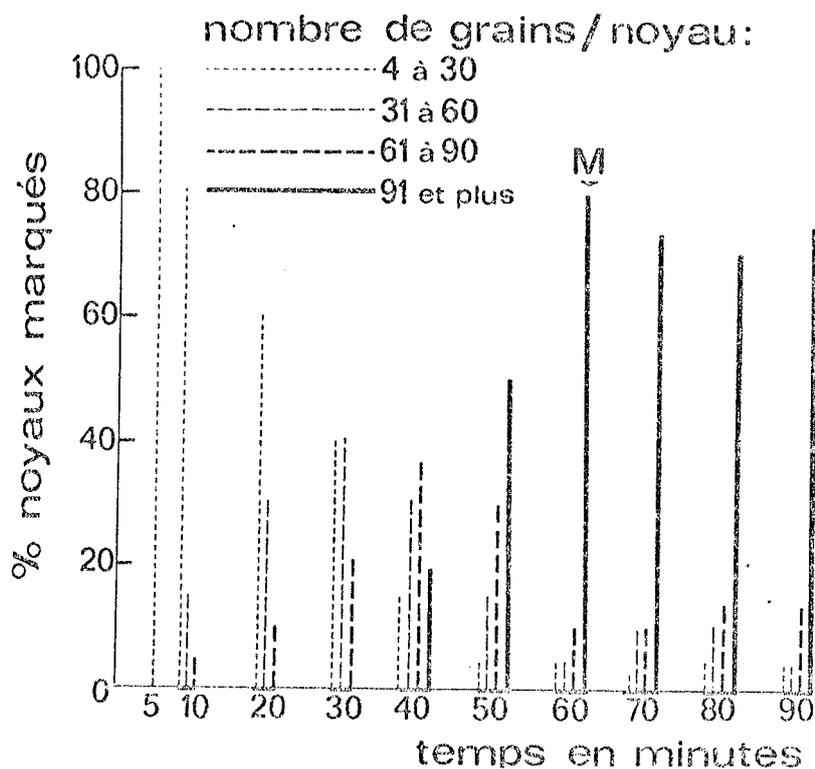


Fig. 4. --- Histogramme de variation du pourcentage de noyaux marqués par 4 à 30, 31 à 60, 61 à 90 et plus de 90 grains d'argent, à divers intervalles de temps après l'injection de thymidine tritiée ($10 \mu\text{Ci/g}$ de poids frais) à des larves de pleurodèle au stade 36. La proportion maximale de noyaux marqués par le plus grand nombre de grains (M) s'observe 60 minutes après l'injection.

méthode d'extraction de l'ADN (Tableau I).

Connaissant l'activité totale de l'ADN extrait des larves et la radioactivité totale injectée, il est possible de calculer le taux d'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN. Ce calcul a été effectué 1 heure après l'injection. Les résultats obtenus, portés dans le Tableau II, indiquent que 23 ± 5 % de la thymidine injectée a été incorporé dans l'ADN des cellules en phase S pendant la période de disponibilité du précurseur.

2. Variation du nombre de grains d'argent par noyau.

Les noyaux marqués ont été répartis en 4 catégories selon l'intensité de leur marquage (4 à 30 grains, 31 à 60 grains, 61 à 90 grains, 91 grains et plus). La proportion des noyaux appartenant à chacune de ces catégories varie en fonction du temps écoulé après l'injection selon l'histogramme de la figure 4. Dès 40 minutes après l'injection, 20 % des noyaux sont surmontés de plus de 90 grains d'argent; cette proportion atteint un maximum de 80 % 1 heure après l'injection. Inversement, la proportion des noyaux surmontés de moins de 91 grains et qui est maximale 5 minutes après l'injection, décroît rapidement pour atteindre un minimum 60 minutes après l'injection.

INTERPRÉTATION ET DISCUSSION

Les résultats obtenus permettent de préciser la durée de disponibilité et le mode d'utilisation de la thymidine tritiée injectée dans nos conditions expérimentales.

I - Jeunes pleurodèles métamorphosés.

La thymidine injectée par voie intrapéritonéale diffuse rapidement dans le sang comme en témoigne l'augmentation de la radioactivité sanguine (Fig. 1) qui, dès 5 minutes après l'injection, atteint le tiers de sa valeur maximale. Une grande rapidité de diffusion de la thymidine injectée par voie intrapéritonéale s'observe également chez les Mammifères puisque 85 % du précurseur sont éliminés dans les 15 minutes qui suivent l'injection de thymidine tritiée chez le rat (26). L'intervalle de 40 minutes, à la fin du-

quel la radioactivité sanguine atteint sa valeur maximale, peut être interprété comme le temps nécessaire à l'établissement d'un équilibre de concentration en thymidine entre le liquide coelomique et le sang; il dépend d'une part de la vitesse de diffusion du nucléoside et d'autre part de la vitesse de son utilisation par les cellules. La décroissance de la radioactivité du sang entre 40 minutes et 3 h 30 après l'injection traduit certainement la consommation de la thymidine exogène par le catabolisme cellulaire (31, 19) et par la synthèse de l'ADN des cellules engagées dans un cycle mitotique (12, 28). Bien que le support chimique de la radioactivité sanguine n'ait pas été analysé, il est probable que le premier pic de radioactivité du sang correspond à la diffusion et à l'utilisation de la thymidine tritiée injectée.

L'incorporation effective de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules en phase S de leur cycle mitotique est mise en évidence par l'augmentation de la radioactivité spécifique de l'ADN pendant l'heure qui suit l'injection (Fig. 1). Entre 1 heure et 5 heures après l'injection, la diminution d'activité spécifique de l'ADN montre que la proportion d'ADN synthétisé à partir de thymidine tritiée est de plus en plus faible, sans qu'il soit possible de préciser, à l'aide de cette seule courbe, l'instant à partir duquel le précurseur marqué introduit n'est plus disponible pour cette synthèse; néanmoins, la plus grande partie de la thymidine tritiée participant à la synthèse de l'ADN est incorporée durant la première heure.

Entre 6 et 7 heures après l'injection, la radioactivité sanguine présente un second pic qui correspond à la réapparition de tritium dans le sang, vraisemblablement lié à des produits de dégradation de la thymidine. Le fait que ce pic de radioactivité sanguine soit suivi, 1 heure plus tard, par une augmentation sensible de l'activité spécifique de l'ADN (Fig. 1) permet de supposer que ces produits de dégradation peuvent être réutilisés pour la synthèse d'ADN (25). On sait en effet que la thymidine est dégradée en thymine et dihydrothymine (9, 13, 33) dans les cellules du foie (16, 18, 27) chez les mammifères; il n'est pas déraisonnable de penser que de tels catabolites soient formés chez le pleurodèle, passent dans le sang, et soient incorporés dans l'ADN des cellules en phase S 6 heures après l'injection.

DURÉE DE DISPONIBILITÉ DE LA THYMININE

Le troisième pic de radioactivité sanguine observé 24 heures environ après l'injection n'est suivi d'aucune augmentation de l'activité spécifique de l'ADN (Fig. 1) et semble, de ce fait, ne représenter que de la radioactivité liée à l'excrétion de produits terminaux du catabolisme de la thymidine exogène.

Le nombre de grains d'argent métallique qui surmontent les noyaux marqués est considéré comme représentatif du taux de synthèse d'ADN des cellules en phase S au moment de l'injection du précurseur (20, 33); ce nombre croît jusqu'à un maximum atteint à la fin de la période de disponibilité de la thymidine tritiée, puis diminue à la suite des divisions cellulaires. La figure 2 montre que, dans les cellules de l'épithélium intestinal des jeunes pleurodèles métamorphosés, la plus forte proportion de noyaux marqués par plus de 90 grains s'observe 4 heures après l'injection. Après cet intervalle de temps, la proportion de ces noyaux diminue régulièrement pour s'annuler après 36 heures. Il convient cependant de remarquer que la proportion de noyaux marqués par plus de 90 grains ne varie pas entre 6 et 8 heures après l'injection ce qui est probablement à mettre en relation avec le marquage différé de l'ADN observé 7 heures environ après l'injection (Fig. 1). Inversement, la proportion de noyaux marqués par moins de 91 grains est minimale 4 heures après l'injection puis augmente progressivement jusqu'à 36 heures. L'augmentation de la proportion des noyaux marqués par moins de 91 grains et la diminution de la proportion de noyaux marqués par plus de 90 grains entre 4 heures et 36 heures après l'injection sont corrélatives et résultent de la division des cellules qui étaient en phase S au moment de l'injection. En effet, la courbe de variation du pourcentage de mitoses marquées dans l'épithélium intestinal en fonction du temps écoulé après l'injection (Fig. 2) montre qu'entre 2 heures (durée de G_2) et 30 heures (durée de $S + G_2 + M$) après l'injection, toutes les cellules marquées ont subi une mitose ayant pour effet de diminuer de moitié le nombre de grains surmontant leur noyau.

Les résultats obtenus permettent de conclure que la thymidine tritiée n'est pas disponible au-delà de 4 heures après l'injection et que l'incorporation la plus importante se déroule durant la première heure, pendant

laquelle on observe l'augmentation de l'activité spécifique de l'ADN.

Chez les jeunes pleurodèles après la métamorphose, la durée de disponibilité de la thymidine tritiée injectée à raison de 0,5 $\mu\text{Ci/g}$ de poids frais est environ 4 fois plus longue que chez les Mammifères pour les doses de 1 $\mu\text{Ci/g}$ de poids frais généralement employées; en effet, les nombreux travaux effectués à cet égard (11, 20, 21, 22, 28, 31, 34, 35) chez l'homme, le rat ou la souris, indiquent, par la méthode du comptage des grains d'argent, que la thymidine tritiée injectée n'est disponible que durant 40 à 60 minutes et que la plus grande partie du précurseur est incorporée dans l'ADN durant les 20 premières minutes qui suivent l'injection. Des temps plus courts de l'ordre de 10 à 30 minutes ont même été observés chez la souris (1,29) et le rat (16). Une telle rapidité d'utilisation de la thymidine chez les Mammifères est due non seulement à une clearance plasmatique et à une dégradation très rapides de ce nucléoside (6,31), mais aussi à ce que la thymidine ne passe que très peu de temps dans la fraction acido-soluble des cellules lors de la phosphorylation préliminaire à son incorporation dans l'ADN. Il est estimé (9) que 3 minutes seulement sont nécessaires au passage de la thymidine tritiée du sang dans la fraction acido-soluble des cellules où ce précurseur n'est retenu pour sa phosphorylation (10) que pendant 20 à 30 minutes.

Chez le pleurodèle, la clearance plasmatique de la thymidine exogène semble beaucoup plus lente que chez les Mammifères et dure vraisemblablement 3 heures 30 environ comme le suggère l'étalement du premier pic de radioactivité sanguine (Fig. 1). Cette différence est certainement due à un catabolisme plus lent chez les Amphibiens du fait de leur température plus basse.

Le décalage de 20 minutes observé (Fig. 1) entre le maximum d'activité sanguine (40 minutes) et le maximum d'activité spécifique de l'ADN (1 heure) et le décalage de 30 minutes observé entre le premier minimum de radioactivité sanguine (3 heures 30) qui correspond probablement à la disparition de la thymidine circulante, et le maximum d'activité totale de l'ADN (4 heures) (Fig. 2), correspond au temps que passe la thymidine dans la fraction acido-soluble des cellules qui l'incorporent dans leur ADN. Ce temps de 20 à 30 minutes est tout à fait comparable à celui observé chez les Mammifères (9).

La connaissance de la durée de disponibilité de la thymidine tritiée injectée chez les jeunes pleurodèles permet de corriger les résultats du calcul graphique de la durée du cycle cellulaire et de ses phases obtenus à partir de la courbe de variation du pourcentage de mitoses marquées de la figure 2; on aboutit ainsi à des valeurs plus précises qui sont : $S = 26 - 4 = 22$ heures et $G_1 = 7 + 4 = 11$ heures; T, G_2 et M ne sont pas modifiés.

II - Larves au stade 36.

Étant donné la petite taille des larves au stade 36, la variation de la radioactivité sanguine après l'injection de thymidine tritiée n'a pas été étudiée, mais l'augmentation de la radioactivité de l'ADN total après broyage des larves entières a montré que le précurseur diffuse très rapidement du liquide coelomique dans le sang, puis dans les cellules, puisque 5 minutes après l'injection, la radioactivité spécifique de l'ADN des tissus atteint déjà presque la moitié de sa valeur maximale, qui est observée 20 minutes après l'injection (Fig. 3).

Par ailleurs, la proportion de noyaux de l'épithélium gastrique marqués par plus de 90 grains (Fig. 4) est maximale 60 minutes après l'injection, puis varie peu jusqu'à la fin de l'intervalle de temps de 90 minutes étudié; la proportion des noyaux marqués surmontés de moins de 91 grains qui est maximale 5 minutes après l'injection diminue jusqu'à 60 minutes puis varie peu entre 60 et 90 minutes. Ces résultats montrent que la thymidine injectée est incorporée dans les noyaux des cellules en phase S pendant 1 heure, et en outre, qu'aucune division cellulaire ne semble intervenir dans les 90 minutes qui suivent l'injection; ceci est en accord avec notre travail antérieur (2) selon lequel la durée de la phase G_1 à ce stade est d'environ 3 heures dans l'épithélium gastrique.

La variation de l'activité totale de l'ADN (Fig. 3) a la même signification que celle du nombre de grains d'argent (Fig. 4); néanmoins, le maximum de l'activité totale de l'ADN isolé s'observe 50 minutes après l'injection, alors que le marquage maximum des noyaux est observé 60 minutes après l'injection par la méthode autoradiographique. Cette différence est certainement liée

aux méthodes utilisées; en effet, la méthode d'extraction de l'ADN et de mesure de sa radioactivité par scintillation est plus précise que la méthode autoradiographique puisqu'elle tient compte des noyaux très faiblement marqués qui, en fin de phase S au moment de l'injection ou en début de phase S à la fin de la période de disponibilité du précurseur, ont incorporé une faible quantité de thymidine tritiée, et ne sont pas considérés comme marqués par la méthode autoradiographique.

Chez les larves de pleurodèle, 23 % environ de la thymidine tritiée injectée est incorporé dans l'ADN des cellules en activité mitotique. Le fait que ce taux est supérieur à celui de 8 à 15 % observé chez les Mammifères (16, 19, 23) est certainement à mettre en relation avec la grande différence d'activité mitotique entre les animaux adultes dont les populations cellulaires sont en état stable, et les embryons ou les larves dont les populations cellulaires sont croissantes; il est d'ailleurs établi chez le rat (14) que l'incorporation de thymidine décroît progressivement avec l'âge depuis la naissance jusqu'au stade adulte.

Nous pouvons conclure de ces résultats que la thymidine tritiée injectée à raison de 10 $\mu\text{Ci/g}$ de poids frais à des larves au stade 36 est disponible pendant 60 minutes et que la plus grande partie du précurseur est incorporée dans l'ADN durant les 20 premières minutes qui suivent l'injection (maximum d'activité spécifique). Cette durée est courte par rapport à celle de la phase S qui est d'environ 37 heures, mais importante par rapport à celle de la phase G_1 qui est de 2,5 heures environ à ce stade (2). Il est donc nécessaire d'en tenir compte pour une mesure précise de la durée de la phase G_1 au stade 36.

Il est remarquable de constater que malgré l'injection, chez les larves, d'une dose de thymidine tritiée par gramme de poids frais qui est 20 fois supérieure à celle qui est injectée aux pleurodèles métamorphosés, la durée de disponibilité du précurseur est environ 4 fois plus courte chez les premières que chez les seconds. Ceci est sans aucun doute à mettre en relation avec le fait qu'à ce stade larvaire, le coefficient de prolifération dans l'ensemble des tissus est élevé et varie de 30 à 56 % selon les organes (2), alors qu'après la métamorphose il est beaucoup plus bas: ainsi dans l'épithélium intes-

DURÉE DE DISPONIBILITÉ DE LA THYMIDINE

tinal qui est certainement le tissu qui prolifère le plus activement, il n'est que de 5,5 %. A ce mécanisme s'ajoute peut-être une intensité différente de l'élimination urinaire de la thymidine et de son catabolisme par le foie. De telles valeurs, et tout particulièrement celles qui ont été obtenues chez les larves au stade 36 (pour lesquelles la durée des cycles cellulaires est de l'ordre de 50 heures à 17 °C) nous donnent l'assurance que le protocole expérimental que nous utilisons pour l'étude de la prolifération cellulaire est satisfaisant.

Remerciements.

Nous exprimons nos très vifs remerciements à M. le Professeur Pelmont et à M. le Professeur Carlier, de l'Université scientifique et médicale de Grenoble, pour l'aide matérielle qu'ils nous ont très aimablement apportée, et qui a permis la réalisation de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

1. BLENKINSOPP, W.K. (1968). — Duration of availability of tritiated thymidine following intraperitoneal injection. *J. Cell Sci.*, **3**, 89-93.
2. BRUGAL, G. (1971). — Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires : étude autoradiographique chez les embryons et les jeunes larves de *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien Urodèle.) *Develop. Biol.*, **24**, 301-321.
3. (1971). — Étude autoradiographique de l'influence de la température sur la prolifération cellulaire chez les embryons âgés de *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien Urodèle.) *W'Roux Arch.*, **168**, 205-225.
4. BRUGAL, G. et BERTRANDIAS, J.P. (1970). — Méthode mathématique d'évaluation du coefficient de prolifération dans les populations cellulaires embryonnaires en croissance exponentielle. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **D 270**, 1603-1606.
5. BRUGAL, G. et CHIBON, P. (1970). — Signification des variations périodiques de l'indice de marquage en fonction du temps dans les tissus embryonnaires. *C.R. Acad. Sci.* Paris, **D 270**, 998-1001.
6. CHANG, L.O. et LOONEY, W.B. (1965). — A biochemical and autoradiographic study of the *in vivo* utilization of tritiated thymidine in regenerating rat liver. *Cancer Res.*, **25**, 1817-1826.
7. CHIBON, P. (1968). — Étude au moyen de la thymidine tritiée de la durée des cycles mitotiques dans la jeune larve de *Pleurodeles waltlii* Michah. Amphibien Urodèle. *C.R. Acad. Sci.* Paris, **D 267**, 203-205.
8. CHIBON, P. et BRUGAL, G. (1969). — Étude autoradiographique de l'action de la température et de la thyroxine sur la durée des cycles mitotiques dans l'embryon âgé et la jeune larve de *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien Urodèle). *C.R. Acad. Sci.* Paris, **D 269**, 70-73.
9. CLEAVER, J.E. (1967). — Thymidine metabolism and cell kinetics. *Frontiers of biology*. A. Neuberger et E.L. Tatum editors. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
10. CLEAVER, J.E. et HOLFORD, R.M. (1965). — Investigations into the incorporation of (³H) thymidine into DNA in L-strain cells and the formation of a pool of phosphorylated derivatives during pulse labelling. *Biochem. Biophys. Acta*, **103**, 654-671.
11. CRONKITE, E.P.; FLIEDNER, T.M.; KIELMAN, S.A. et RUBINI, K.R. (1962). — Tritium-labelled thymidine (³H-TDR) : its somatic toxicity and use in the study of growth rates and potentials in normal and malignant tissue of man and animals. In « Tritium in the physical and biological sciences ». *Symp. Int. Atom. Energy. Agency*, Vienna, **2**, 189-209.
12. EVANS, H.J. (1964). — Uptake of ³H-thymidine and patterns of DNA replication in nuclei and chromosomes of *Vicia faba*. *Exptl. Cell Res.*, **35**, 381-393.
13. FEINENDEGEN, L.E. (1967). — Tritium-labeled molecules in biology and medicine. Academic Press, New York and London.
14. FERDINANDUS, J.A.; MORRIS, H.P. et WEBER, G. (1971). — Behavior of opposing pathways of thymidine utilization in differentiating, regenerating and neoplastic liver. *Cancer Res.*, **31**, 550-556.
15. FRIEDKIN, M.; TILSON, D. et ROBERTS, D. (1956). — Studies of deoxyribonucleic acid biosynthesis in embryonic tissue with C¹⁴-thymidine. *J. Biol. Chem.*, **220**, 627-637.
16. FULCRAND, J.; BISCONTE, J. et MARTY, R. (1968). — Clearance plasmatique et élimination urinaire de la thymidine marquée et de ses métabolites. *C.R. Soc. Biol.*, **162**, 1584-1588.
17. GALLIEN, L. et DUROCHER, M. (1957). — Table chronologique du développement de *Pleurodeles waltlii*. *Bull. Biol. Fr. et Belg.*, **94**, 97-114.
18. GERBER, G.B. et BEMY-DEFRAIGNE, J. (1963). — Synthese der Deoxyribonucleinsäure in der isolierten perfundierten

- Rattenleber, I. Der Einbau von ^3H -Thymidin in normale Leber und in Leber nach partieller Hepatektomie. *Z. Naturforsch.*, **18b**, 216-218.
19. HINRICHS, H.R.; PETERSON, R.O. et BASERGA, R. (1964). — Incorporation of thymidine into DNA of mouse organs. *Arch. Pathol.*, **78**, 245-253.
 20. HUGHES, W.L.; BOND, V.P.; BRECHER, G.; CRONKITE, E.P.; PAINTER, R.B.; QUASTLER, H. et SHERMAN, F.G. (1958). — Cellular proliferation in the mouse as revealed by autoradiography with tritiated thymidine. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **44**, 476-483.
 21. KISILEWSKI, W.E.; BASERGA, R. et LISCO, H. (1961). — Tritiated thymidine and the study of tumors. *Atompraxis*, **7**, 81-85.
 22. KOBURG, E. et MAURER, W. (1962). — Autoradiographische Untersuchung mit ^3H -Thymidin über die Dauer der deoxyribonucleinsäuresynthese und ihren zeitlichen Verlauf bei den Darmepithelien und anderen Zellarten der Maus. *Biochem. Biophys. Acta*, **61**, 229-242.
 23. LANG, W. et MAURER, M. (1965). — Zur Verwendbarkeit von Feulgengefärbten Schnitten für quantitative Autoradiographie mit markierten Thymidin. *Exptl. Cell Res.*, **39**, 1-9.
 24. McQUADE, H.A. et FRIEDKIN, M. (1960). — Radiation effects of H^3 -thymidine and thymidine- C^{14} . *Exptl. Cell Res.*, **21**, 118-125.
 25. MALYUK, V.I. et FOMICHOVA, V.M. (1970). — Reutilization of thymidine- H^3 by endothelium under conditions of physiological regeneration of the vascular wall. *Dopov. Akad. Nauk. UKR. RSR.*, **32**, 742-744.
 26. POST, J.; HUANG, C.Y. et HOFFMAN, J. (1963). — The replication time and pattern of the liver cell in the growing rat. *J. Cell. Biol.*, **18**, 1-12.
 27. POTTER, V.R. (1960). — *Nucleic Acid Outlines*. R.H. Burris et H.C. Lichstein editors. Burgess Publishing Co. Minneapolis. 1.
 28. POTTER, R.L. et NYGAARD, O.F. (1963). — The conversion of thymidine to thymine-nucleotides and desoxyribonucleic acid *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **238**, 2150-2155.
 29. QUASTLER, H. et SHERMAN, F.G. (1959). — Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exptl. Cell Res.*, **17**, 420-438.
 30. REICHARD, P. et ESTBORN, B. (1951). — Utilization of desoxyribosides in the synthesis of polynucleotides. *J. Biol. Chem.*, **188**, 839-846.
 31. RUBINI, J.R.; CRONKITE, E.P.; BOND, V.P. et FLIEDNER, T.M. (1960). — The metabolism and fate of tritiated thymidine in man. *J. Clin. Invest.*, **39**, 909-918.
 32. SCHEVING, L.E. et CHIAKULAS, J.J. (1965). — Twenty four-hours periodicity in the uptake of tritiated thymidine and its relation to mitotic rate in urodele larval epidermis. *Exptl. Cell Res.*, **39**, 161-169.
 33. SCHULTZE, B. (1969). — Physical techniques in biological research. III B. Autoradiography at the cellular level. A.W. Pollister editor. Academic Press, New York and London.
 34. STAROSCIK, R.N.; JENKINS, W.H. et MENDELSON, M.L. (1961). — Availability of tritiated thymidine after intravenous administration. *Nature*, **202**, 456-458.
 35. WEGENER, K.; HOLLWEG, S. et MAURER, W. (1964). — Autoradiographische Bestimmung der DNS-Verdopplungszeit und anderer Teilphasen der Zell-zyklus bei fetalen Zellarten der Ratte. *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.*, **63**, 309-326.

Manuscrit reçu le 21 novembre 1972.

CHAPITRE - II -

ÉVOLUTION DE LA CINÉTIQUE DE PROLIFÉRATION CELLULAIRE AU COURS DE L'ORGANOGENÈSE

" Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires : étude autoradiographique chez les embryons et les jeunes larves de Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibien, Urodèle) "

Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires: étude autoradiographique chez les embryons et les jeunes larves de *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien Urodèle).

GÉRARD BRUGAL

Laboratoire de Zoologie, Faculté des Sciences de Grenoble, Domaine
Universitaire, 38-Saint-Martin-d'Hères, France

Accepted October 19, 1970

INTRODUCTION

Les relations entre la prolifération des cellules et leur différenciation ont fait l'objet de travaux récents, généralement réalisés *in vitro*, qui font apparaître un antagonisme entre ces deux formes d'activité cellulaire. C'est ainsi par exemple que dans le cas de la myogenèse, la prolifération cesse avant que les cellules ne synthétisent de la myosine (Stockdale et Holtzer, 1961; Okasaki et Holtzer, 1965), tandis que dans le cas de l'hématopoïèse chez le triton (Grasso et Woodward, 1967) le ralentissement de la prolifération cellulaire accompagne la synthèse de l'hémoglobine.

Les modifications qualitatives et surtout quantitatives de l'activité mitotique au cours de la différenciation *in vivo* n'ont fait l'objet que d'un petit nombre de travaux concernant principalement l'organogenèse neurale (Fujita, 1962; Kauffmann, 1968), la myogenèse (Marchok et Herrmann, 1967) et la chondrogenèse (Janners, 1968) chez le poulet ou la souris. C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude autoradiographique de la prolifération cellulaire chez les embryons et les jeunes larves de *Pleurodeles waltlii* (Amphibien, Urodèle) à divers stades du développement. Dans un premier travail (Brugal, 1971), nous avons précisé l'influence de la température sur le déroulement du cycle cellulaire et de ses phases chez des embryons âgés de pleurodèle; en outre, nous avons montré qu'il existe un rapport direct, indépendant de la température et particulier à chaque organe, entre la vitesse de développement d'un embryon et la durée, des cycles mitotiques de ses cellules. Ces résultats nous ont conduits à comparer, ici, l'activité mitotique de trois tissus aux stades voisins de l'éclosion afin de préciser, *in vivo*, les rapports entre la différenciation et la prolifération cellulaires.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La durée du cycle cellulaire et de ses phases, l'indice de marquage et l'indice mitotique ont été évalués dans la moelle épinière (niveau brachial), le télencéphale et l'épithélium gastrique chez des embryons et des jeunes larves de pleurodèle. Les comptages ont été réalisés aux stades 34, 36, 38 et 41 de la table de développement de Gallien et Durocher (1957) atteints après 15, 18, 24 et 35 jours d'élevage à la température de 17°C.

Mode opératoire. A chacun des stades étudiés, 30 animaux sont préalablement anesthésiés et lavés dans la solution opératoire stérile de Holtfreter additionnée de MS 222 à la concentration de 1 g/l. Au moyen d'une micro-aiguille de 20 à 30 μ de diamètre, 2×10^{-4} ml environ d'une solution de thymidine tritiée à la concentration de 50 μ Ci/ml (activité spécifique : 9.7 Ci/mM) sont injectés dans la cavité générale des animaux (10^{-2} μ Ci/animal) placés momentanément à sec sur une lame histologique. Après l'injection, les embryons ou les jeunes larves sont replacés dans la solution opératoire de Holtfreter d'où ils sont retirés pour être fixés à des intervalles de temps échelonnés entre 1 heure et 99 heures.

Les injections et les fixations ont été réalisées à différentes heures de la journée sans tenir compte d'éventuelles variations nycthémérales de la prolifération cellulaire.

Traitement histologique et autoradiographique. Les animaux sont fixés durant 24 heures dans le liquide de Smith, puis rincés dans l'eau distillée. Ils sont alors inclus dans la paraffine, puis débités en coupes sériées de 5 μ m d'épaisseur. Après déparaffinage, les préparations sont recouvertes de l'émulsion nucléaire Ilford L4 non diluée, puis conservées durant 45 à 65 jours, à l'abri de la lumière, à la température de 12°C. Après cette période d'exposition, les autoradiographies sont révélées et fixées selon les procédés classiques puis colorées à travers l'émulsion par le vert de méthyle et la pyronine (mélange de Pappenheim-Unna).

Méthodes de comptage. Les histo-autoradiographies obtenues nous ont permis de réaliser divers types de comptages à partir desquels sont calculés le pourcentage de mitoses marquées, l'indice mitotique et l'indice de marquage.

Les pourcentages de mitoses marquées ont été calculés après un comptage de 30 à 150 mitoses selon les tissus. Nous avons interprété comme mitose, ou phase M, la période du cycle cellulaire qui s'étend de la fin de la prophase au début de la télophase et durant laquelle

PROLIFERATION ET DIFFERENCIATION CELLULAIRES

les chromosomes sont nettement individualisés. Les courbes de variation du pourcentage de mitoses marquées en fonction du temps écoulé après l'injection permettent de calculer graphiquement la durée du cycle cellulaire et de ses phases conformément à la méthode de Quastler et Sherman (1959).

L'indice de marquage (pourcentage de cellules marquées) a été évalué après un comptage de 1000 cellules environ à l'aide d'un microscope à projection. Ce procédé conduit à une erreur de comptage d'environ 10 cellules pour 1000 cellules. Nous avons considéré comme marqués les noyaux surmontés de plus de 3 grains d'argent métallique.

L'indice mitotique (nombre de cellules en mitose pour 1000 cellules) a été évalué après un comptage d'environ 1000 cellules au moyen d'une grille oculaire. Ce procédé conduit à une erreur de comptage d'environ 20 cellules pour 1000 cellules.

RESULTATS

I. *Variation de la durée du cycle cellulaire et de ses phases au cours du développement*

Les courbes de variation du pourcentage de mitoses marquées en fonction du temps écoulé après l'injection ont été établies dans le télencéphale, la moelle épinière et l'épithélium gastrique (Fig. 1). Ces courbes permettent de calculer graphiquement la durée du cycle cellulaire et de ses phases; les résultats obtenus sont portés dans le tableau 1.

Les données du tableau 1 permettent de construire les courbes de variation de la durée du cycle cellulaire et de ses phases entre les stades 34 et 41. Les courbes obtenues dans les 3 tissus sont données dans la figure 2.

A chaque stade et dans chaque tissu, nous avons calculé la fraction du cycle cellulaire, exprimée en pourcentage du temps de génération, occupée par chaque phase. Les pourcentages obtenus sont portés dans le tableau 1. Nous avons calculé également le rapport des durées du cycle cellulaire et de ses phases entre les stades 34 et 41. Les rapports obtenus, que nous appelons coefficients de variation, sont portés dans le tableau 2.

Variation du temps de génération au cours du développement. La durée absolue du temps de génération varie comme la somme des durées des 4 phases du cycle cellulaire: elle présente un allongement général entre les stades 34 et 41 dans les trois tissus étudiés

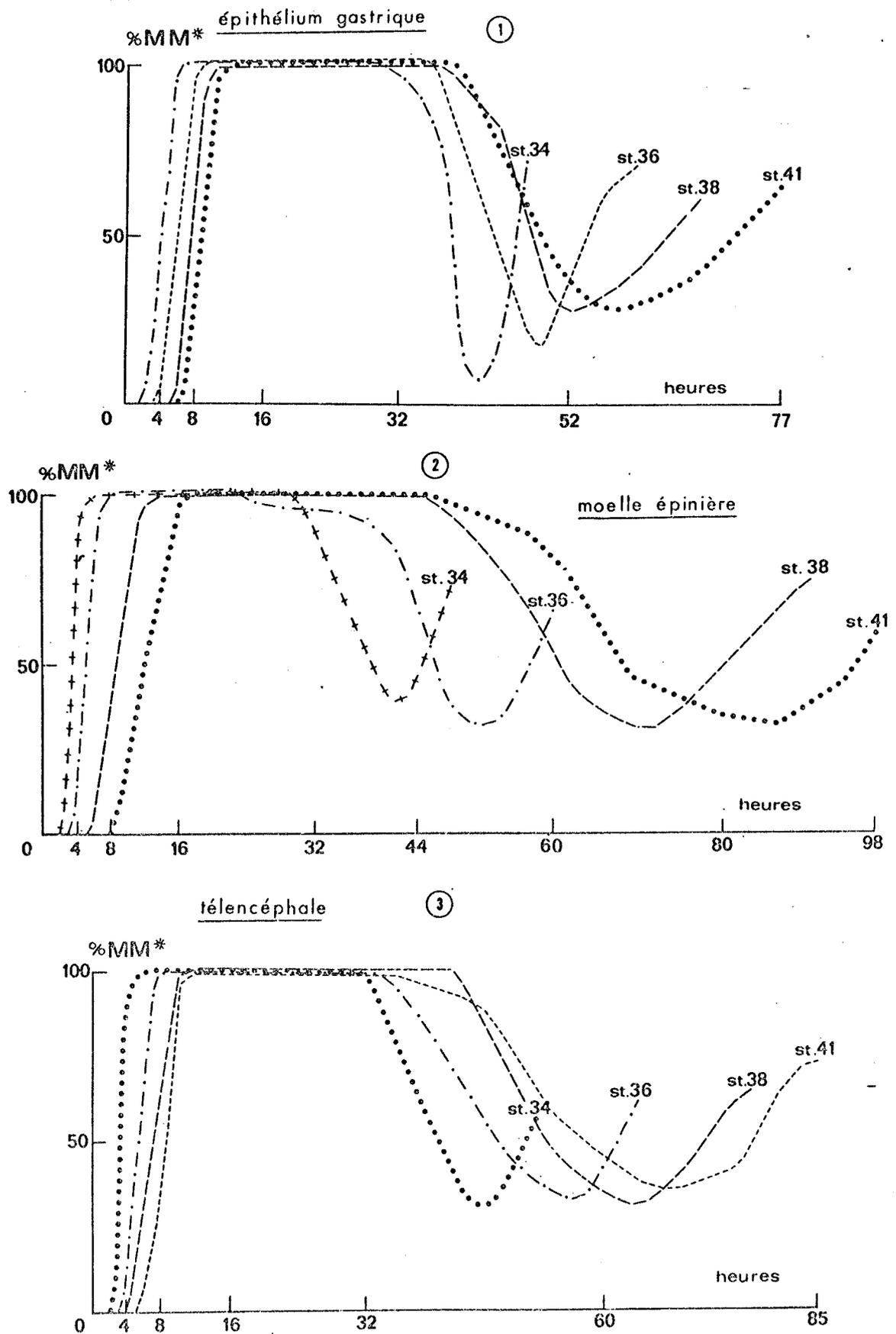


FIG. 1. Courbes de variation du pourcentage de mitoses marquées (MM*) en fonction du temps écoulé après une injection de thymidine tritiée, obtenues dans 3 tissus à différents stades chez des embryons âgés et des jeunes larves de pleurodèle élevés à 17° C.

PROLIFERATION ET DIFFERENCIATION CELLULAIRES

TABLEAU 1

DURÉE DU CYCLE CELLULAIRE ET DE SES PHASES CALCULÉES GRAPHIQUEMENT D'APRÈS LES COURBES DE VARIATION DU POURCENTAGE DE MITOSES MARQUÉES ÉTABLIES À DIFFÉRENTS STADES DANS 3 TISSUS D'EMBRYONS ÂGÉS ET DE JEUNES LARVES DE PLEURODÈLE ÉLEVÉS À LA TEMPÉRATURE DE 17°C^a

Tissus	Stades	Durée en heures				
		T	S	G ₂	M	G ₁
Télocéphale	34	48	38 (79, 2)	2 (4, 2)	4 (8, 3)	4 (8, 3)
	36	56	42 (75)	3 (5, 4)	5 (8, 9)	6 (10, 7)
	38	64	46 (70, 8)	4 (6, 2)	6 (10, 7)	8 (12, 3)
	41	69	49 (71)	5 (7, 2)	6 (8, 7)	9 (13, 1)
Moelle épinière	34	41	35 (85, 4)	2 (4, 9)	3 (7, 3)	1 (2, 4)
	36	52	41 (78, 8)	3 (5, 8)	5 (9, 6)	3 (5, 8)
	38	72	52 (72, 3)	5, 5 (7, 6)	7, 5 (10, 4)	7 (9, 7)
	41	84	56 (66, 7)	8 (9, 5)	9 (10, 7)	11 (13, 1)
Epithélium gastrique	34	42	34 (81)	2, 5 (5, 9)	4, 5 (10, 7)	1 (2, 4)
	36	48	37 (77, 1)	3, 5 (7, 3)	5 (10, 4)	2, 5 (5, 2)
	38	56	40 (71, 5)	5 (8, 9)	5, 5 (9, 8)	5, 5 (9, 8)
	41	63	40 (63, 3)	6 (9, 5)	5 (7, 9)	11 (17, 3)

^a Les fractions du cycle cellulaire (exprimées en pourcentage du temps de génération) occupées par chaque phase sont portées entre parenthèses.

TABLEAU 2

COEFFICIENTS DE VARIATION DE LA DURÉE DU CYCLE CELLULAIRE ET DE SES PHASES ENTRE LES STADES 34 ET 41, DANS TROIS TISSUS D'EMBRYONS ET DE JEUNES LARVES DE PLEURODÈLE ÉLEVÉS À LA TEMPÉRATURE DE 17°C

Tissus	Coefficient de variation entre les stades 34 et 41				
	T	S	G ₂	M	G ₁
Télocéphale	1,44	1,29	2,5	1,5	2,25
Moelle épinière	2,05	1,6	4	3	11
Epithélium gastrique	1,5	1,18	2,4	1,11	11

(Tableau 1). Cet allongement devient de moins en moins important au cours du développement (Fig. 2).

Le coefficient de variation du temps de génération est plus élevé dans la moelle épinière que dans l'épithélium gastrique et plus dans ce dernier que dans le télencéphale (Tableau 2).

La vitesse de multiplication des cellules est inversement proportionnelle au temps de génération ; nous l'avons exprimée par le nombre de divisions subies par une cellule en 100 heures. Les résultats obtenus sont portés dans le tableau 3. Les courbes de variation de la vitesse de multiplication cellulaire entre les stades 34 et 41 sont données dans la figure 3 ; elles montrent que, dans les trois tissus, le

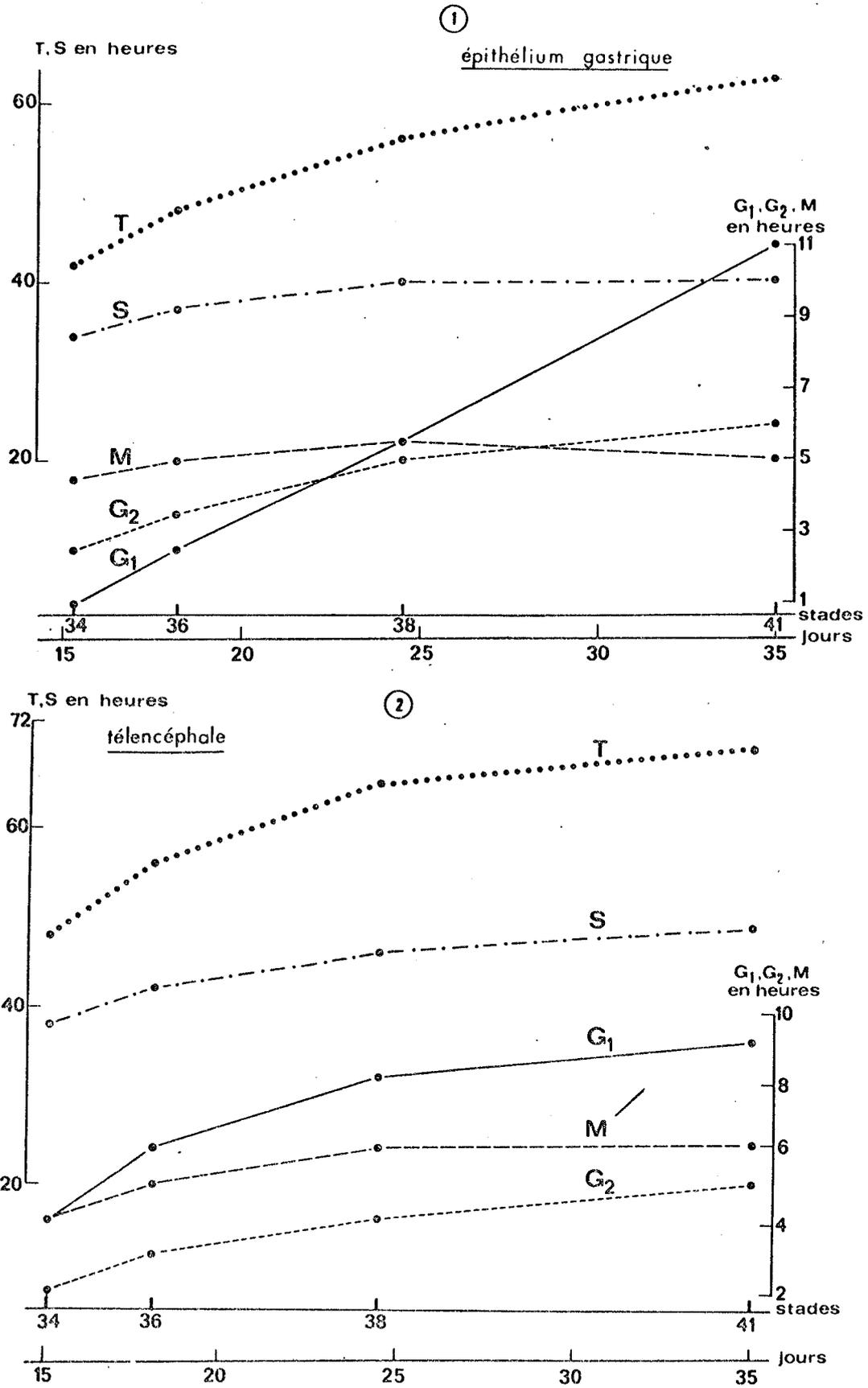


FIG. 2. Courbes de variation de la durée du cycle cellulaire (T) et de ses phases entre les stades 34 et 41, obtenues dans trois tissus d'embryons âgés et de jeunes larves de pleurodèle élevés à 17°C. L'échelle des ordonnées est 4 fois plus petite pour S et T (à gauche) que pour G₁, G₂ et M (à droite).

PROLIFERATION ET DIFFERENCIATION CELLULAIRES

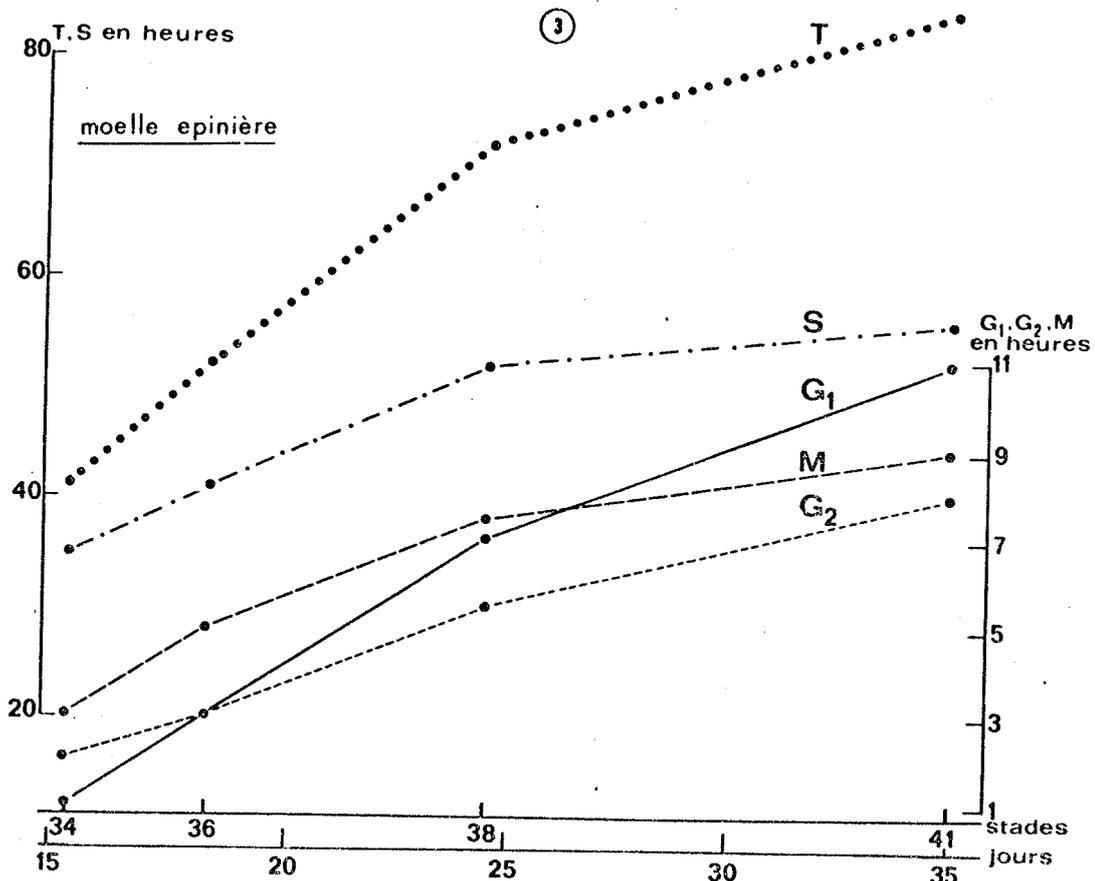


TABLEAU 3
VITESSE DE MULTIPLICATION DES CELLULES, EXPRIMÉE PAR LE NOMBRE
DE DIVISIONS EN 100 HEURES CALCULÉE DANS 3 TISSUS D'EMBRYONS
ET DE JEUNES LARVES DE PLEURODÈLE ÉLEVÉS À LA
TEMPÉRATURE DE 17°C

Tissus	Télocéphale				Moelle épinière				Epithélium gastrique			
Stades	34	36	38	41	34	36	38	41	34	36	38	41
$V = 100/T$	2,08	1,79	1,56	1,45	2,44	1,92	1,39	1,19	2,38	2,08	1,79	1,59

rythme mitotique décroît de façon importante dans l'intervalle de temps considéré.

Variation de la durée de la phase S au cours du développement.
La durée absolue de la phase S augmente dans les trois tissus entre les stades 34 et 41 (Tableau 1). A un allongement rapide, entre les stades 34 et 36, succède une augmentation plus lente entre les stades 36 et 38. Entre les stades 38 et 41 la durée de la phase S n'augmente plus que lentement dans le télencéphale et la moelle épinière, mais paraît constante dans l'épithélium gastrique (Fig. 2).

Dans les trois tissus étudiés, la fraction du cycle cellulaire occu-

BRUGAL

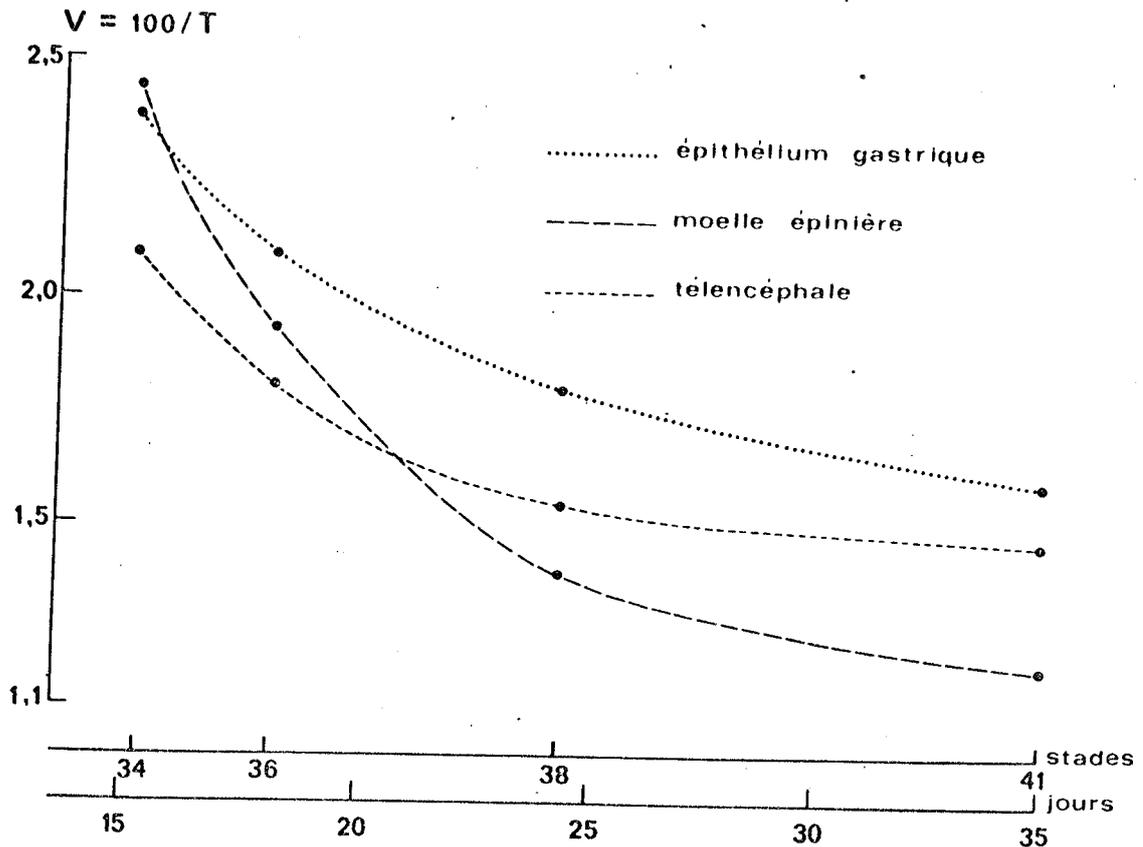


FIG. 3. Courbes de variation de la vitesse de multiplication entre les stades 34 et 41, obtenues dans 3 tissus chez des embryons âgés et des jeunes larves de pleurodèle élevés à 17°C. La vitesse de multiplication (V) traduit le nombre de divisions que subirait une cellule en 100 heures; elle est inversement proportionnelle au temps de génération (T) et exprimée par le rapport $V = 100/T$.

pée par la phase S décroît au cours du développement (Tableau 1). Cette décroissance qui est de l'ordre de 8% dans le télencéphale atteint 18% environ dans la moelle épinière et l'épithélium gastrique.

Le coefficient de variation de la durée de la phase S est plus élevé dans la moelle épinière que dans le télencéphale et plus dans celui-ci que dans l'épithélium gastrique (Tableau 2).

Variation de la durée des phases G_2 et M au cours du développement. La durée absolue des phases G_2 et M augmente dans les trois tissus, entre les stades 34 et 41. L'allongement remarquable de ces phases entre les stades 34 et 36 s'atténue rapidement entre les stades 36 et 38. Entre les stades 38 et 41, la phase M continue à s'allonger dans la moelle épinière, paraît constante dans le télencéphale et diminue dans l'épithélium gastrique. Dans cet intervalle de temps, la phase G_2 poursuit son allongement dans les trois tissus, mais de façon moins accentuée.

PROLIFERATION ET DIFFERENCIATION CELLULAIRES

La fraction du cycle cellulaire occupée par la phase G_2 augmente régulièrement avec l'âge des embryons dans les trois tissus étudiés; cette augmentation est plus importante dans la moelle épinière que dans l'épithélium gastrique et plus dans ce dernier que dans le télencéphale. En revanche, la fraction du cycle cellulaire occupée par la phase M décroît dans l'épithélium gastrique, croît dans la moelle épinière et varie de façon irrégulière dans le télencéphale lorsque les embryons passent du stade 34 au stade 41 (Tableau 1).

Le Tableau 2 permet de comparer la variation relative de la durée des phases G_2 et M des trois tissus. Il montre en particulier que, dans le cas de la moelle épinière, la durée de la phase G_2 quadruple et celle de la phase M triple dans l'intervalle de temps considéré. Comme dans le cas de la phase S, le coefficient de variation de ces deux phases est plus important dans la moelle épinière que dans le télencéphale; il est le plus faible dans l'épithélium gastrique.

Variation de la durée de la phase G_1 au cours du développement. Dans les trois tissus étudiés, la durée absolue de la phase G_1 augmente de façon importante entre les stades 34 et 41 (Tableau 1). Alors que cette augmentation est proportionnelle au temps dans l'épithélium gastrique, elle devient moins rapide dès le stade 36 dans le télencéphale, et dès le stade 38 dans la moelle épinière. Dans l'intervalle de temps choisi, la phase G_1 s'allonge de 5 heures dans le télencéphale et de 10 heures dans la moelle épinière et l'épithélium gastrique (Fig. 2).

La fraction du cycle cellulaire occupée par la phase G_1 augmente régulièrement avec l'âge des animaux (Tableau 1): son accroissement est plus important dans l'épithélium gastrique que dans la moelle épinière et plus dans cette dernière que dans le télencéphale.

Le tableau 2 montre que le coefficient de variation de la durée de la phase G_1 est environ 5 fois plus élevé dans l'épithélium gastrique et la moelle épinière que dans le télencéphale.

II. *Variation de l'indice de marquage, de l'indice mitotique et du coefficient de prolifération au cours du développement*

Nous avons évalué dans le télencéphale, la moelle épinière et l'épithélium gastrique, l'indice de marquage et l'indice mitotique une heure après l'injection, aux stades 34, 36, 38 et 41. Les résultats obtenus sont portés dans le tableau 4.

Nous avons montré précédemment (Brugal et Chibon, 1970; Brugal et Bertrandias, 1970) que les tissus embryonnaires de pleurodèle

BRUGAL

peuvent être considérés, en première approximation, comme des populations cellulaires en croissance exponentielle dont le nombre de cellules peut être évalué à chaque instant par la relation:

$$N(t) = N(0) \cdot (P + 1)^{t/T} \quad (1)$$

dans laquelle:

$$\begin{aligned} N(t) &= \text{nombre de cellules au temps } t, \\ N(0) &= \text{nombre de cellules au temps } t = 0, \\ P &= \text{coefficient de prolifération,} \\ T &= \text{temps de génération.} \end{aligned}$$

Dans de telles populations, l'indice de marquage et l'indice mitotique théoriques sont définis par les relations:

$$IL = S/T \cdot \log(P + 1) \left[1 + \frac{M + G_2 + S/2}{T} \right] \quad (2)$$

$$IM = M/T \cdot \log(P + 1) \quad (3)$$

Connaissant à la fois l'indice mitotique, ou l'indice de marquage, la durée des cycles cellulaires et celle des phases S, G₂ et M, les relations (2) et (3) nous ont permis de calculer à chaque stade et dans chaque tissu les valeurs du coefficient de prolifération (P). Les résultats obtenus sont portés dans le tableau 4.

TABLEAU 4
VALEURS DU COEFFICIENT DE PROLIFÉRATION (P), DÉDUITES DE L'INDICE
DE MARQUAGE ET DE L'INDICE MITOTIQUE, OBTENUES DANS TROIS
TISSUS D'EMBRYONS ET DE JEUNES LARVES DE PLEURODÈLE

Tissus	Stades	IL%	IM‰ ₀₀	P%	
				déduit de IL	déduit de IM
Téleencéphale	34	27, 7	25, 2	35	35
	36	21, 3	23, 6	28	30
	38	15, 7	24, 4	22	23
	41	14, 1	17	20	22
Moelle épinière	34	47, 6	35, 1	57	61
	36	35, 2	36, 1	44	46
	38	23, 1	31, 6	32	35
	41	18, 7	28, 7	28	31
Epithélium gastrique	34	57, 1	61, 1	71	77
	36	41, 3	46, 2	54	56
	38	22, 9	27, 6	32	32
	41	13, 9	16, 5	22	23

PROLIFERATION ET DIFFERENCIATION CELLULAIRES

La comparaison des données du tableau 4 fait apparaître que les valeurs du coefficient de prolifération déduites de l'indice de marquage et de l'indice mitotique sont en bon accord; cependant, les premières sont inférieures aux secondes de 3% à 6% environ. Nous avons montré précédemment (Brugal et Bertrandias, 1970) que cette différence est principalement due à ce que l'indice de marquage qui, dans une première période, décroît rapidement en raison de la prolifération de cellules non marquées, est inférieur, dès une heure après l'injection, à la proportion réelle de cellules en phase S.

Les courbes de la figure 4 traduisent la variation du coefficient de prolifération entre les stades 34 et 41 dans les trois tissus étudiés: elles montrent que dans tous les cas la proportion de cellules en activité mitotique diminue rapidement au cours du développement. La diminution du coefficient de prolifération est particulièrement forte dans la moelle épinière et l'épithélium gastrique entre les stades 34 et 38; par contre elle est relativement faible dans le télencéphale.

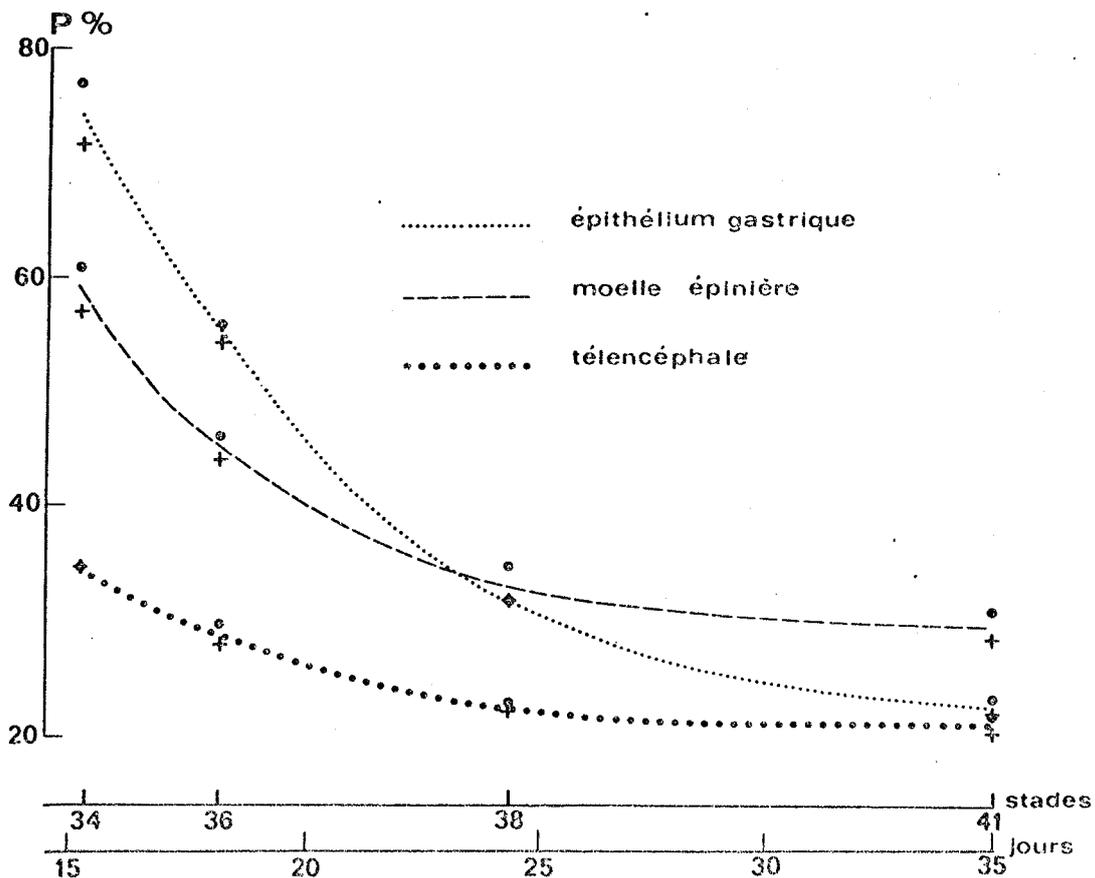


FIG. 4. Courbes de variation du coefficient de prolifération (P) entre les stades 34 et 41, obtenues dans 3 tissus d'embryons âgés et de jeunes larves de pleurodèle. Les valeurs de P sont déduites de l'indice de marquage (+) et de l'indice mitotique (⊙).

PROLIFERATION ET DIFFERENCIATION CELLULAIRES

Alors que les valeurs du coefficient de prolifération diffèrent beaucoup selon les tissus au stade 34, elles diffèrent peu et sont comprises entre 20% et 30% au stade 41.

III. *Histogenèse des tissus étudiés entre les stades 34 et 41*

Pour compléter les résultats que nous avons rapportés, il est intéressant d'observer l'histogenèse des trois tissus considérés, afin de mettre en évidence d'éventuelles relations entre les variations de la prolifération au cours des stades étudiés et les progrès de la différenciation.

L'épithélium gastrique présente (Fig. 5), au stade 34, un aspect pseudostratifié. Les hautes cellules épithéliales renferment de nombreuses plaquettes vitellines. Aucune ébauche glandulaire ne s'observe à ce stade. Après l'éclosion, qui a lieu au stade 35, les plaquettes vitellines disparaissent rapidement.

Au stade 36 l'épithélium gastrique est cylindrique et tapissé d'un mince liseré de mucine. Dès ce stade il présente des invaginations encore peu nombreuses qui préfigurent les infundibula.

Vers le stade 37 les jeunes larves commencent à se nourrir; les cellules épithéliales deviennent plus colorables et présentent dès le stade 38 un cytoplasme apical clair et finement granuleux; leur noyau est repoussé vers la membrane basale. Elles ont alors l'aspect de cellules mucipares fermées fonctionnelles. De nombreux infundibula sont apparus et se prolongent, dans le chorion encore lâche, par des glandes tubulaires peu différenciées formées de cellules cubiques à cytoplasme clair.

Entre les stades 38 et 41, l'histogenèse de l'épithélium gastrique n'est marquée que par l'allongement des glandes tubulaires et l'épaississement de la couche de mucine.

L'histogenèse du télocéphale (Fig. 6) est caractérisée, entre les stades 34 et 41, par l'épaississement progressif de la substance blanche qui témoigne de l'augmentation du nombre de fibres nerveuses et par conséquent du nombre de neurones différenciés.

Dès le stade 38, trois couches concentriques s'individualisent. Celle qui borde la lumière ventriculaire est formée de 3 ou 4 assises de cellules aux noyaux allongés et très chromophiles. Ce n'est qu'au niveau de cette zone que se rencontrent les figures mitotiques. La couche moyenne, ou substance grise, est constituée de noyaux sphériques peu colorés. La couche externe, ou substance blanche, comprend un feutrage de fibres nerveuses qui enserre quelques rares noyaux.

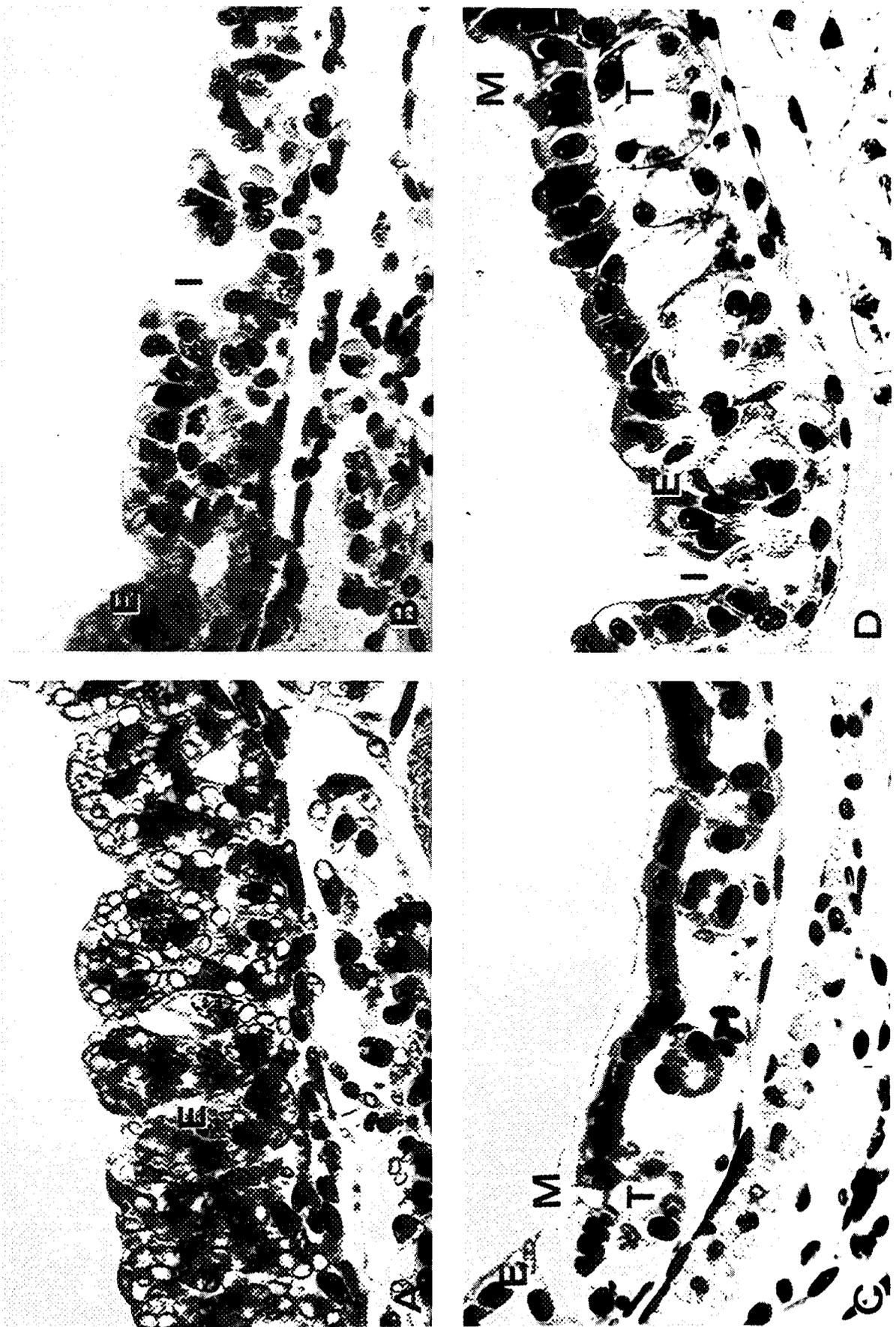


FIG. 5. Aspect histologique de l'épithélium gastrique d'embryons et de jeunes larves de pleurodèle. (A) Stade 34. (B) Stade 36. (C) Stade 38. (D) Stade 41. *M*: mucine; *E*: épithélium; *I*: infundibulum; *T*: glande gastrique tubulaire. $\times 240$.

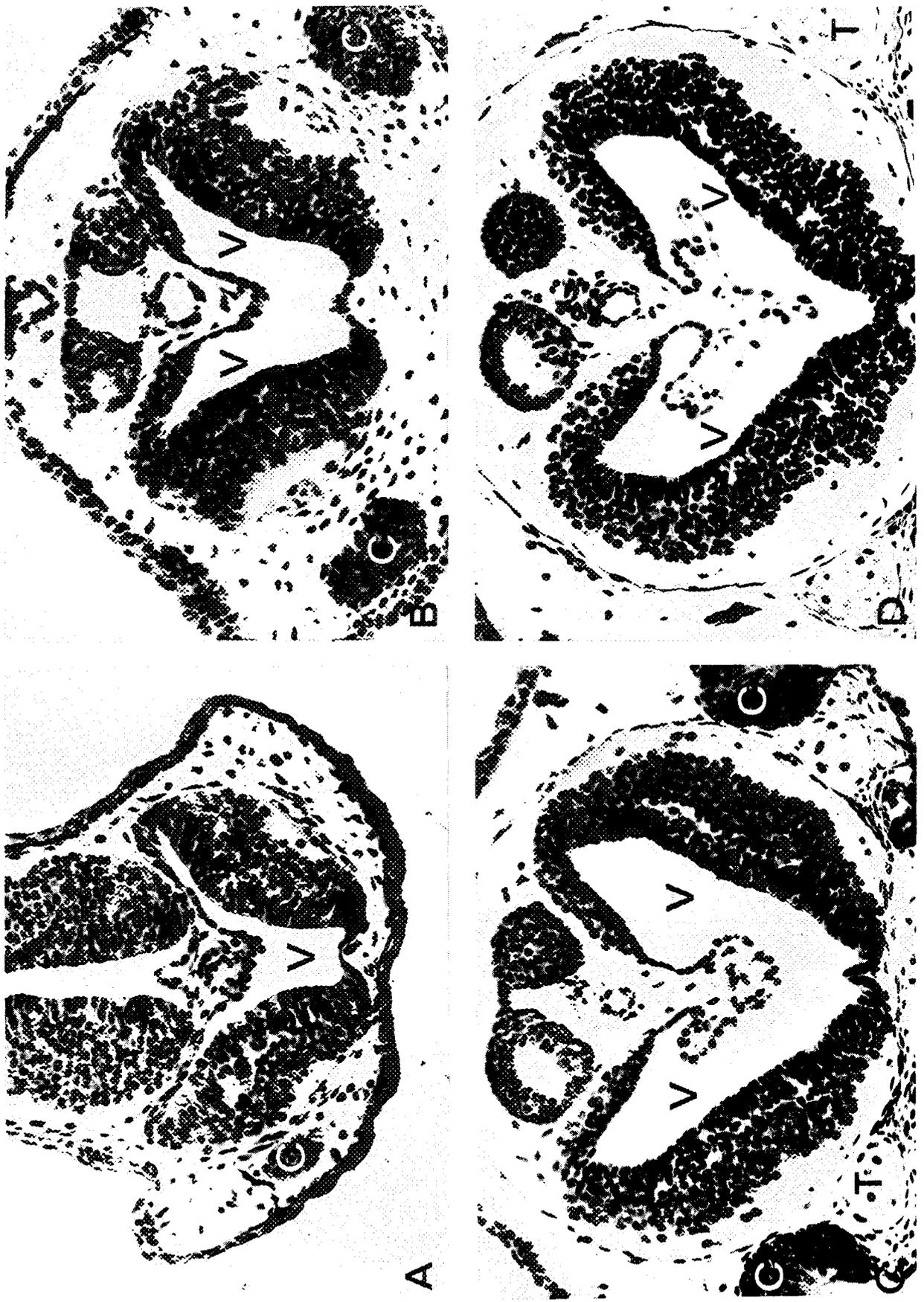


FIG. 6. Aspect histologique du télencéphale d'embryons et de jeunes larves de pleurodèle. (A) Stade 34. (B) Stade 36. (C) Stade 38. (D) Stade 41. V: ventricules télencéphaliques, T: trabécules, C: choanes. $\times 80$.

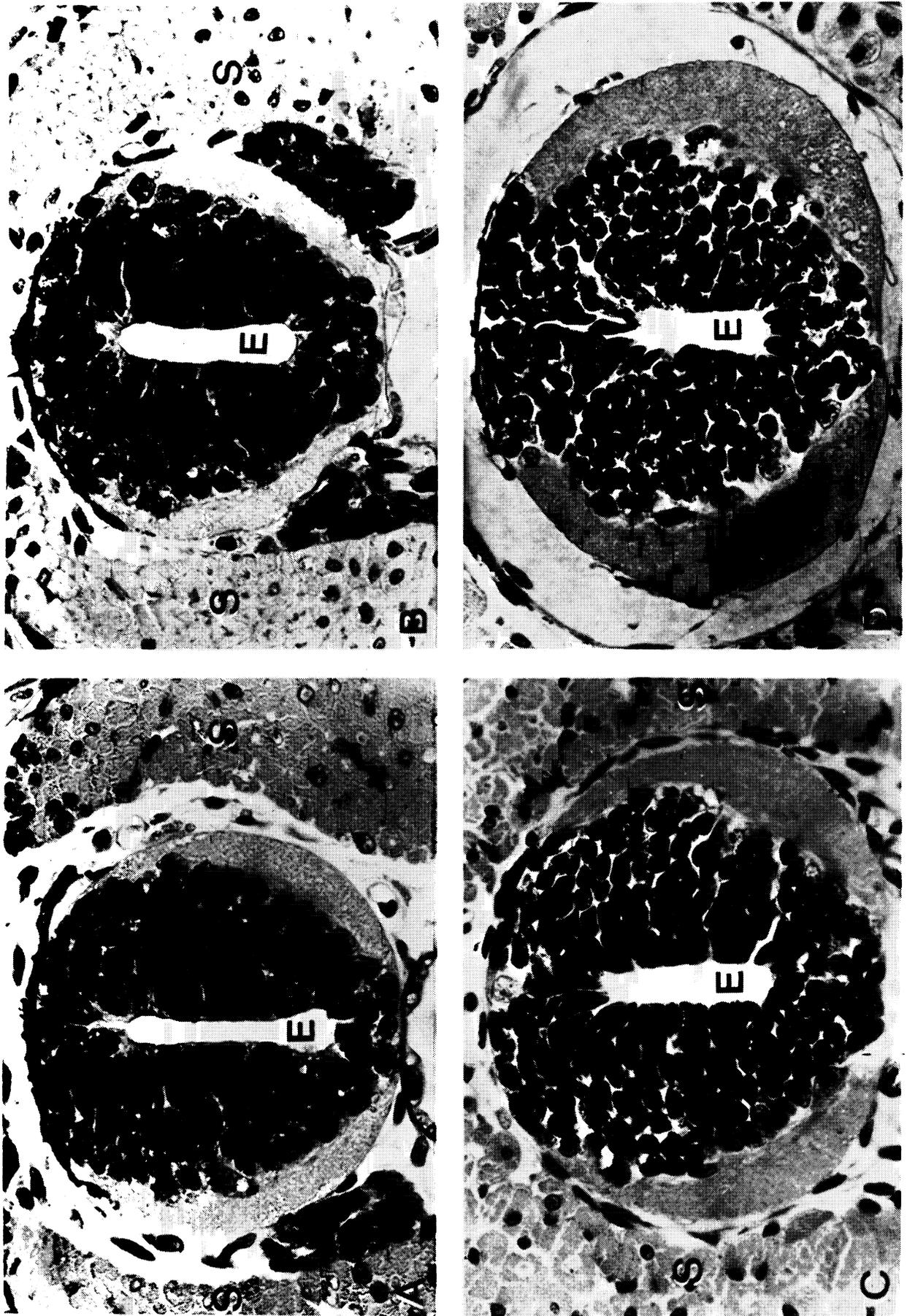


FIG. 7. Aspect histologique de la moelle épinière d'embryons et de jeunes larves de pleurodele. (A) Stade 34. (B) Stade 36. (C) Stade 38. (D) Stade 41. *E*: Canal de l'épendyme, *S*: somites. $\times 200$.

BRUGAL

L'histogenèse de la moelle épinière, au niveau brachial (Fig. 7), se caractérise entre les stades 34 et 41 par un important épaissement de la substance blanche. Le canal de l'épendyme devient de plus en plus petit par suite de l'augmentation du nombre des cellules au niveau des plaques dorsale et ventrale.

On constate donc dans ces trois tissus un progrès remarquable de la différenciation histologique entre les stades 34 et 41, mais selon des modalités particulières à chacun d'eux: c'est ainsi que le télencéphale est au stade 34 celui des trois tissus qui présente la différenciation histologique la plus avancée, tandis que l'épithélium gastrique présente la différenciation la plus tardive.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats que nous avons obtenus mettent en évidence d'importantes modifications qualitatives et quantitatives de la prolifération cellulaire entre les stades 34 et 41.

—Les modifications qualitatives consistent en une variation différentielle des durées absolues et relatives des phases du cycle cellulaire au cours du développement;

—Les variations quantitatives sont représentées par les variations du taux (P) et de la vitesse (V) de prolifération cellulaire.

I. *Modifications qualitatives de la prolifération au cours du développement*

L'allongement important de la phase G_1 et, à un moindre degré, celui de la phase G_2 au cours du développement, sont les faits principaux qu'il faut, semble-t-il, mettre en relation avec la différenciation des cellules épithéliales de l'estomac en cellules mucipares, et des neuroblastes de la moelle épinière en neurones fonctionnels. Quant au télencéphale dont les neuroblastes sont caractérisés au stade 34 par une phase G_1 4 fois plus longue que celle des cellules des deux autres tissus, il faut noter que le coefficient de variation de la durée de la phase G_1 dans l'intervalle de temps considéré est moins important que celui de la phase G_2 . Ces particularités sont à mettre en relation avec le fait que cet organe présente dès le stade 34 une différenciation plus accentuée que les deux autres tissus étudiés.

L'augmentation régulière de la durée absolue et relative de la phase G_1 des cellules en voie de différenciation conduit à penser que cette phase représente une période du cycle cellulaire pendant laquelle s'édifient les protéines structurales et fonctionnelles spécifiques de chaque tissu. On sait en effet que la phase G_1 est très

PROLIFERATION ET DIFFERENCIATION CELLULAIRES

courte ou absente dans les cellules qui se divisent rapidement telles que les cellules méristématiques des végétaux (Clowes, 1965), les cellules tumorales (Defendi et Manson, 1961; Baserga, 1963; Kissel et coll., 1966) ou les blastomères d'embryons en segmentation (Hinegardner et coll., 1964; Graham et Morgan, 1966). En revanche, elle s'allonge de façon importante au cours du développement précoce des Amphibiens (Graham et Morgan, 1966) de même qu'au cours de l'histogenèse du tube neural de la souris (Kauffmann, 1968) ou des muscles de la patte du poulet (Marchok et Herrmann, 1967).

Comme dans le cas de la phase G_1 , la phase G_2 , qui s'allonge régulièrement dans les cellules en cours de différenciation et occupe une place grandissante au sein du cycle cellulaire, apparaît comme une période d'activités synthétiques spécialisées. De même que la phase G_1 , elle est généralement brève ou absente dans les cellules embryonnaires indifférenciées qui prolifèrent rapidement, et elle s'allonge de façon remarquable dans les cellules qui se différencient ainsi que l'ont montré Starkey (1963) dans les adamantoblastes du jeune lapin et Graham et Morgan (1966) dans les blastomères de l'embryon de xénope.

Enfin, les phases S et M sont celles qui s'allongent le moins entre les stades 34 et 41 dans les trois tissus étudiés. Dans l'épithélium gastrique, la durée de la phase S est constante entre les stades 38 et 41 tandis que, dans le même intervalle de temps, la durée de la mitose diminue.

Bien que les durées absolues des phases S et M augmentent dans les trois tissus entre les stades 34 et 41, la durée relative de la phase S diminue régulièrement et celle de la phase M varie de façon irrégulière: de ce fait, l'allongement de ces deux phases ne semble pas lié directement aux activités cellulaires de synthèse responsables de la différenciation.

II. Modifications quantitatives de la prolifération au cours du développement

La proportion de cellules en activité mitotique et leur vitesse de multiplication diminuent dans les trois tissus étudiés entre les stades 34 et 41.

L'épithélium gastrique qui, au stade 34, apparaît peu différencié est caractérisé par un coefficient de prolifération élevé (71% à 77%). La différenciation rapide de ce tissu, entre les stades 34 et 38, s'accompagne d'une chute importante du coefficient de prolifération qui traduit un arrêt de l'activité mitotique des trois quarts des cell-

BRUGAL

ules de l'épithélium. Entre les stades 38 et 41, l'histogenèse peu importante ne s'accompagne que d'une faible diminution du coefficient de prolifération. Dans l'intervalle de temps étudié, la vitesse de multiplication des cellules de l'épithélium gastrique décroît moins que dans les deux tissus nerveux et reste relativement élevée.

Le stade de la prise de nourriture représente une étape importante de l'histogenèse de l'épithélium gastrique. En effet, dès le stade 38 la différenciation est presque achevée, les cellules en activité mitotique sont en faible proportion, mais continuent à se diviser rapidement et leur phase M devient plus courte alors que leur phase S reste constante. Ces particularités nous ont conduits à penser qu'une sous-population de cellules épithéliales conservant des caractères mitotiques de cellules embryonnaires commence à s'individualiser dès le stade 38 dans ce tissu; elle assurerait le renouvellement cellulaire après le stade de la prise de nourriture. Néanmoins nous n'avons observé aucune localisation particulière des figures mitotiques, même au stade 41.

Dans le télencéphale au stade 34, le coefficient de prolifération est plus faible que dans les deux autres tissus et diminue peu au cours du développement. Le fait que les deux tiers environ des cellules de cet organe ont cessé de se diviser avant le stade de l'éclosion est probablement lié à sa différenciation précoce qui lui confère, dès le stade 34, l'aspect histologique d'un tissu nerveux fonctionnel.

Au niveau brachial de la moelle épinière, l'important développement de la substance blanche, particulièrement entre les stades 34 et 38, s'accompagne d'une diminution du coefficient de prolifération et de la vitesse de multiplication des cellules. Entre les stades 34 et 41, l'histogenèse comme la diminution des paramètres P et V est peu accentuée.

Les résultats obtenus montrent que la diminution du taux (P) et de la vitesse (V) de la prolifération d'une part, et le progrès de la différenciation histologique d'autre part, sont simultanés dans le télencéphale, la moelle épinière et l'épithélium gastrique chez les embryons âgés et les jeunes larves de pleurodèle. Au contraire, le ralentissement de la prolifération des cellules précède leur différenciation dans le cas de la myogenèse (Marchok et Hermann, 1967) et de la chondrogenèse (Janners, 1968) chez l'embryon de poulet. Une telle différence entre les travaux antérieurs et les résultats que nous avons obtenus, concernant les relations chronologiques entre les variations de la prolifération et l'acquisition de l'état différencié,

PROLIFERATION ET DIFFERENCIATION CELLULAIRES

est probablement liée aux caractères spécifiques et à la nature des tissus étudiés.

Il convient en effet de remarquer que les critères de la différenciation qui ont été retenus dans les travaux précédents (apparition de la myosine ou de la matrice cartilagineuse), comme ceux que nous avons choisis dans le présent travail (apparition de la mucine gastrique par exemple), ne sont en réalité que des manifestations plus ou moins tardives de la spécialisation des cellules. En effet, l'apparition des protéines structurales et fonctionnelles n'est que la conséquence de l'acquisition préalable d'enzymes particulières nécessaires à la différenciation de chaque cellule et de chaque tissu. C'est l'augmentation du taux de ces enzymes qui représente le critère initial et fondamental de la différenciation et qui devrait être mis en relation avec le ralentissement de la prolifération afin de préciser, au niveau cellulaire, les liens chronologiques, physiologiques et génétiques éventuels entre la perte des capacités mitotiques et l'établissement de la différenciation. De tels travaux qui nécessiteraient des études biochimiques, histoenzymologiques et autoradiographiques précises et simultanées sont difficilement réalisables *in vivo* et, à notre connaissance, n'ont pas été publiés.

III. Conclusion

Dans le télencéphale, la moelle épinière et l'épithélium gastrique, l'histogenèse s'accompagne d'importantes modifications de la prolifération cellulaire. Les cellules en voie de différenciation se divisent de moins en moins rapidement et une proportion de plus en plus grande d'entre elles cesse toute activité mitotique. La phase G_0 dans laquelle sont bloquées les cellules qui ont cessé de se diviser peut être comprise comme une phase G_1 indéfiniment prolongée. C'est en effet cette phase G_1 qui, en s'allongeant d'une façon remarquable au cours du développement semble représenter la principale période du cycle cellulaire pendant laquelle sont synthétisées les protéines structurales et fonctionnelles spécifiques.

Alors qu'au stade 34 les tissus embryonnaires étudiés présentent des états de différenciation et des coefficients de prolifération très différents, ils acquièrent tous à partir du stade 38 l'aspect histologique de tissus fonctionnels, et leurs coefficients de prolifération tendent vers une valeur comprise entre 20% et 30%.

Les résultats obtenus montrent que, dans l'espèce étudiée, la proportion des cellules en activité mitotique et la durée relative de leur

BRUGAL

phase G_1 , sont des paramètres représentatifs de l'état de différenciation des tissus: le coefficient de prolifération d'un tissu est d'autant plus faible et la durée relative de la phase G_1 de ses cellules d'autant plus longue, à chaque stade du développement, qu'il est plus différencié.

RÉSUMÉ

L'étude autoradiographique de l'activité mitotique chez les embryons et les jeunes larves de pleurodèle aux stades voisins de l'éclosion, révèle d'importantes modifications qualitatives et quantitatives de la prolifération cellulaire au cours du développement. Les modifications qualitatives consistent principalement en un allongement important de la durée de la phase G_1 , et à un moindre degré de la phase G_2 . La phase G_1 , qui occupe une place grandissante dans le cycle cellulaire à mesure que la différenciation s'accroît, semble représenter la période du cycle mitotique durant laquelle sont synthétisées les protéines structurales et fonctionnelles particulières à chaque tissu. Les modifications quantitatives consistent en une diminution rapide du coefficient de prolifération et de la vitesse de multiplication des cellules au cours du développement. Il est donc probable que les cellules en cours de différenciation se divisent de plus en plus lentement, puis cessent toute activité mitotique pour entrer dans une phase de maturité, dite G_0 , qui pourrait être comprise comme une phase G_1 indéfiniment prolongée.

SUMMARY

Autoradiographic studies of mitotic activity in pleurodeles embryos and young larvae ranging from stage 34 to 41, close to hatching time, revealed important qualitative and quantitative modifications of cell proliferation during development. Qualitative changes are primarily a lengthening of G_1 phase and G_2 phase durations; however G_2 phase is lengthened in a lesser degree than G_1 phase. As differentiation takes place, G_1 phase becomes more and more time-consuming in the cell life cycle, and corresponds likely to the tissue-specific structural and functional proteins synthesizing time of the cell. Quantitative changes are expressed, during development, as a rapid decrease of both growth fraction and cell multiplication rate. We have reasons to believe that cells in the course of their differentiation, divide more and more slowly, then stop their mitotic activity,

PROLIFERATION ET DIFFERENCIATION CELLULAIRES

and get into a maturity phase called G_0 which could be interpreted as an indefinitely prolonged G_1 phase.

REFERENCES

- BASERGA, R. A. (1963). Mitotic cycle of ascites tumor cells. *Arch. Pathol.* **75**, 156-161.
- BRUGAL, G. (1971). Etude autoradiographique de l'influence de la température sur la prolifération cellulaire chez les embryons âgés de *Pleurodeles waltlii* Michah (Amphibien, Urodèle). *Wilhelm Roux'Archiv* **168**:205-225 (1971)
- BRUGAL, G., et BERTRANDIAS, J.-P. (1970). Méthode mathématique d'évaluation du coefficient de prolifération dans les populations cellulaires embryonnaires en croissance exponentielle, *C. R. Acad. Sci. Ser. D.* **270**, 1603-1606.
- BRUGAL, G., et CHIBON, P. (1970). Signification des variations périodiques de l'indice de marquage en fonction du temps dans les tissus embryonnaires. *C. R. Acad. Sci. Ser. D* **270**, 998-1001.
- CLOWES, F. A. (1965). The duration of the G_1 phase of the mitotic cycle and its relation to radiosensitivity. *New Pathol.* **64**, 355-359.
- DEFENDI, V., et MANSON, L. A. (1961). Studies on the relationships of DNA synthesis time to proliferative time in cultured mammalian cells. *Pathol. Biol.* **9**, 525-528.
- FUJITA, S. (1962). Kinetics of cellular proliferation. *Exp. Cell Res.* **28**, 52-60.
- GALLIEN, L., et DUROCHER, M. (1957). Table chronologique du développement de *Pleurodeles waltlii*. *Bull. Biol. Fr. Belg.* **91**, 97-114.
- GRAHAM, C. F., et MORGAN, R. W. (1966). Changes in the cell cycle during early amphibian development. *Develop. Biol.* **14**, 439-460.
- GRASSO, J. A., et WOODWARD, J. W. (1967). DNA synthesis and mitosis in erythropoietic cells. *J. Cell Biol.* **33**, 645-649.
- HINEGARDNER, R. T., RAO, B., et FELDMAN, D. E. (1964). The DNA synthetic period during early development in the sea urchin egg. *Exp. Cell Res.* **36**, 53-61.
- JANNERS, M. N. Y. (1968). An autoradiographic study of the growth rate of the embryonic chick wing bud. Thesis Ph.D., Univ. of Virginia.
- KAUFFMANN, S. L. (1968). Lengthening of the generation cycle during embryonic differentiation of the mouse neural tube. *Exp. Cell Res.* **48**, 420-424.
- KISSEL, P., DUPREZ, A., BESSOT, M., SCHMITT, J., et DOLLANDER, A. (1966). Autoradiography *in vivo* of human cancers. *Nature (London)*, **210**, 274-276.
- MARCHOK, A. C., et HERRMANN, H. (1967). Studies of muscle development. I. Changes in cell proliferation. *Develop. Biol.* **15**, 129-155.
- OKAZAKI, K., et HOLTZER, H. (1965). An analysis of myogenesis *in vitro* using fluorescein labeled antimyosin. *J. Histochem. Cytochem.* **13**, 726-739.
- QUASTLER, H., et SHERMAN, F. G. (1959). Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.* **17**, 420-438.
- STARKEY, W. E. (1963). The migration and renewal of tritium labeled cells in the developing enamel organ of rabbits. *J. Brit. Dental Ass.* **115**, 143-163.
- STOCKDALE, F. F., et HOLTZER, H. (1961). DNA synthesis and myogenesis. *Exp. Cell Res.* **24**, 508-520.

CHAPITRE - III -

EFFETS DE LA TEMPÉRATURE SUR LA CINÉTIQUE DE PROLIFÉRATION CELLULAIRE
DE L'EMBRYON

" Etude autoradiographique de l'influence de la température sur la prolifération cellulaire chez les embryons âgés de Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibien, Urodèle) "

Étude autoradiographique de l'influence de la température sur la prolifération cellulaire chez les embryons âgés de *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien, Urodèle)

G. BRUGAL

Laboratoire de Zoologie, Institut de Recherches Biologiques, Université Scientifique et Médicale de Grenoble

Reçu le 1 Mars 1971

Autoradiographic Study of the Effect of Temperature on Cellular Proliferation in Late Embryos of *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibia, Urodela)

Summary. We observed in *Pleurodeles* embryos, stage 34, that the duration of the cell cycle and its phases was approximately the same for every tissue but was easily modified by varying the temperature. The generation time and the duration of S phase in embryos submitted to a 12°C temperature instead of 26°C are tripled or quadrupled. A temperature rise produced a proportionate shortening in G_2 and M phases and a lengthening in G_1 phase. This G_1 phase is not detectable at 12°C but represent a $\frac{1}{4}$ of the total generation time at 26°C. The more differentiated the cells are, the longer is the G_1 time. The cell population studied during these experiments are growing exponentially. Growth fraction, which represents the exponential growth basis, is temperature independent but has a tissue specificity. This growth fraction is smaller the more the tissue is differentiated. However, the relative rate of cell division, inversely proportional to the generation time, is temperature dependent and appears to control the embryo's relative rate of growth under different temperatures.

Résumé. Chez l'embryon de Pleurodèle au stade 34, la durée du cycle cellulaire et de ses phases varie peu selon les tissus mais dépend étroitement de la température. Le temps de génération et la durée de la phase S sont environ 3 ou 4 fois plus longs à 12°C qu'à 26°C. Lorsque la température s'élève, la phase G_2 est abrégée dans les mêmes proportions que la phase M ; par contre, la durée de la phase G_1 qui est nulle à 12°C s'allonge considérablement pour représenter environ $\frac{1}{4}$ de la durée totale du cycle cellulaire à 26°C. La durée de cette phase est d'autant plus longue, à une température donnée, que les cellules sont plus différenciées. Les tissus étudiés représentent des populations cellulaires en croissance exponentielle. Le coefficient de prolifération, duquel dépend la base de la fonction exponentielle de croissance, est indépendant de la température mais particulier à chaque tissu. Il est d'autant plus faible que le tissu est plus différencié. En revanche, la vitesse de multiplication des cellules, qui est inversement proportionnelle au temps de génération, varie largement en fonction de la température; en outre, elle semble déterminer à elle seule la vitesse du développement des embryons aux températures choisies.

Introduction

Les premières études concernant l'influence de la température sur la division cellulaire ont été réalisées sur les oeufs en segmentation chez l'oursin (Agrell, 1958), l'ascaris (Ephrussi, 1927) ou la sabelle (Fauré-Frémiet, 1924). Ces travaux ont permis de déterminer les coefficients de température (Q_{10}) des différentes phases de la mitose. Ces résultats ont été confirmés et complétés chez les Amphibiens (Peter, 1924) et plus récemment chez les Mammifères (Shapiro et Lubinni-

kova, 1966; Rao et Engelberg, 1968) et chez les végétaux (Brown, 1951; Evans et Savage, 1959; Van't Hoff et Ying, 1964).

Alors que ces travaux ont considérablement étendu nos connaissances concernant l'influence de la température sur la durée de la mitose et de l'interphase, l'action de ce facteur sur les 4 phases du cycle cellulaire décrites par Howard et Pelc (1951) n'a fait l'objet que d'un petit nombre de travaux récents. Ceux-ci, entrepris grâce aux techniques autoradiographiques et microcinématographiques, portent principalement sur du matériel végétal (Wimber, 1966) des tissus d'Amphibiens embryonnaires (Chibon et Brugal, 1969), ou sur des cellules de Mammifères adultes cultivées *in vitro* (Rao et Engelberg, 1965; Siskin *et al.*, 1965; Vendrely *et al.*, 1968). Ils ont montré que les phases du cycle cellulaire sont différemment affectées par les conditions de température.

L'influence de la température sur les divers paramètres de la prolifération cellulaire tels que l'indice de marquage, l'indice mitotique et le coefficient de prolifération, n'a été que partiellement étudiée (Evans et Savage, 1959; Rao et Engelberg, 1968). Il nous a donc paru intéressant de préciser les modifications de la cinétique de diverses populations de cellules en fonction de la température chez les embryons d'un Vertébré poikilotherme *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien, Urodèle) dont la vitesse de développement varie largement en fonction de ce facteur.

Matériel et méthode

Les expériences ont été réalisées sur des lots de 50 embryons de Pleurodèle au stade 34 de Gallien et Durocher (1957) placés aux températures de 12°C, 17°C, 23°C et 26°C. Lorsqu'ils ont atteint le stade 34, 30 embryons de chaque lot reçoivent une injection de thymidine tritiée puis sont conservés à la température de l'expérience avant d'être fixés, un par un, à des intervalles de temps échelonnés entre 1 h et 99 h après l'injection. Dans chaque lot, 20 embryons non traités nous ont permis de déterminer la vitesse du développement aux températures choisies.

Mode opératoire

Les embryons ayant atteint le stade 34 sont lavés et anesthésiés dans la solution opératoire stérile de Holtfreter additionnée de MS 222 à la concentration de 1 g/l. Au moyen d'une microaiguille, $2 \cdot 10^{-4}$ ml environ d'une solution de thymidine tritiée à la concentration de 50 μ Ci/ml (activité spécifique: 9,7 Ci/mM) est injectée dans la cavité générale des animaux (environ 10^{-2} μ Ci/animal). Après l'injection, les embryons sont replacés dans la solution opératoire de Holtfreter d'où ils seront retirés pour être fixés. Pendant cette période la mortalité est toujours très faible et de l'ordre de 2 à 3%.

Les injections et les fixations ont été pratiquées à différentes heures de la journée sans tenir compte d'éventuelles variations nyctémérales de la prolifération cellulaire.

Traitement histologique et autoradiographique

Les embryons sont fixés durant 24 heures dans le liquide de Smith puis inclus dans la paraffine et débités en coupes séries de 5 μ d'épaisseur. Après déparaffinage, les préparations sont recouvertes d'émulsion nucléaire Ilford L₁ non diluée. Après 45 jours d'exposition à la température de 12°C, les autoradiographies sont révélées et fixées selon les procédés classiques puis colorées par le vert de méthyle et la pyronine (mélange de Pappenheim-Unna).

Méthodes de comptage

Les histo-autoradiographies obtenues nous ont permis d'évaluer le pourcentage de mitoses marquées, l'indice de marquage et l'indice mitotique à 4 températures dans le mésenchyme de

Étude autoradiographique de l'influence de la température

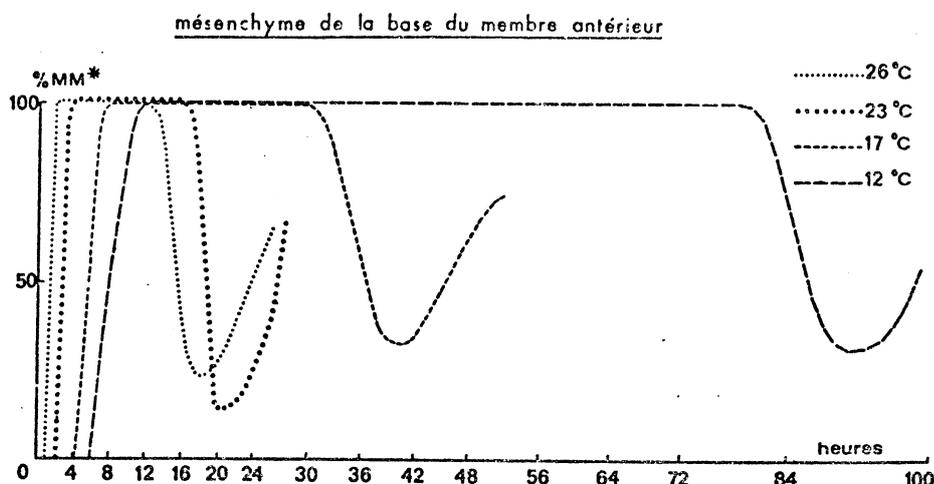


Fig. 1. Courbes de variation du pourcentage de mitoses marquées (MM*) en fonction du temps écoulé après une injection de thymidine tritiée, obtenues à différentes températures dans le mésenchyme de la base du membre antérieur chez des embryons de Pleurodèle au stade 34

la base du bourgeon de membre, l'épithélium gastrique et le télencéphale. Ces tissus ont été choisis en raison de leurs origines embryonnaires différentes.

Le mésenchyme de la base du bourgeon de membre antérieur, d'origine mésodermique, est formé au stade 34 d'une population de cellules apparemment identiques et indifférenciées. Les cellules mésenchymateuses constituant les 4 ou 5 assises proximales du bourgeon sont toujours marquées de façon intense et se distinguent nettement d'un massif cellulaire distal formé de grandes cellules polygonales peu marquées.

L'épithélium gastrique, d'origine endodermique, est riche en plaquettes vitellines qui gênent parfois les comptages au stade 34. Les glandes digestives ne sont pas différenciées, la prise de nourriture ne débutant qu'aux stades 36—37.

Le télencéphale, d'origine ectodermique, est constitué au stade 34 d'une couche interne, dense et riche en mitoses, et d'une couche externe, lâche et pauvre en noyaux.

Après chaque intervalle de temps séparant la fixation de l'injection de thymidine tritiée à une température donnée, un seul embryon est sacrifié pour déterminer le pourcentage de mitoses marquées, l'indice de marquage et l'indice mitotique.

Les courbes de variation du pourcentage de mitoses marquées, établies aux 4 températures choisies, nous ont permis de calculer graphiquement la durée du cycle cellulaire et de ses phases conformément à la méthode de Quastler et Shermann (1959). Nous avons interprété comme mitose, la phase du cycle cellulaire qui s'étend de la fin de la prophase au début de la télophase et durant laquelle les chromosomes sont nettement individualisés.

L'indice de marquage, exprimé en pourcentage, a été établi après comptage de 1000 cellules environ au moyen d'un microscope à projection. Ce procédé réduit l'erreur de comptage à environ 10 cellules pour 1000 cellules.

L'indice mitotique exprimé par le nombre de mitoses pour 1000 cellules, a été établi après comptage d'un millier de cellules à l'aide d'une grille oculaire. Ce procédé conduit à une erreur de comptage d'environ 20 cellules pour 1000 cellules.

Résultats

I. Influence de la température sur la durée du cycle cellulaire et de ses phases

1. Résultats expérimentaux

Les courbes de variation du pourcentage de mitoses marquées, en fonction du temps, établies aux 4 températures choisies, sont données dans la fig. 1 pour

G. Brugal:

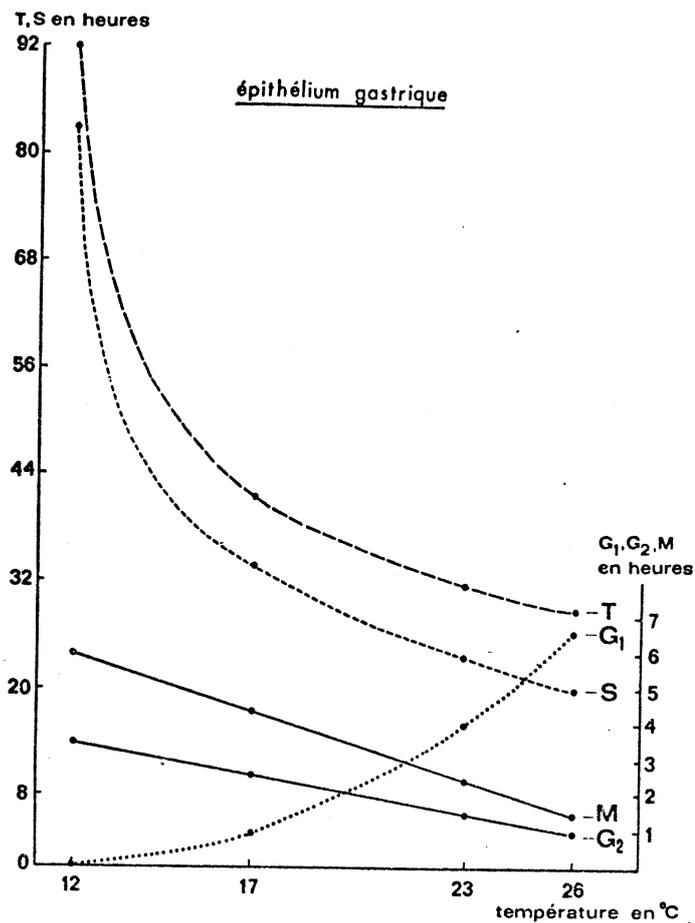


Fig. 2. Courbes de variation de la durée du cycle cellulaire et de ses phases en fonction de la température, obtenues dans l'épithélium gastrique chez des embryons de Pleurodèle au stade 34. L'échelle des ordonnées est 4 fois plus petite pour S et T que pour G_1 , G_2 et M

le mésenchyme de la base du bourgeon de membre antérieur; des courbes de même type ont été obtenues pour les deux autres tissus. Elles permettent de calculer, dans chaque cas, la durée du cycle cellulaire et de ses phases selon la méthode de Quastler et Sherman (1959). Les résultats obtenus sont portés dans le tableau 1.

Les valeurs du tableau 1 permettent de tracer les courbes de variation de la durée du cycle mitotique et de ses phases en fonction de la température. Les courbes obtenues sont données dans la figure 2 pour l'épithélium gastrique. Des graphiques semblables ont été obtenus pour les deux autres tissus.

Nous avons déterminé, dans les trois tissus étudiés, la fraction du cycle cellulaire occupée par chaque phase aux différentes températures. Les résultats obtenus, exprimés en pourcentage du temps de génération, sont traduits par les courbes des fig. 3—5.

Le rapport entre la durée du cycle cellulaire et de ses phases à 26°C et 12°C a été calculé pour les trois tissus; ce rapport, ou *coefficient de variation*, traduit la sensibilité de la durée du cycle cellulaire et de ses phases aux conditions de température. Les résultats obtenus sont portés dans le tableau 2.

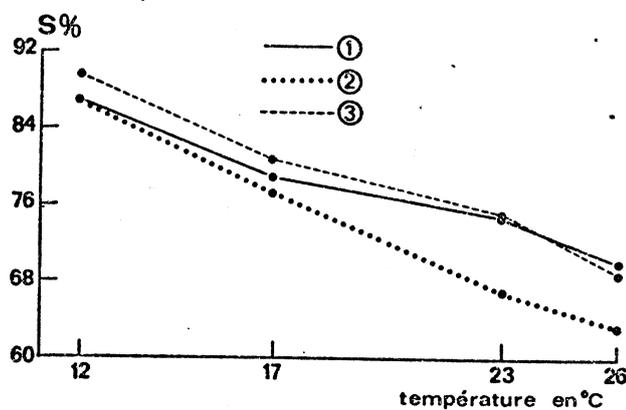


Fig. 3. Courbes de variation de la fraction du cycle cellulaire (exprimée en pourcentage du temps de génération) occupée par la phase *S* en fonction de la température, dans le télencéphale (1), le mésenchyme de la base du membre antérieur (2) et l'épithélium gastrique (3)

Tableau 1. Durées du cycle cellulaire et de ses phases calculées graphiquement d'après les courbes de variation du pourcentage de mitoses marquées établies à différentes températures dans 3 tissus d'embryons de Pleurodèle au stade 34. (Méthode de Quastler et Shermann, 1959)

Tissus	Mésenchyme de la base du membre antérieur				Epithélium gastrique				Télencéphale			
	12	17	23	26	12	17	23	26	12	17	23	26
Température (°C)												
Durées (h)												
<i>T</i>	91	40	24	22	92	42	32	29	93	48	32	30
<i>G</i> ₁	0	1	4	6	0	1	4	6,5	0	4	5	7,5
<i>S</i>	79	31	16	14	82,5	34	24	20	81	38	24	21
<i>G</i> ₂	6	4	2	1	3,5	2,5	1,5	1	4	2	1	0,5
<i>M</i>	6	4	2	1	6	4,5	2,5	1,5	8	4	2	1

Tableau 2. Coefficients de variation de la durée du cycle cellulaire et de ses phases, entre 26° C et 12° C, dans 3 tissus d'embryons de Pleurodèle au stade 34. La valeur du coefficient traduit la sensibilité des phases du cycle aux conditions de température. Cette sensibilité se traduit par un allongement dans le cas de *T*, *S*, *G*₂ et *M* et par un raccourcissement dans le cas de *G*₁

Tissus	Coefficients de variation entre 26° C et 12° C				
	<i>T</i>	<i>G</i> ₁	<i>S</i>	<i>G</i> ₂	<i>M</i>
Mésenchyme de la base du membre antérieur	4,14	∞	5,64	6	6
Epithélium gastrique	3,17	∞	4,13	3,40	4
Télencéphale	3,10	∞	3,86	8	8

2. Interprétation des résultats

Toutes les courbes obtenues, traduisant la variation du pourcentage de mitoses marquées en fonction du temps écoulé après l'injection, présentent une grande régularité et un plateau constant à 100%. On peut en déduire que:

— les trois tissus étudiés sont homogènes et ne comprennent pas de sous-populations de cellules ayant des comportements mitotiques distincts;

— l'incorporation de thymidine tritiée, et par conséquent la synthèse d'ADN, est ininterrompue durant toute la phase S.

Action de la température sur le temps de génération. Variation de la durée absolue (tableau 1): dans les trois tissus étudiés, le temps de génération décroît rapidement lorsque la température s'élève de 12° C à 17° C, puis plus lentement au-dessus de 17° C. Cette variation du temps de génération se traduit par une courbe ayant la forme d'une branche d'hyperbole (fig. 2).

Coefficient de variation (tableau 2): lorsque la température s'abaisse de 26° C à 12° C le temps de génération est multiplié par un coefficient de 3,10 à 4,14 selon les tissus. Le tableau 2 montre que le mésenchyme de la base du bourgeon de membre est le plus sensible aux variations de température, puis viennent par ordre de sensibilité décroissante, l'épithélium gastrique et le télencéphale.

Action de la température sur la durée de la phase S. Variation de la durée absolue (tableau 1): dans les trois tissus étudiés, la durée de la phase S décroît quand la température s'élève de 12° C à 26° C; cette variation se traduit, comme pour le temps de génération, par une courbe ayant la forme d'une branche d'hyperbole. Le parallélisme entre les variations de la durée de la phase S et du temps de génération traduit le fait que, selon la température, la synthèse d'ADN occupe 70% à 90% de la durée du cycle cellulaire.

Variation de la fraction du cycle mitotique occupée par la phase S (fig. 3): dans les trois tissus étudiés, la fraction du cycle cellulaire occupée par la phase S est importante à toutes les températures choisies et atteint 90% à 12° C. Cette fraction décroît de façon semblable dans les trois tissus lorsque la température s'élève de 12° C à 26° C.

Coefficient de variation (tableau 2): lorsque la température s'abaisse de 26° C à 12° C, la durée de la phase S est multipliée par un coefficient variant entre 3,86 et 5,64 selon les tissus. La comparaison du coefficient de variation de la durée de la phase S des trois tissus fait apparaître que le mésenchyme de la base du bourgeon de membre antérieur présente la phase S la plus sensible aux conditions de température; puis viennent, par ordre de sensibilité décroissante, l'épithélium gastrique et le télencéphale.

Influence de la température sur la durée des phases G_2 et M . Variation de la durée absolue (tableau 1): quelle que soit la température, la durée de la phase G_2 est toujours inférieure ou égale à celle de la phase M . Ces deux phases sont abrégées proportionnellement à l'élévation de température entre 12° C et 26° C dans le mésenchyme de la base du bourgeon de membre et l'épithélium gastrique, et entre 17° C et 26° C dans le télencéphale.

Variation de la fraction du cycle cellulaire occupée par les phases G_2 et M (fig. 4): quelle que soit la température, la fraction du cycle cellulaire occupée par la phase G_2 est toujours inférieure ou égale à celle occupée par la phase M ; elle décroît avec l'élévation de température entre 17° C et 26° C dans le télencéphale et entre 12° C et 26° C dans l'épithélium gastrique et le mésenchyme de la base du bourgeon de membre. Dans ces deux derniers tissus, la décroissance est particulièrement sensible au-dessus de 23° C. Les fractions du cycle cellulaire occupées par les phases G_2 et M varient, dans un même tissu, de façon identique (més-

Étude autoradiographique de l'influence de la température

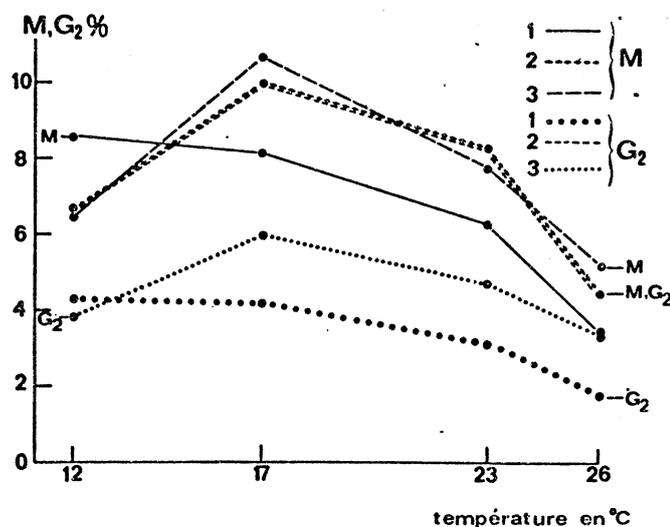


Fig. 4. Courbes de variation des fractions du cycle cellulaire (exprimée en pourcentage du temps de génération) occupées par les phases G_2 et M en fonction de la température dans le télencéphale (1), le mésenchyme de la base du membre antérieur (2) et l'épithélium gastrique (3)

enchyme de la base du membre) ou très comparable (épithélium gastrique et télencéphale).

Coefficient de variation des phases G_2 et M (tableau 2): lorsque la température s'abaisse des 26° C à 12° C, la durée des phases G_2 et M est multipliée par un coefficient égal à 8 dans le télencéphale et à 6 dans le mésenchyme de la base du bourgeon de membre antérieur; il est voisin de 4 dans l'épithélium gastrique. Ces résultats font apparaître une grande similitude dans la sensibilité des phases G_2 et M aux conditions de température.

Influence de la température sur la durée de la phase G_1 . Variation de la durée absolue (tableau 1): la durée de la phase G_1 varie en sens inverse des trois autres phases du cycle cellulaire entre 12° C et 26° C. Nulle à 12° C elle s'allonge rapidement avec l'élévation de température surtout au-dessus de 23° C.

Variation de la fraction du cycle cellulaire occupée par la phase G_1 (fig. 5): la fraction du cycle cellulaire occupée par la phase G_1 , nulle à 12° C, croît considérablement avec l'élévation de température, surtout au-dessus de 23° C, pour représenter environ $\frac{1}{4}$ de la durée totale du cycle cellulaire à 26° C. Cet accroissement est très comparable pour les trois tissus étudiés.

Coefficient de variation (tableau 2): lorsque la température s'élève de 12° C à 26° C, la durée de la phase G_1 passant de 0 à 6 ou 7,5 heures selon les tissus, réalise une performance infinie que le coefficient de variation ne peut pas traduire de façon significative; néanmoins, la phase G_1 est celle des 4 phases du cycle cellulaire qui apparaît la plus sensible aux conditions de température.

II. Relations entre la durée des cycles cellulaires et la vitesse du développement

Nous avons observé la vitesse du développement des embryons de Pleurodèle élevés à 12° C, 15° C, 17° C, 23° C, et 26° C jusqu'au stade 34. Les courbes de développement obtenues à ces différentes températures sont données dans la fig. 6; elles permettent de construire graphiquement une courbe qui traduit la

G. Brugal:

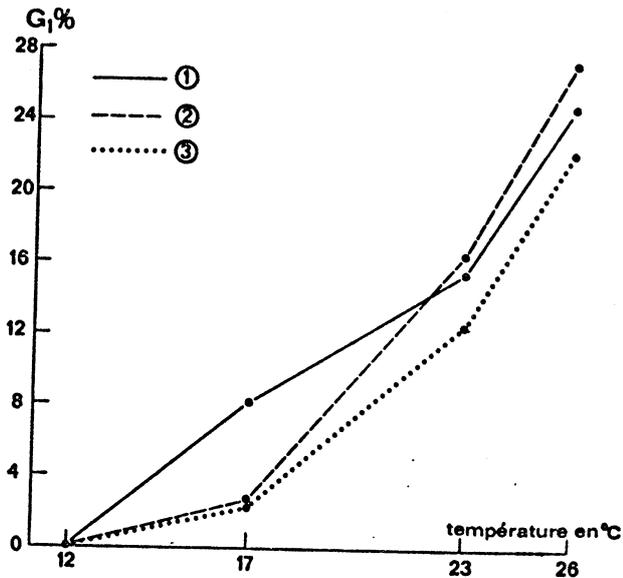


Fig. 5. Courbes de variation de la fraction du cycle cellulaire (exprimée en pourcentage du temps de génération) occupée par la phase G_1 en fonction de la température dans le telencéphale (1), le mésenchyme de la base du membre antérieur (2) et l'épithélium gastrique (3)

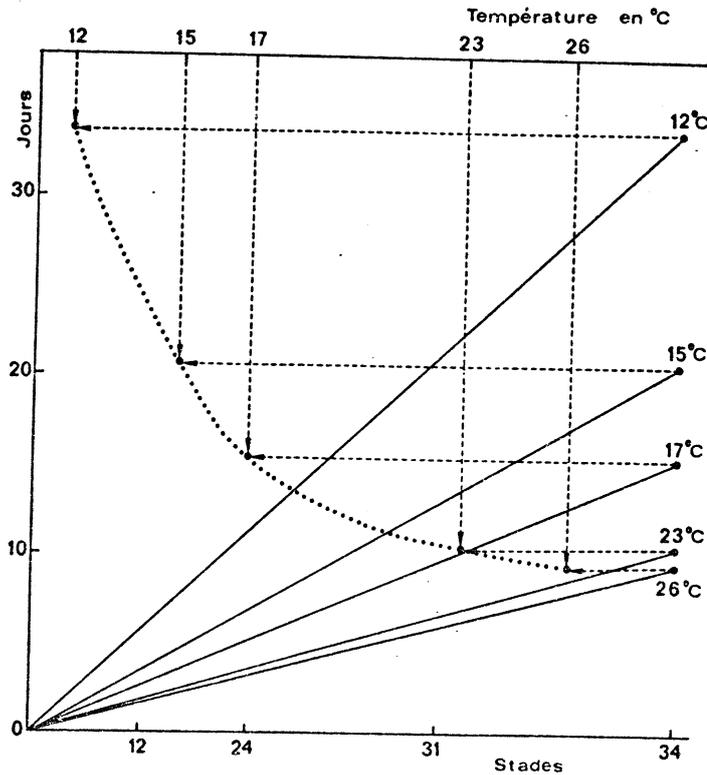


Fig. 6. Courbes de développement (traits pleins) des embryons de Pleurodèle élevés à 12°C, 15°C, 17°C, 23°C et 26°C en fonction du temps (échelle verticale). Ces droites permettent de construire une courbe en forme de branche d'hyperbole (pointillés) qui traduit la variation du temps mis par les embryons pour passer du stade 0 (fécondation) au stade 34 en fonction de la température (échelle supérieure). Les détails de la construction graphique sont figurés en tirets

Étude autoradiographique de l'influence de la température

Tableau 3. *Rapports entre le temps (D) mis par les embryons de Pleurodèle pour atteindre le stade 34 et la durée du cycle cellulaire (T) au stade 34, calculés dans 3 tissus à différentes températures*

Température (°C)	Temps en heures mis pour atteindre le stade 34 (D)	Rapport D/T		
		Mésenchyme de la base du membre antérieur	Epi- thélium gastrique	Tél- encéphale
12	790±66	8,7±0,7	8,5±0,7	8,5±0,7
17	362±30	9,1±0,7	8,6±0,7	7,6±0,7
23	254±26	10,7±0,7	7,9±0,7	7,9±0,7
26	226±22	10,2±0,7	7,8±0,7	7,5±0,7
Moyennes		9,7	8,2	7,8

variation du temps mis par les embryons pour passer du stade 0 (fécondation de l'oeuf) au stade 34, en fonction de la température. Cette courbe (fig. 6) a une forme en branche d'hyperbole très comparable à celle des courbes de variation du temps de génération en fonction du même facteur (fig. 2). La question se pose donc de savoir s'il existe une relation entre le temps (D) mis par un embryon pour atteindre un stade donné et la durée (T) des cycles mitotiques de ses cellules.

Pour répondre à cette question nous avons calculé, pour chaque tissu, la valeur du rapport D/T au stade 34 pour lequel nous connaissons simultanément D (tableau 3) et T (tableau 1). Les résultats obtenus sont portés dans le tableau 3. Celui-ci montre que, quelle que soit la température, la valeur du rapport D/T peut être considérée comme constante (aux erreurs d'expérience près), dans un tissu donné. L'analyse des variances et le test F appliqués aux résultats de ce tableau révèlent que les valeurs moyennes du rapport D/T des trois tissus étudiés diffèrent de façon hautement significative.

Il est évident que le temps de génération qui dure 1,5 à 2 heures au cours des premiers clivages de segmentation et environ 50 heures au stade 34 dans les mêmes conditions de température, n'est pas constant au cours du développement; en conséquence, le rapport D/T ne représente en aucune façon le nombre de divisions survenues entre la fécondation et le stade considéré. Cependant, le tableau 3 permet de dire qu'il existe un rapport constant, indépendant de la température, et particulier à chaque tissu, entre la vitesse du développement d'un embryon et le temps de génération de ses cellules.

III. Influence de la température sur l'indice de marquage

1. Variation de l'indice de marquage en fonction du temps à différentes températures

Les courbes de variation de l'indice de marquage, établies à 4 températures pour les 3 tissus étudiés, sont données dans les fig. 7—9 respectivement. La comparaison des graphiques obtenus montre que, quelle que soit la température, les courbes de variation de l'indice de marquage ont une forme caractéristique. Elles présentent toutes une branche descendante qui, après avoir atteint un

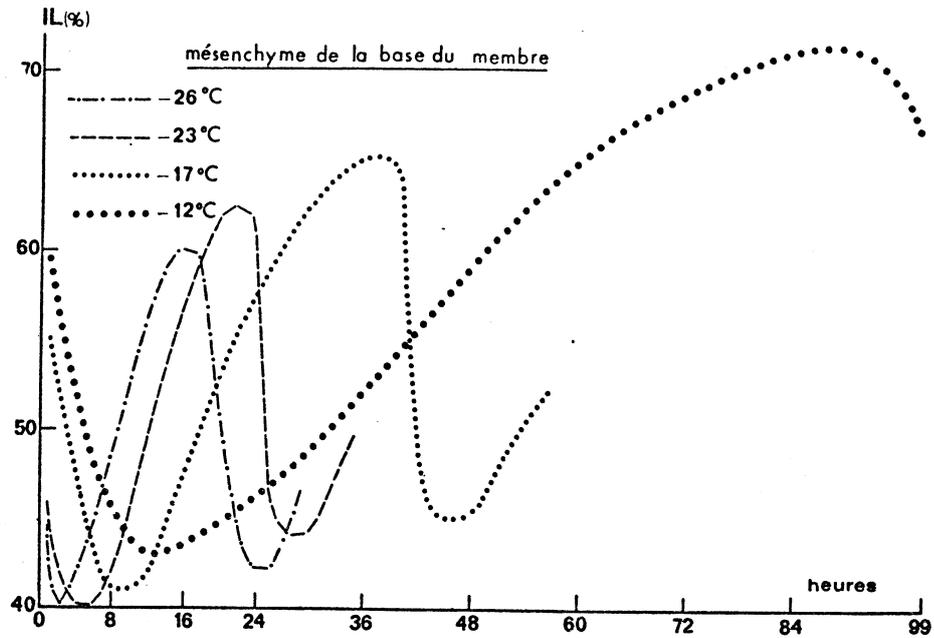


Fig. 7

Fig. 7—9. Courbes de variation de l'indice de marquage (IL) en fonction du temps écoulé après une injection de thymidine tritiée, obtenues à différentes températures dans trois tissus d'embryon de Pleurodèle au stade 34. Pour l'établissement de ces courbes, nous avons considéré comme marqués, les noyaux surmontés de plus de 8 grains d'argent métallique

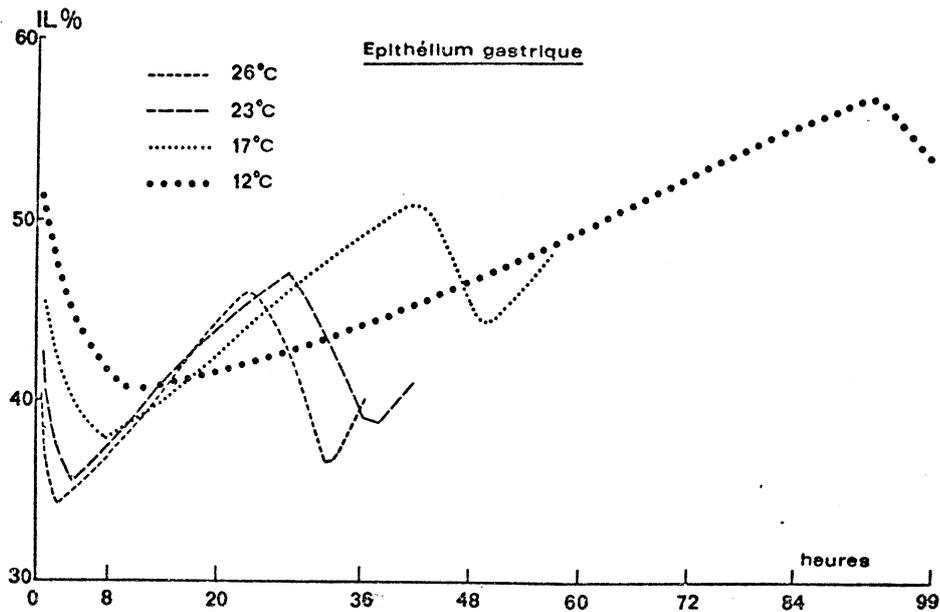


Fig. 8

premier minimum, est suivie d'une branche ascendante relativement longue et d'une nouvelle branche descendante qui atteint un second minimum plus élevé que le précédent; enfin les courbes croissent à nouveau. Cette nouvelle branche ascendante n'est pas visible sur les courbes établies à la température de 12° C car nos fixations n'ont pas été poursuivies suffisamment longtemps. Nous avons

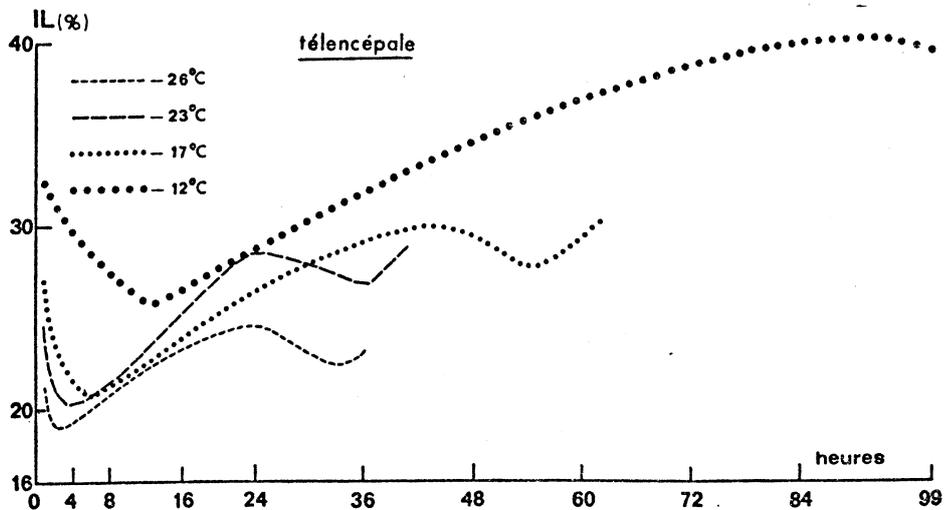


Fig. 9

Tableau 4. Comparaison des durées du cycle mitotique et de ses phases calculées d'après les courbes des mitoses marquées (MM) (Méthode de Quasiler et Sherman, 1959), avec celles qui sont calculées d'après les courbes de l'indice de marquage (IL) (Méthode de Brugal et Chibon, 1970) dans trois tissus à différentes températures

Tissus	Température (°C)	Durée en heures							
		$G_2 + M$		S		T		G_1	
		MM	IL	MM	IL	MM	IL	MM	IL
Mésenchyme de la base du bourgeon de membre	12	12	10—14	79	72—80	91	—	0	—
	17	8	8—10	31	27—31	40	35—40	1	0—5
	23	4	4—6	16	15—18	24	22—26	4	0—7
	26	2	2	14	12—16	22	23—26	6	5—12
Tél-encéphale	12	12	12—14	81	76—84	93	—	0	—
	17	6	5—7	38	35—40	48	47—50	4	0—9
	23	3	3—5	24	19—24	32	32—34	5	3—12
	26	1,5	1—3	21	18—22	30	30—32	7,5	5—13
Epi-thélium gastrique	12	9,5	10—14	82,5	79—82	92	—	0	—
	17	7	7—11	34	32—36	42	41—43	1	0—4
	23	4	3—5	24	23—25	32	32—35	4	2—9
	26	2,5	2—3	20	20—22	29	29—31	6,5	4—9

montré précédemment à l'aide d'un modèle graphique théorique que de telles courbes semblent caractériser les populations cellulaires croissant selon un mode exponentiel et permettent de calculer graphiquement la durée du cycle cellulaire et de ses phases (Brugal et Chibon, 1970). Nous avons comparé dans le tableau 4 les durées du cycle cellulaire et de ses phases calculées graphiquement d'après les courbes de variation de l'indice de marquage, et celles calculées d'après les courbes de variation du pourcentage de mitoses marquées dans les trois tissus, à 4 températures. Ce tableau montre que les résultats obtenus par les deux

méthodes sont en bon accord; cependant les valeurs déduites des courbes de variation de l'indice de marquage sont moins précises que celles déduites des courbes de variation du pourcentage de mitoses marquées.

Dans les populations cellulaires en croissance exponentielle stationnaire, le nombre de cellules peut être évalué à chaque instant grâce à la relation :

$$N(t) = N(o) \cdot (P + 1)^{t/T} \quad (1)$$

dans laquelle: $N(t)$ = nombre de cellules à l'instant t ,
 $N(o)$ = nombre de cellules à l'instant $t = 0$,
 T = temps de génération,
 P = coefficient de prolifération ou proportion de cellules engagées activement dans un cycle mitotique à l'instant t .

La relation (1) est déduite d'un modèle mathématique simple applicable en première approximation aux populations cellulaires embryonnaires (Brugal et Bertrandias, 1970). Ce modèle implique l'absence de migration et de mortalité cellulaires et permet d'évaluer l'indice de marquage et l'indice mitotique grâce aux relations:

$$IL \simeq S/T \cdot \text{Log}(P + 1) \left[1 + \text{Log}(P + 1) \cdot \frac{(M + G_2 + S/2)}{T} \right] \quad (2)$$

$$IM \simeq M/T \cdot \text{Log}(P + 1) \quad (3)$$

La variation du coefficient de prolifération au cours du temps dans les tissus étudiés est relativement lente (Brugal, 1971) et n'influe donc pas sur la base de la fonction exponentielle de croissance dans l'intervalle de temps considéré ici.

2. Variation de l'indice de marquage en fonction de la température

Les fig. 7—9 montrent que dans chaque tissu, à mesure que la température s'élève, les courbes de variation de l'indice de marquage s'abaissent vers l'axe des abscisses et se replient vers l'axe des ordonnées tout en conservant leur forme caractéristique. Les modifications des courbes en fonction de la température prouvent que ce facteur agit sur les paramètres qui les définissent et qui sont principalement:

- la durée du cycle mitotique et de ses phases,
- la proportion de cellules en phase S au moment de l'injection de thymidine tritiée.

Le resserrement des courbes vers l'axe des ordonnées consécutif à l'élévation de température, traduit le raccourcissement du cycle cellulaire et de ses phases comme le montre le tableau 4; il confirme les résultats obtenus précédemment à l'aide des courbes de variation du pourcentage de mitoses marquées.

L'abaissement des courbes vers l'axe des abscisses traduit une diminution de l'indice de marquage avec l'élévation de température (fig. 10). La relation (2) montrant que cet indice dépend à la fois de la durée relative des phases S, G_2 et M par rapport au temps de génération et du coefficient de prolifération (P), la question se pose donc de savoir quels sont parmi ces paramètres ceux qui sont responsables de la diminution de l'indice de marquage lorsque la température

Étude autoradiographique de l'influence de la température

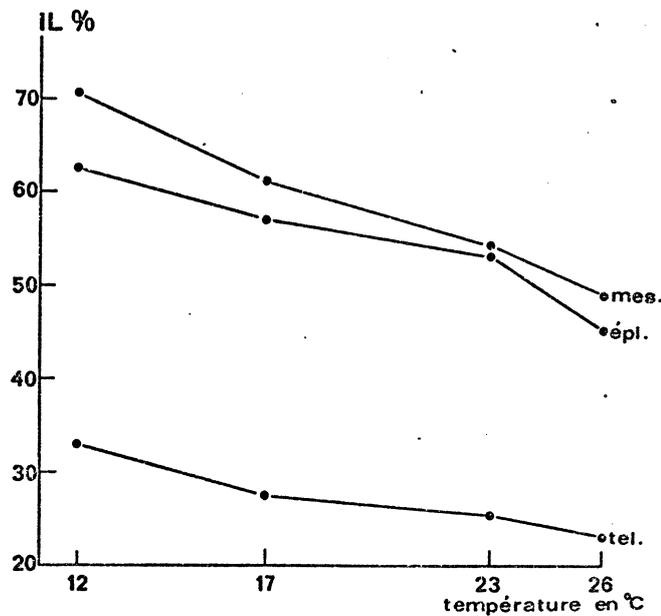


Fig. 10. Courbes de variation de l'indice de marquage (IL) observé 1 heure après l'injection en fonction de la température, obtenues dans le mésenchyme de la base du membre antérieur (*mes.*), l'épithélium gastrique (*épi.*) et le télencéphale (*tél.*). Pour l'établissement de ces courbes, nous avons considéré comme marqués, les noyaux surmontés de plus de 3 grains d'argent métallique

Tableau 5. Comparaison entre l'indice de marquage observé et la durée relative des phases du cycle cellulaire par rapport au temps de génération, dans 3 tissus à différentes températures

Tissus	Mésenchyme de la base du membre antérieur				Epithélium gastrique				Télencéphale			
	12	17	23	26	12	17	23	26	12	17	23	26
Température (°C)	12	17	23	26	12	17	23	26	12	17	23	26
Indice de marquage observé (IL_{ob}) (%)	70,4	61	54,1	48,7	62,5	57,1	53,7	54,1	32,7	27,7	25,3	32,2
Indice de marquage théorique (IL_{th}) (%)	83,7	75,6	62,1	57,8	85,9	78,3	70	62,1	84	74,7	62,9	70
IL_{ob}/IL_{th}	0,84	0,81	0,87	0,84	0,73	0,73	0,77	0,73	0,39	0,37	0,36	0,30
S/T (%)	86,8	77,5	66,7	63,7	89,7	81	75	69	87,1	79,2	75	70
$(M + G_2)/T$ (%)	13,2	20	16,3	9	10,3	16,7	12,5	8,6	12,9	12,5	9,4	5

s'élève. Pour répondre à cette question nous avons comparé, dans le tableau 5, l'indice de marquage observé 1 heure après l'injection, les rapports S/T , $(M + G_2)/T$ et l'indice de marquage théorique calculé d'après la relation (2) en supposant que toutes les cellules se divisent (coefficient de prolifération égal à 1). Pour l'évaluation de l'indice de marquage 1 heure après l'injection, nous avons considéré comme marquées les cellules dont le noyau est surmonté de plus de trois grains d'argent métallique. Les résultats obtenus dans le tableau 5 montrent que l'indice de marquage observé et l'indice de marquage théorique sont dans un rapport que

l'on peut considérer comme constant (aux erreurs d'expérience près) et indépendant de la température, mais particulier à chaque tissu. En d'autres termes, l'indice de marquage observé et l'indice de marquage théorique décroissent, pour un tissu donné, dans le même rapport (IL_{ob}/IL_{th}) quand la température s'élève. La diminution de l'indice de marquage observé ne dépend donc que de la diminution relative de la durée des phases S , G_2 et M par rapport au temps de génération. En outre, le tableau 5 montre que le rapport S/T est du même ordre de grandeur que l'indice de marquage théorique (IL_{th}) alors que le rapport $(M + G_2)/T$ a une valeur 5 à 15 fois plus petite que celle de l'indice de marquage théorique et varie en fonction de la température. Nous pouvons en conclure que c'est principalement la diminution relative de la durée de la phase S par rapport au temps de génération qui est responsable de la diminution de l'indice de marquage quand la température s'élève.

3. Variation de l'indice de marquage en fonction du tissu considéré

Les fig. 7—9 montrent qu'à chaque température les trois tissus étudiés diffèrent notablement par la valeur de l'indice de marquage observé ainsi que par l'amplitude de ses variations en fonction du temps. Pour une température donnée, l'indice de marquage est plus élevé et l'amplitude de ses variations plus grande dans le mésenchyme de la base du bourgeon de membre antérieur que dans l'épithélium gastrique et plus dans ce dernier que dans le télencéphale. Ces trois tissus étant par ailleurs très comparables par leur indice de marquage théorique, par le rapport S/T de leurs cellules et par la durée de leurs cycles mitotiques, nous avons été conduits à calculer le coefficient de prolifération (P) dans chacun d'eux grâce à la relation (2).

Les résultats obtenus, réunis dans le tableau 6, montrent que, quelle que soit la température, la valeur de $\text{Log}(P + 1)$, et par conséquent du coefficient de prolifération (P), peut être considérée comme constante et particulière à chaque tissu, aux erreurs d'expérience près. Au stade 34, la proportion de cellules en activité mitotique est importante (83%) dans le mésenchyme de la base du bourgeon de membre antérieur, plus faible (72%) dans l'épithélium gastrique et plus encore dans le télencéphale (35%). Ces trois tissus présentent donc des coefficients de prolifération très différents: des proportions différentes de leurs cellules ont cessé de se diviser au stade 34.

IV. Variations de l'indice mitotique en fonction de la température et du tissu considéré

1. Variation de l'indice mitotique en fonction de la température

Les indices mitotiques observés dans les 3 tissus étudiés aux 4 températures choisies sont portés dans le tableau 7. Dans le télencéphale l'indice mitotique décroît avec l'élévation de température d'une façon d'autant plus accentuée que la température est plus élevée. Dans le mésenchyme de la base du bourgeon de membre antérieur, et dans l'épithélium gastrique, l'indice mitotique croît lorsque la température s'élève entre 12° C et 17° C puis décroît au-dessus de 17° C. La relation (3) montre que dans les populations cellulaires en croissance exponentielle, l'indice mitotique dépend à la fois de la durée de la phase M par rapport au temps de génération et du coefficient de prolifération. La question se pose donc de

Étude autoradiographique de l'influence de la température

Tableau 6. Coefficient de prolifération, calculé à partir de l'indice de marquage, dans 3 tissus d'embryons de *Pleurodèle* au stade 34

Tissus	Mésenchyme de la base du membre antérieur				Epithélium gastrique				Télocéphale			
	12	17	23	26	12	17	23	26	12	17	23	26
Température (°C)	12	17	23	26	12	17	23	26	12	17	23	26
Log (P + 1)	0,604	0,586	0,619	0,613	0,537	0,539	0,560	0,541	0,317	0,302	0,295	0,296
Moyennes de Log (P + 1)	0,606				0,544				0,303			
P + 1	1,83				1,72				1,35			
Coefficient de prolifération (P) (%)	83				72				35			

Tableau 7. Coefficient de prolifération, calculé à partir de l'indice mitotique, dans 3 tissus d'embryons de *Pleurodèle* au stade 34

Tissus	Mésenchyme de la base du membre antérieur				Epithélium gastrique				Télocéphale			
	12	17	23	26	12	17	23	26	12	17	23	26
Température (°C)	12	17	23	26	12	17	23	26	12	17	23	26
Indice mitotique (IM) (‰)	39,7	62,4	54,2	28,8	38,2	61,1	46,6	25,3	27,9	25,2	19,6	10,3
M/T (‰)	65,9	100	83,3	45,5	65,2	107,1	78,1	51,7	86	83,3	62,5	33,3
IM (M/T) = Log (P + 1)	0,602	0,624	0,651	0,633	0,586	0,570	0,597	0,489	0,324	0,303	0,314	0,509
Moyennes de Log (P + 1)	0,628				0,561				0,313			
P + 1	1,88				1,75				1,37			
Coefficient de prolifération (P) (%)	88				75				37			

savoir lequel de ces paramètres est responsable de la variation de l'indice mitotique quand la température varie. Pour répondre à cette question, nous avons comparé, dans le tableau 7 l'indice mitotique observé et le rapport M/T ; les résultats obtenus montrent que le rapport $IM/(M/T) = \text{Log}(P + 1)$ est particulier à chaque tissu, mais qu'il demeure constant pour chacun d'eux lorsque la température varie. Nous pouvons conclure de ces résultats que les variations de l'indice mitotique en fonction de la température ne dépendent que de la variation relative de la durée de la phase M par rapport au temps de génération sous l'effet de ce facteur.

2. Variation de l'indice mitotique en fonction du tissu considéré

La relation (3) permet de calculer le coefficient de prolifération de chaque tissu. Les résultats obtenus confirment que ce coefficient est indépendant de la température mais particulier à chaque tissu; en outre les valeurs du coefficient de prolifération déduites de l'indice de marquage et de l'indice mitotique sont en bon accord. Cependant les premières sont inférieures aux secondes de 3 à 6% environ. Ceci est principalement dû à ce que la valeur de l'indice de marquage qui, dans une première période décroît très rapidement avec le temps (fig. 7—9) est inférieure, dès 1 heure après l'injection, à la proportion réelle de cellules en phase S parce qu'un certain nombre de cellules non marquées se sont divisées durant cette période (Brugal et Chibon, 1970).

Il convient de préciser que le choix du nombre de grains d'argent métallique, qui constitue le critère de marquage d'une cellule, influe sur la valeur de l'indice de marquage observé mais non sur la périodicité de ses variations. Pour faciliter le comptage des cellules marquées et non marquées en vue d'établir les courbes des fig. 7—9, nous avons considéré comme marquées les cellules surmontées de plus de 8 grains d'argent; par contre, l'absence de «voile de fond» dans les autoradiographies des embryons fixés durant les premières heures nous ont permis de considérer comme marquées les cellules surmontées de plus de 3 grains d'argent métallique en vue de calculer la valeur de l'indice de marquage observé 1 heure après l'injection de thymidine tritiée. Cette valeur doit, en effet, être connue avec précision pour permettre de calculer valablement le coefficient de prolifération (P) à l'aide de la relation (2).

Discussion et conclusion

Influence de la température sur la durée du cycle cellulaire. Les courbes traduisant la variation du temps de génération (fig. 2) en fonction de la température dans les 3 tissus, sont très semblables, par leur forme, à celle que nous pouvons construire à partir des chiffres obtenus chez les embryons en segmentation de *Rana temporaria* (Chulitskaya, 1967). De telles courbes, caractérisées par leur forme en branche d'hyperbole, se rencontrent aussi bien dans les tissus des Amphibiens ou des Poissons (Dettlaff, 1964; Ignatieva et Kostomarova, 1966) que dans les méristèmes des végétaux (Evans et Savage, 1959; Wimber, 1966); de plus elles sont définies par des valeurs du temps de génération qui atteignent le même ordre de grandeur à chaque température. Par contre, les temps de génération les plus courts (20 à 30 heures) observés chez les embryons de Pleurodèle élevés à 26° C sont toujours supérieurs à la durée moyenne (une dizaine d'heures environ) des cycles mitotiques des cellules embryonnaires des Mammifères et des Oiseaux, ce qui est certainement à mettre en relation avec la température corporelle élevée de ces derniers.

De nombreux auteurs (Rao et Engelberg, 1966; Sissen *et al.*, 1965; Vendrely *et al.*, 1968) ont montré que le temps de génération des cellules de Mammifères adultes cultivées *in vitro* diminue avec l'élévation de température, atteint un minimum aux environs de 37° C à 38° C, puis augmente pour les températures supérieures à 38° C. Cet allongement du cycle cellulaire aux températures élevées a été décrit chez l'embryon de *Misgurnus* (Téléostéen) (Ignatieva et Kostomarova,

Étude autoradiographique de l'influence de la température

1966) mais, chez celui-ci, la durée minimale du temps de génération s'observe aux environs de 22° C. Chez le Pleurodèle, la forte mortalité des animaux élevés à une température supérieure à 26° C ne nous a pas permis de mettre en évidence un tel allongement du cycle cellulaire aux températures élevées.

Similitudes de la durées des phases G_2 et M . Dans chacun des trois tissus étudiés, les phases G_2 et M sont très comparables, tant par leur durée absolue que par leur coefficient de variation en fonction de la température; de plus, les fractions du cycle cellulaire qu'elles occupent sont du même ordre de grandeur et varient aussi de la même façon en fonction de la température. Ces similitudes pourraient s'expliquer par le fait que la mitose se prépare au cours de la phase G_2 qui comprend notamment une grande partie de la prophase mitotique. On sait en effet que des synthèses protéiques spécifiques doivent avoir lieu 30 à 60 minutes avant la métaphase pour que la mitose puisse se dérouler normalement (Donnelly et Sissen, 1967); en outre, c'est également durant la phase G_2 que sont édifiés les principaux organites mitotiques (Neskovič, 1967). Il ne semble pas exister de différence fondamentale entre la phase G_2 et la phase M ; le déroulement de la première impliquerait celui de la seconde et dépendrait du même déterminisme.

Influence de la température sur la durée de la phase G_1 . Des 4 phases du cycle cellulaire, la phase G_1 est la plus sensible aux conditions de température chez l'embryon de Pleurodèle. Le même phénomène se rencontre dans les tissus végétaux (Wimber, 1966), chez les Amphibiens adultes (Reddan et Rothstein, 1966) et les Mammifères (Defendi et Manson, 1963). Cependant, le fait que la durée de la phase G_1 varie, chez l'embryon de Pleurodèle, en sens inverse de celui des trois autres phases, semble particulier. Un tel fait n'a pas été décrit dans les travaux antérieurs; au contraire, ceux-ci ont montré que les durées des 4 phases du cycle mitotique des cellules adultes cultivées *in vitro* varient dans le même sens en fonction de la température (Rao et Engelberg, 1965; Sissen *et al.*, 1965).

L'absence de phase G_1 que nous avons constatée à 12° C dans tous les tissus étudiés chez le Pleurodèle au stade 34 n'est pas exceptionnelle; en effet, cette phase n'est pratiquement pas détectable dans les oeufs en segmentation chez l'oursin (Mazia, 1963) et le xénope (Graham et Morgan, 1966), dans les proadamantoblastes du jeune lapin (Starkey, 1963) et dans les cellules de la tumeur ascitique de Ehrlich chez la souris (Baserga, 1963) qui représentent des populations cellulaires proliférant rapidement.

Si l'on admet, comme semble le montrer la comparaison de divers travaux (Dettlaff, 1964; Graham et Morgan, 1966; Kauffmann, 1968) que la différenciation et la spécialisation des cellules s'accompagnent d'un allongement significatif de l'interphase mitotique et plus particulièrement de la phase G_1 , le raccourcissement de cette dernière à basse température devrait provoquer, chez l'embryon de Pleurodèle, une augmentation de la vitesse de prolifération des cellules par rapport à leur vitesse de différenciation. Une telle prépondérance de la prolifération a été observée chez les têtards de *Rana pipiens* (Decker et Kollros, 1969) qui présentent à chaque stade une taille d'autant plus grande et un nombre de cellules d'autant plus important que la température à laquelle ils sont élevés est plus basse.

Relations entre la phase G_1 et la phase S . On peut interpréter les variations en sens opposés des phases G_1 et S en émettant l'hypothèse qu'une partie, au moins,

des précurseurs nucléotidiques et des enzymes nécessaires au déroulement ultérieur du cycle mitotique et plus particulièrement de la phase S , serait synthétisés au cours de la phase G_1 grâce à l'énergie libérée par la digestion intracellulaire du vitellus. Cette conception qui établit une relation entre la phase G_1 et la phase S qui la suit, est en accord avec l'hypothèse de Cleaver (1967) selon laquelle le déroulement de la phase S dépendrait de celui de la phase G_1 ; de plus, elle nous a été suggérée par le fait que les plaquettes vitellines semblent d'autant plus nombreuses au stade 34 que la température d'élevage jusqu'à ce stade a été plus basse. Un tel ralentissement de la consommation des réserves lipidiques à basse température a été démontré chez l'embryon d'axolotl (Lovtrup, 1959).

Ces remarques nous ont conduits à penser que la phase S , qui ne s'achève que lorsque le taux d'ADN nucléaire a doublé, dure d'autant plus longtemps que le taux d'enzymes et de précurseurs nucléotidiques nécessaires à l'édification de cet ADN est moins élevé. L'allongement considérable de cette phase consécutif à un abaissement de température serait dû principalement à la diminution du taux des enzymes et des précurseurs synthétisés durant la phase G_1 qui est d'autant plus courte que la température est basse. Dès lors, il existerait une relation de cause à effet entre l'allongement de la phase G_1 et le raccourcissement de la phase S avec l'élévation de la température.

Comparaison entre les cycles mitotiques des trois tissus étudiés. Les cycles mitotiques présentent de nombreux caractères communs dans les trois tissus étudiés; cependant, le tableau 1 montre que le temps de génération et la durée des phases G_1 et S est généralement plus longue dans le télencéphale que dans l'épithélium gastrique et plus encore que dans le mésenchyme de la base du bourgeon de membre antérieur. Comme nous l'avons constaté, c'est également dans cet ordre que croît la sensibilité du temps de génération et de la durée de la phase S aux conditions de température, ainsi que le coefficient de prolifération ou proportion de cellules en activité mitotique. Ces faits sont à mettre en relation avec l'état de différenciation des tissus étudiés. Le télencéphale qui présente la différenciation histologique la plus importante est caractérisé, au stade 34, par le coefficient de prolifération le plus faible et les durées du cycle mitotique et des phases G_1 et S les plus longues; inversement, le mésenchyme de la base du bourgeon de membre antérieur qui, au même stade, apparaît indifférencié, est caractérisé par le coefficient de prolifération le plus élevé et la durée du cycle mitotique et des phases G_1 et S les plus courtes. A cet égard, l'épithélium gastrique représente un cas intermédiaire. Ainsi, plus le degré de différenciation d'un tissu est élevé, plus la proportion des cellules en phase G_0 (repos mitotique) est importante et plus les phases G_1 et S sont longues. On peut donc mettre en relation l'allongement de ces deux phases avec un état de différenciation croissant. Passé un certain stade de spécialisation, les cellules qui n'élaborent plus que des protéines spécifiques et fonctionnelles cessent de se diviser; la phase G_0 dans laquelle elles sont bloquées pourrait être interprétée comme une phase G_1 indéfiniment prolongée.

Signification de l'indice de marquage et de l'indice mitotique. Lorsque la température s'élève de 12° C à 26° C, l'indice de marquage (tableau 5 et fig. 10) décroît régulièrement dans les 3 tissus étudiés; par contre, l'indice mitotique (tableau 7) présente sa valeur maximale à 17° C dans le mésenchyme de la base du bourgeon

Étude autoradiographique de l'influence de la température

de membre antérieur et l'épithélium gastrique et à 12° C dans le télencéphale. Les variations de ces indices ne sont donc pas représentatives de l'activité mitotique des tissus considérés puisque la vitesse de multiplication des cellules s'accélère rapidement lorsque la température s'élève. Néanmoins la connaissance simultanée de l'indice de marquage ou de l'indice mitotique et de la durée du cycle cellulaire et de ses phases permet de calculer le coefficient de prolifération.

Relation entre la vitesse du développement et la durée des cycles cellulaires. Nous avons montré qu'il existe un rapport constant et particulier à chaque tissu entre la vitesse du développement d'un embryon de Pleurodèle et le temps de génération de ses cellules. Il est donc probable que, dans les conditions normales, chaque stade est atteint après un nombre de divisions cellulaires déterminé et particulier à chaque organe ou à chaque tissu. Cette conception est en accord avec des observations analogues, faites par certains auteurs (Dettlaff, 1964; Rott et Shevelva, 1968), selon lesquelles l'apparition des fonctions nucléaires spécifiques au cours de la segmentation n'a lieu qu'après un nombre défini de divisions cellulaires particulier à chaque espèce. Ainsi, le début de la différenciation d'une cellule serait conditionné par le nombre des divisions qu'elle a subi, et interviendrait au moment où sont atteints certains degrés de ségrégation de ses éléments cytoplasmiques.

En conclusion, les populations cellulaires que nous avons étudiées croissent, en première approximation, selon une fonction exponentielle définie par la relation :

$$N(t) = N(0) \cdot (P+1)^{t/T}$$

L'action de la température ou de tout autre facteur sur la cinétique de telles populations dépend de leur double influence, d'une part sur la vitesse de multiplication des cellules, elle-même inversement proportionnelle au temps de génération (T), et d'autre part, sur le coefficient de prolifération (P) ou proportion de cellules activement engagées dans un cycle mitotique.

Or le coefficient de prolifération (P) des tissus embryonnaires de Pleurodèle est indépendant des conditions de température; cependant, sa valeur absolue, de laquelle dépend la base de la fonction exponentielle de croissance, varie de 0,37 à 0,88 selon l'état de différenciation du tissu considéré. En revanche, le temps de génération varie largement en fonction de la température; il est environ trois fois plus long à 12° C qu'à 26° C. La vitesse de multiplication des cellules est donc d'autant plus grande que la température est plus élevée dans l'intervalle compris entre 12° C et 26° C; en outre, elle est responsable, à elle seule, de la vitesse du développement des embryons jusqu'au stade étudié.

Bibliographie

- Agrell, I.: The thermal dependence of the mitotic stages during the early development of the sea urchin embryo. *Ark. Zool.* 11, 383—392 (1958).
 Baserga, R. A.: Mitotic cycle of ascites tumor cells. *Arch. Path.* 75, 156—161 (1963).
 Brown, R.: The effects of temperature on the different stages of cell division in root tip. *J. exp. Bot.* 2, 96—110 (1951).

- Brugal, G.: Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires: étude autoradiographique chez les embryons et les jeunes larves de *Pleurodeles wallii* Michah. (Amphibien, Urodèle). *Develop. Biol.* **24**, 301—321 (1971).
- Bertrandias, J. P.: Méthode mathématique d'évaluation du coefficient de prolifération dans les populations cellulaires embryonnaires en croissance exponentielle. *C. R. Acad. Sci. (Paris) D*, **270**, 1603—1606 (1970).
- Chibon, P.: Signification des variations périodiques de l'indice de marquage en fonction du temps dans les tissus embryonnaires. *C. R. Acad. Sci. (Paris) D*, **270**, 998—1001 (1970).
- Chibon, P., Brugal, G.: Etude autoradiographique de l'action de la thyroxine sur la durée des cycles mitotiques dans l'embryon âgé et la jeune larve de *Pleurodeles wallii* Michah. (Amphibien, Urodèle). *C. R. Acad. Sci. (Paris) D*, **269**, 70—73 (1969).
- Chulitskaya, E. V.: Onset of desynchronization and change in the rhythm of nuclear division in the cleavage period. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*. **173**, 163—166 (1967).
- Cleaver, J. E.: Thymidine metabolism and cell kinetics. *Frontiers of biology* (Neuberger, A., et Tatum E. L., eds.). Amsterdam: North-Holland Publishing Company 1967.
- Decker, R. S., Kollros, J. J.: The effect of cold on hind-limb growth and lateral motor column development in *Rana pipiens*. *J. Embryol. exp. Morphol.* **21**, 219—233 (1969).
- Defendi, V., Manson, L. A.: Analysis of the life-cycle in mammalian cells. *Nature (Lond.)* **198**, 359—361 (1963).
- Detlaff, T. A.: Cell division, duration of interkinetic states and differentiation in early stages of embryonic development. In: *Advances in morphogenesis* (Abercrombie, M., et Brachet, J., eds.), vol. 3, p. 323—362. New York-London: Academic Press 1964.
- Donnelly, G. M., Siskin, J. E.: RNA and protein synthesis required for entry of cells into mitosis and during the mitotic cycle. *Exp. Cell Res.* **46**, 93—105 (1967).
- Ephrussi, B.: Sur les coefficients de température des différentes phases de la mitose des oeufs d'oursins (*Paracentrotus lividus* LK.) et de *Ascaris megaloccephala*. *Protoplasma* **1**, 105—123 (1927).
- Evans, H. J., Savage, J. R. K.: The effect of temperature on mitosis and on the action of colchicine in root meristem cells of *Vicia faba*. *Exp. Cell Res.* **18**, 51—61 (1959).
- Fauré-Fremiet, E.: L'oeuf de *Sabellaria alveolata* L. *Arch. Anat. micr.* **20**, 211 (1924).
- Gallien, L., Durocher, M.: Table chronologique du développement de *Pleurodeles wallii*. *Bull. Biol. Fr. et Belg.* **91**, 97—114 (1957).
- Graham, C. F., Morgan, R. W.: Changes in the cell cycle during early Amphibian development. *Develop. Biol.* **14**, 439—460 (1966).
- Howard, A., Pelc, S. R.: Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity (Suppl.)* **6**, 261—273 (1953).
- Ignatieva, G. M., Kostomarova, A. A.: Duration of the mitotic cycle in the period of synchronous cleavage divisions (t_0) and its relationship to temperature in the loach embryo. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **168**, 330—333 (1966).
- Kauffmann, S. L.: Lengthening of the generation cycle during embryonic differentiation of the mouse neural tube. *Exp. Cell Res.* **49**, 420—424 (1968).
- Lovtrup, S.: Utilization of energy sources during Amphibian embryogenesis at low temperatures. *J. exp. Zool.* **140**, 383—394 (1959).
- Mazia, D.: Synthetic activities leading to mitosis. *J. cell. comp. Physiol.* **62** (Suppl. 1), 123—140 (1963).
- Neskovič, B. A.: Signs of activation of genes in developmental phases of L. strain cells. *Iugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta* **3**, 169—175 (1967).
- Peter, K.: Die Dauer indirekter Kernteilung bei Amphibien. *Z. Morph. Anthrop.* **24**, 23—26 (1924).
- Quastler, H., Sherman, F. G.: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.* **17**, 420—438 (1959).
- Rao, P. N., Engelberg, J.: HeLa cells: effects of temperature on the life cycle. *Science* **148**, 1092—1094 (1965).
- Mitotic duration and its variability in relation to temperature in HeLa cells. *Exp. Cell Res.* **52**, 198—208 (1968).

Étude autoradiographique de l'influence de la température

- Reddan, J. R., Rothstein, H.: Growth dynamics of an Amphibian tissue. *J. Cell Physiol.* **67**, 307—318 (1966).
- Rott, N. N., Sheveleva, G. A.: Changes in the rate of cell divisions in the course of early development of diploid haploid loach embryos. *J. Embryol. exp. Morphol.* **20**, 141—150 (1968).
- Shapiro, I. M., Lubinnikova, E. I.: Model of a stabilized cell population. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **169**, 467—469 (1966).
- Sisken, J. E., Morasca, L., Kibby, S.: Effect of temperature on the kinetics of the mitotic cycle of Mammalian cells in culture. *Exp. Cell Res.* **39**, 103—116 (1965).
- Starkey, W. E.: The migration and renewal of tritium labelled cells in the developing enamel organ of rabbits. *J. Brit. dental. Ass.* **115**, 143—163 (1963).
- Van't Hof, J., Ying, H. K.: Relationship between the duration of the mitotic cycle, the rate of cell production and the rate of growth of *Pisum* roots at different temperatures. *Cytologia (Tokyo)* **29**, 399—406 (1964).
- Vendrely, C., Chany, C., Robbe-Maridor, F.: Influence de la température sur la durée des phases du cycle de génération de cellules en cultures. *Bull. Cancer* **55**, 21—29 (1968).
- Wimber, D. E.: Duration of the nuclear cycle in *Tradescantia* root tips at three temperatures as measured with H³-thymidine. *Amer. J. Bot.* **53**, 21—24 (1966).

G. Brugal
Laboratoire de Zoologie
Institut de Recherches Biologiques
Université Scientifique et Médicale
F-38 Grenoble/France

CHAPITRE - IV -

MISE EN ÉVIDENCE DE FACTEURS ANTIMITOTIQUES (CHALONES) DANS LES TISSUS DIFFÉRENCIÉS

- EFFETS DES EXTRAITS BRUTS D'INTESTIN ET DE FOIE DE TRITON ADULTE SUR L'ACTIVITÉ MITOTIQUE DANS LES TISSUS CORRESPONDANTS DE L'EMBRYON

" Effects of adult intestine and liver extracts on the mitotic activity of corresponding embryonic tissues of Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibia, Urodela) "

- DÉBUT DE PURIFICATION DES EXTRAITS INTESTINAUX DE TRITON ADULTE. MISE EN ÉVIDENCE DE DEUX FACTEURS ANTIMITOTIQUES

" Existence of two chalone-like substances in intestinal extract from the adult newt, inhibiting embryonic intestinal cell proliferation "

- SPÉCIFICITÉ ZOOLOGIQUE DES CHALONES INTESTINALES

EFFECTS OF ADULT INTESTINE AND LIVER
EXTRACTS ON THE MITOTIC ACTIVITY OF
CORRESPONDING EMBRYONIC TISSUES OF
PLEURODELES WALTLII MICHAH.
(AMPHIBIA, URODELA)

G. BRUGAL

*Laboratoire de Zoologie,
Université Scientifique et Médicale de Grenoble, France*

(Received 29 January 1973; revision received 26 March 1973)

Cell renewal in many fully-differentiated tissues is thought to be controlled by local or systemic variations in the concentration of tissue-specific antimitotic factors described as 'chalones' (Bullough, 1965). These factors are synthesized by functional and non-proliferative differentiated cells and inhibit mitotic activity of stem cells (Kivilaasko & Rytömaa, 1971). In previous autoradiographic studies of cell proliferation in *Pleurodeles* embryos and young larvae (Brugal, 1971), we observed a lengthening of cell cycle phases and a decrease of growth fraction related to development and cell differentiation. The question which arises is: could coordination and regulation between mitotic activity and differentiation in rapidly proliferating embryonic cell populations also be achieved by a feedback mechanism similar to that involved in the steady state cell populations of adult animals (Chopra & Simnett, 1969)?

In order to reply to this question, the intestine and liver were removed from adult *Pleurodeles* previously perfused with Holtfreter solution. After dissection, the organs were frozen, weighed and homogenized with four times their weight of ice-cold Holtfreter solution in a Potter homogenizer. After centrifugation (1000 g for 10 min), the clear supernatant was pipetted out into ampoules, freeze-dried and stored for 24 hr before utilization. *Pleurodeles* embryos, reared up to stage 34 (Gallien & Durocher, 1957) (just before hatching) at 20°C, and kept at this temperature during experiments, were distributed into three groups of thirty animals each. Embryos of the first group received a 10⁻³ ml intraperitoneal injection of aqueous extract obtained from intestine; the second group received the same amount of liver extract and the third group (control embryos) received the same amount of Holtfreter solution (solvent alone). At different time intervals after

Correspondence: Dr G. Brugal, Laboratoire de Zoologie, Université Scientifique et Médicale de Grenoble, BP 53, 38041 Grenoble-Cedex, France.

G. Brugal

injection, three embryos of each group were transferred in colchicine (0.5%) used as metaphase arrest agent and kept in it for 3 hr before they were fixed in Smith fluid. Embryos were then embedded in paraffin, sectioned serially at 5 μm and stained in Schiff's reagent (Feulgen stain). Arrested metaphases were counted in 3000–5000 cells per specimen of tissue in intestinal epithelium, liver and metencephalon of all embryos. Furthermore, thirty embryos at stage 34, from the same laying, were injected with 2×10^{-4} ml of tritiated thymidine (concentration: 100 $\mu\text{Ci/ml}$, specific activity: 5 Ci/mM) in order to measure the duration of the cell cycle and its phases in intestine and liver. Histological slides of these embryos, prepared and stained as described above, were covered with Ilford L₄ emulsion and developed after 50 days exposure. At different time intervals after ³H-thymidine injection, the percentage of labelled mitoses was calculated after a counting of 100–150 mitoses. The duration of the cell cycle in the intestine and liver was determined according to the method of Quastler & Sherman (1959). The results are shown in Table 1. Variations of mitotic index (MI) during the 32 hr following injection of intestine or liver extracts or solvent alone, are shown in Table 2 and Fig. 1 for metencephalon, intestine and liver.

TABLE 1. Durations of the cell cycle and its phases in intestine and liver of *Pleurodeles* embryos reared up to stage 34 at 20°C

Tissue	Duration (hr)				
	G ₁	S	G ₂	M	T
Intestine	2	24	1	2	29
Liver	2	25	1	2	30

In the metencephalon there is no significant difference between control embryos and those treated with intestine or liver extracts. It is then obvious (Fig. 1) that no unspecific stimulating or cytotoxic effect of extracts or solvent on cell proliferation is revealed. During the 32 hr the metencephalon seems to show a 24 hr periodicity with a highest mitotic activity at 18.00 hours and a lowest one at 08.00 hours.

In the intestine there is no significant difference between control embryos and those treated with liver extract (Fig. 1). In both cases, the MI greatly decreases from stage 34 to stage 35. This decrease is related to a noteworthy diminution previously described (Brugal, 1971) in the growth fraction of the epithelial gut cell population during the same period. Such a fall in mitotic activity accompanies great histological progress of cell differentiation and precedes hatching and feeding. In embryos treated with adult intestine extract, we observed a precocious decrease of intestinal MI in comparison to the decrease already described in control embryos (Fig. 1). This diminution of intestinal MI, which takes place between the third and the eleventh hour after injection, is followed by a subsequent increase up to the normal value which is reached about 15 hr after injection. The maximal inhibitory effect is observed at the eleventh hour at which time the MI value is $44.8\%_{00} \pm 0.5$ in control and $23.1\%_{00} \pm 0.7$ in embryos treated with intestine extract: this difference corresponds to a 48% inhibition of mitotic activity. From the twenty-first to

Mitotic activity of embryonic tissues

TABLE 2. Mitotic index (%) and standard error in embryonic tissues of *Pleurodeles* at different time intervals after injection of extract of homologous adult tissues

Embryonic tissues scored	Hours after injection	Solvent alone (control)	Intestine extract	Liver extract
Metencephalon	3	36.8 ± 0.7	37.5 ± 0.5	37.9 ± 0.7
	5	37.5 ± 0.7	38.1 ± 0.6	38.3 ± 0.8
	8	38.0 ± 0.8	38.5 ± 0.5	38.0 ± 0.7
	11	37.2 ± 0.7	36.5 ± 0.5	36.3 ± 0.7
	13	34.7 ± 0.5	35.1 ± 0.7	34.0 ± 0.7
	15	33.4 ± 0.7	33.8 ± 0.5	32.6 ± 0.5
	21	31.9 ± 0.5	32.5 ± 0.8	31.6 ± 0.5
	26	33.6 ± 0.7	34.4 ± 0.8	34.0 ± 0.9
	32	36.2 ± 0.7	36.8 ± 0.5	37.1 ± 0.9
	Intestine	3	47.6 ± 0.4	45.4 ± 0.6*
5		46.8 ± 0.6	41.9 ± 0.6*	46.9 ± 0.4
8		46.3 ± 0.4	35.1 ± 0.7*	46.4 ± 0.4
11		44.8 ± 0.5	23.1 ± 0.7*	45.0 ± 0.5
13		41.1 ± 0.6	23.8 ± 0.8*	41.4 ± 0.5
15		36.0 ± 0.7	33.1 ± 0.7*	35.6 ± 0.7
21		25.8 ± 0.9	27.4 ± 0.8	26.1 ± 0.7
26		22.8 ± 0.7	26.7 ± 0.8*	22.3 ± 0.7
32		23.3 ± 0.7	27.4 ± 0.9*	22.8 ± 0.9
Liver		3	25.3 ± 0.6	25.8 ± 0.7
	5	25.4 ± 0.7	25.9 ± 0.7	16.3 ± 1.1*
	8	24.7 ± 0.7	25.3 ± 0.8	9.7 ± 0.9*
	11	24.1 ± 0.7	24.5 ± 0.7	15.2 ± 0.9*
	13	23.4 ± 0.9	23.7 ± 0.9	22.3 ± 0.9
	15	22.5 ± 0.8	21.9 ± 0.9	22.4 ± 0.8
	21	21.2 ± 0.8	21.8 ± 0.7	22.1 ± 0.5
	26	21.3 ± 0.8	21.9 ± 0.9	20.1 ± 0.7
	32	22.0 ± 0.9	22.5 ± 0.9	19.8 ± 0.7

* Indicates significant ($P < 0.01$) difference between MI of control embryos and that of embryos treated with a tissue extract.

the thirty-second hour after injection, the MI in intestine extract treated embryos remains higher than in control embryos. This subsequent increase, in comparison to control, may be due to the division of cells which have been previously prevented from entering mitosis.

In the liver, no significant difference is observed between variations of MI in control embryos and those treated with intestine extract, whereas a mitotic depression is noticed from the third to the eighth hour after injection in the embryos treated with liver extract (Fig. 1). The lowest liver MI is observed at the eighth hour and reaches down $9.7\% \pm 0.9$ instead of $24.7\% \pm 0.7$ in liver of control embryos: this difference corresponds to a 61% inhibition of mitotic activity. During the six following hours the liver MI in treated embryos increases and reaches the normal value 13 hr after injection. A statistically non-significant ($P < 0.05$) second decrease of liver MI in liver extract treated embryos is observed from the twenty-sixth to the thirty-second hour.

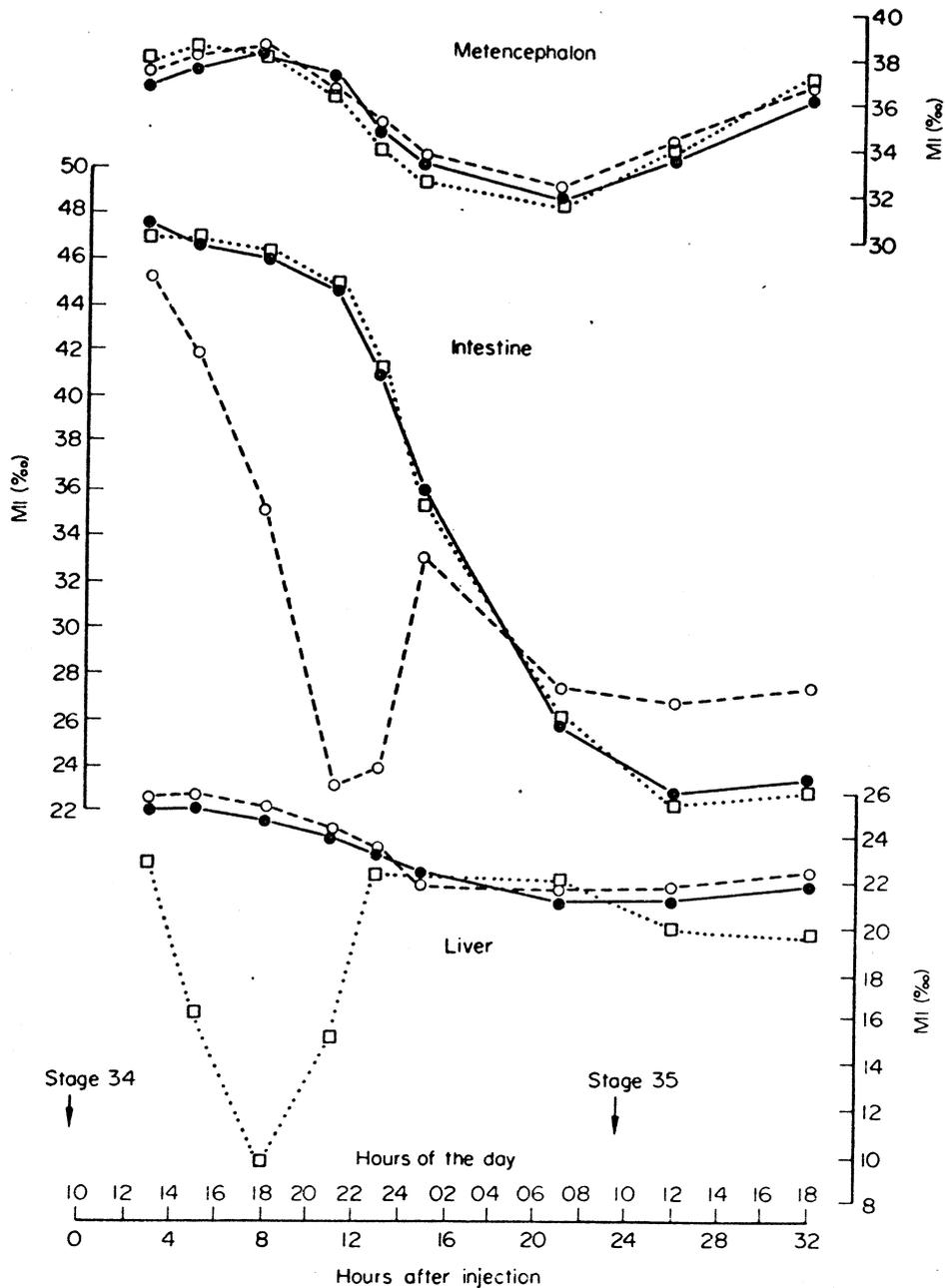
G. Brugal

FIG. 1. Variations of the mitotic index (MI) in metencephalon, intestine and liver of *Pleurodeles* embryos stage 34 after injection at $t = 0$ of adult intestine extract (○), adult liver extract (□) or solvent alone (●). Embryos were treated during 3 hr with colchicine before fixation in order to enhance the number of metaphase plates.

In embryonic liver and intestine, the labelled mitoses curves we obtained were similar to those previously described (Brugal, 1971) and allowed an accurate graphical estimation of the duration of the cell cycle phases (Table 1). In these tissues, as in all other ones studied in old embryos of Amphibia (Chibon, 1968; Chibon & Dournon, 1972), the S phase is very long, especially when compared with the other phases of the cell cycle.

The results we obtained show that aqueous extracts from intestine and liver of adult *Pleurodeles* contain a soluble factor which inhibits the mitotic activity in corresponding

Mitotic activity of embryonic tissues

embryonic tissues. There is, today, much evidence that cell proliferation homeostasis in adult liver is effected by one (or more) mitotic inhibitor(s) (Saetren, 1956; Scaife, 1970; Stich & Florian, 1958; Verly *et al.*, 1971) and mitotic depression have been obtained in embryonic liver of chicks treated with a nuclear fraction of adult hen liver extract (Tumanishvili, Koslova & Salamatina, 1968). On the contrary, only recent X-irradiation experiments yield indirect evidence to substantiate a feedback control of cell proliferation involving mitotic inhibitors in intestinal epithelium of adult rat (Galjaard, Meer-Fiegggen & Giesen, 1972). In our experiments, the mitotic depression becomes evident 3 hr after the injection of extract, both in liver and intestine. We conclude from this observation that the first cells prevented from dividing are those which were at the beginning of the G_2 phase at the time of injection because the duration of $G_2 + M$ phases is 3 hr in both tissues as shown in Table 1. Since G_2 inhibitors have also been described in adult mouse epidermis (Elgjo, Laerum & Edgehill, 1971; Marks, 1971) and may be synthesized by proliferating basal cells themselves, the question is raised whether the intestinal and liver mitotic inhibitors involved in our experiments are produced by functional cells or dividing cells. From the third to the eleventh hour in intestine or the eighth hour in liver, the mitotic depression becomes greater and greater. We believe that this inhibition period is about as long as the availability time of inhibiting tissue factor(s) in the organism. The gradual decrease of MI during this period is due to the addition of the metaphase arresting effect of colchicine to the extracts inhibiting effect. Thus, at the end of the availability time of the inhibiting factor(s), cell division normally occurs and MI will rise up to the control value.

In the last 12 hr of experiments, we observed that the intestinal MI of embryos treated with adult intestine extract becomes higher than that of control embryos. This increase suggests that the cells (or most of them) stopped in the G_2 phase are not definitively prevented from dividing but are only delayed in this phase and start to divide afterwards. Such a subsequent MI increase has not been observed in adult mouse epidermis after inhibition of cell proliferation by an aqueous skin extract (Elgjo, 1969); it is thus believed that in this latter tissue the mitotic inhibition of a cell is followed by its differentiation. A similar phenomenon perhaps occurs in embryonic *Pleurodeles* liver because an overshoot of MI does not appear either in this tissue during the last 12 hr of experiment in embryos treated with adult liver extract. On the contrary, a second wave of mitotic depression is noticed from the twenty-sixth hour; this depression is not statistically significant ($P < 0.05$) but, if one fixes a less exacting level of probability, it could result from inhibition of cells in G_1 phase, for cells which would be prevented from dividing 26 hr after injection are those which were at the end of G_1 phase at the time of administration of extract ($S + G_2 = 26$ hr, as shown in Table 1).

These preliminary experiments which show that tissue-specific mitotic inhibitors are synthesized in adult tissues and are able to act *in vivo* on corresponding embryonic tissues, suggest that such inhibitors may be involved in the gradual decrease of cell proliferation in the course of embryonic and larval development. Other experiments are therefore being performed in order to seek these inhibiting factors in embryonic tissues themselves, and to pinpoint their possible increasing level in relation to the diminution of mitotic rate and growth fraction in the course of differentiation. The mode of action of such inhibiting factor(s) has to be corroborated and specified through other experiments.

G. Brugal

REFERENCES

- BRUGAL, G. (1971) Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires: étude autoradiographique chez les embryons et les jeunes larves de *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien, Urodèle). *Develop. Biol.* **24**, 301.
- BULLOUGH, W.S. (1965) Mitotic and functional homeostasis. *Cancer Res.* **25**, 1683.
- CHIBON, P. (1968) Etude au moyen de la thymidine tritiée de la durée des cycles mitotiques dans la jeune larve de *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien Urodèle). *C.R. Acad. Sci., Paris, D.* **267**, 203.
- CHIBON, P. & DOURNON, C. (1972) Etude autoradiographique de quelques paramètres de la prolifération cellulaire pendant la métamorphose naturelle du crapaud *Bufo bufo* L. *C.R. Acad. Sci., Paris, D.* **275**, 255.
- CHOPRA, D.P. & SIMNETT, J.D. (1969) Demonstration of an organ-specific mitotic inhibitor in amphibian kidney. *Exp. Cell Res.* **58**, 319.
- ELGJO, K. (1969) Epidermal cell proliferation during the first 24 hours after injection of an aqueous skin extract (chalone). *Virchows Arch., Abt. B, Zellpath.* **4**, 119.
- ELGJO, K., LAERUM, O.D. & EDGEHILL, W. (1971) Growth regulation in mouse epidermis. I: G₂ inhibitor present in the basal layer. *Virchows Arch., Abt. B, Zellpath.* **8**, 277.
- GALJAARD, H., MEER-FIEGGEN, W. & GIESEN, J. (1972) Feedback control by functional villus cells on cell proliferation and maturation in intestinal epithelium. *Exp. Cell Res.* **73**, 197.
- GALLIEN, L. & DUROCHER, M. (1957) Table chronologique du développement de *Pleurodeles waltlii*. *Bull. Biol. Fr. Belg.* **91**, 97.
- KIVILAASKO, E. & RYTÖMAA, T. (1971) Erythrocytic chalone, a tissue-specific inhibitor of cell proliferation in erythron. *Cell Tissue Kinet.* **4**, 1.
- MARKS, F. (1971) Direct evidence of two tissue-specific chalone-like factors regulating mitosis and DNA synthesis in mouse epidermis. *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* **352**, 1273.
- QUASTLER, H. & SHERMAN, F.G. (1959) Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.* **17**, 420.
- SAETREN, H. (1956) A principle of auto-regulation of growth. Production of organ-specific mitose inhibitors in kidney and liver. *Exp. Cell Res.* **11**, 229.
- SCAIFE, J.F. (1970) Liver homeostasis: an *in vitro* evaluation of a possible specific chalone. *Experientia*, **26**, 1071.
- STICH, H.F. & FLORIAN, M.L. (1958) Presence of a mitosis inhibitor in the serum and liver of adult rats. *Canad. J. Biochem. Physiol.* **36**, 855.
- TUMANISHVILI, D., KOZLOVA, N.V. & SALAMATINA, N.V. (1968) On the theory of intratissue control of the rate of cell proliferation. *J. gen. Biol.* **29**, 711.
- VERLY, W.G., DESCHAMPS, Y., PUSHPATHADAM, J. & DESROSIER, M. (1971) The hepatic chalone. I. Assay method for the hormone and purification of the rabbit liver chalone. *Canad. J. Biochem.* **49**, 1376.

Cell Tissue Kinet. (1975) 8, 171-187.

EXISTENCE OF TWO CHALONE-LIKE SUBSTANCES IN INTESTINAL EXTRACT FROM THE ADULT NEWT, INHIBITING EMBRYONIC INTESTINAL CELL PROLIFERATION

G. BRUGAL AND J. PELMONT

*Laboratoire de Zoologie et CERMO, Université Scientifique et Médicale
de Grenoble, France*

(Received 16 July 1974; revision received 18 October 1974)

ABSTRACT

The inhibiting effect of tissue extract from fully differentiated intestinal mucosa of adult animals on proliferation kinetics of exponentially growing embryonic epithelial gut cell populations was studied in the newt *Pleurodeles waltlii*. Crude extract was fractionated by G-200 Sephadex chromatography and the effect of fractions on cell proliferation was studied using both mitotic index and ^3H -thymidine incorporation methods. The inhibitions we obtained were then displayed by means of cytophotometric study of age distribution of intestinal gut cells around the cell cycle, measuring the Feulgen-DNA content. The results revealed the presence of two chalone-like substances in the intestine of adults. One (factor 1) is characterized by a molecular weight of between 120,000 and 150,000 and inhibits the cell cycle at the end of the G_1 phase, the other (factor 2) is characterized by a molecular weight lower than 2000 and inhibits the cell cycle in the course of the G_2 phase. The cells delayed in the G_2 phase escape from inhibition but the cells delayed in the G_1 phase do not, although availability time of both factor 1 and factor 2 is about 12 hr. It is thus thought that cells prevented from dividing in G_1 phase are indefinitely delayed in this phase and possibly differentiate.

INTRODUCTION

It has long been suggested that cell proliferation is controlled by mitotic inhibitors (Weiss & Kavanau, 1957). Such antimitotic factors, described as 'chalones' (Bullough, 1965), have been found in several cell renewal systems (Houck & Hennings, 1973). Two different types of chalones acting respectively on G_1 and G_2 phases of the cell cycle have been described; both are present in epidermis and act on epidermal cells (Elgjo, Laerum & Edgehill, 1971, 1972). At present no chalone is completely purified, but some of them are

Correspondence: Dr G. Brugal, Laboratoire de Zoologie, Université Scientifique et Médicale de Grenoble, BP 53, 38401 Grenoble-Cedex, France.

partially characterized with respect to their chemical and physical properties (for review articles, see *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 38, 1973).

In previous autoradiographic studies of cell proliferation kinetics in pleurodele embryos and young larvae (Brugal, 1971), we observed a lengthening of cell cycle and a decrease of growth fraction related to development and differentiation. This raised the question whether the cell proliferation decrease during embryonic development could also be mediated by a mechanism similar to the chalone inhibition involved in the steady state cell populations of adult animals? Preliminary experiments have shown that tissue specific inhibitors are synthesized in fully differentiated intestinal epithelium and liver and are able to delay transiently the cells in G₂ phase in corresponding embryonic tissues (Brugal, 1973). This paper described an attempt to fractionate adult intestinal extract in order to determine how many antimitotic factors are involved in the inhibition of cell kinetics previously observed and to estimate their molecular weights.

Since a number of criticisms have been made of the interpretation of the apparent chalone inhibition assumed from mitotic index counting or ³H-TdR incorporation techniques (Houck & Hennings, 1973), we have performed a cytophotometric study of cell proliferation kinetics in treated animals, in addition to the classical experimental procedures mentioned above. Cytophotometry of nuclei Feulgen-DNA content is indeed designed for the purpose of displaying the inhibition and subsequent accumulation of cells in any phase of the cell cycle.

MATERIALS AND METHODS

Tissue extracts

All procedures were performed at 4°C. The intestines were removed under MS 222 anaesthesia from four adult pleurodeles previously perfused with heparinized Holtfreter solution (heparin Fournier: 0.5 g/l). This perfusion was performed to eliminate circulating stress hormones which are known to be mitotic depressors. After removal, intestines were washed in ice-cold Holtfreter solution buffered with sodium phosphate 10⁻² M (HOP buffer). They were then opened and epithelial gut cells were scraped out with a scalpel and homogenized in a Potter-Elvehjem homogenizer with 2 ml of sterile HOP buffer. The homogenate was centrifuged (100,000 g, 20 min) and the supernatant was stored at 4°C until it was used few hours later.

Sephadex chromatography

A 1 ml sample of supernatant, mixed with a drop of Dextran blue (Pharmacia), was placed on the top of a G-200 Sephadex column (40–120 μm diameter particle). A small size column was chosen (28 cm × 1.5 cm²) to avoid excessive dilution of the factors. Elution was performed at 4°C with HOP buffer. Forty-four fractions of 1 ml were collected after emergence of the Dextran blue peak (fraction number 1). The gel column was standardized under the same conditions by chromatography of 1 ml sample of a mixture of Dextran blue and proteins of known molecular weights: β-galactosidase from *Escherichia coli*, 520,000 (Ullmann *et al.*, 1968), glucose oxydase, 154,000 (Swoboda & Massey, 1965), alkaline phosphatase from calf intestine, 115,000 (Andrews, 1964), and cytochrome C, 12,400 (Margoliash *et al.*, 1961). The eluted peaks of these proteins are plotted in Fig. 11. It was

assumed for Sephadex chromatography (Andrews, 1964) that the molecular weight is a logarithmic function of the elution volume. Therefore the standardization curve was plotted against fraction number in Fig. 11.

Assay methods

The effect of the fractions on cell proliferation was tested *in vivo* in telencephalon and intestine of pleurodele embryos reared up to stage 34 (Gallien & Durocher, 1957) at 20°C and kept at this temperature during experiments. Embryos were divided into forty-four groups of eight animals. Each group was treated with one of the fractions injected intraperitoneally into the embryos (10^{-3} ml/animal). In addition, eight embryos, considered as controls, were injected under the same conditions with HOP buffer alone.

Two embryos of each group were fixed in Smith's fluid, the first 5 hr and the second 26 hr after injection. Intestine and telencephalon were excised and squashed separately between a slide and a coverslip. After removal of the coverslip, the slides were stained for 1 hr in Feulgen stain (Gurr) after hydrolysis in 6 N HCl for 1 hr (20°C).

Mitotic indices (MI) were calculated in telencephalon and intestine of embryos by counting 1800–3200 cells per tissue and per embryo, using a projecting microscope.

Liquid scintillation counting of thymidine incorporation

Twenty-four hours after injection of fractions, the six remaining embryos in each group were injected i.p. with 2×10^{-4} ml of tritiated thymidine (concentration: 200 μ Ci/ml, specific activity: 12 Ci/mM). Since availability of injected thymidine is known to last about 1 hr (Chibon & Brugal, 1973), these embryos were fixed in liquid nitrogen 2 hr after 3 H-TdR injection, i.e. 26 hr after injection of fractions. The embryos were washed for 4 hr and then the intestine of each one was removed. The group of six intestines and the remainder of the six embryos from each group were homogenized separately in 5% trichloroacetic acid and centrifuged. The precipitates were washed in ether, dried at 70°C for 4 hr, weighed, dissolved in Soluene 100 (Packard) and mixed with 15 ml of toluene scintillator (4 g PPO, 0.1 g dimethyl POPOP, 1 litre toluene). Radioactivity of each sample was measured in a liquid-scintillation spectrometer (Packard Tri-Carb). Activities were expressed in dpm/mg of TCA precipitate dry weight. The effect of fractions on the incorporation of 3 H-TdR in embryos of each group was expressed by the ratio between intestine activity and total body activity ($\times 100\%$).

Cell proliferation kinetics in intestinal epithelium of embryos

In order to obtain estimates of the cell-cycle parameters in embryonic intestine at both stage 34 and stage 35 (reached 26 hr later), thirty embryos of both stages were injected with 2×10^{-4} ml of tritiated thymidine (concentration: 100 μ Ci/ml, specific activity: 5 Ci/mM). At different time intervals from 1 hr to 36 hr after injection of 3 H-TdR, embryos were fixed in Smith's fluid, embedded in paraffin, sectioned serially at 5 μ m and stained in Feulgen reagent. The slides were then coated with Ilford L4 emulsion and developed after 45–65 days exposure. After counting 100–150 mitoses in the intestine of each embryo, the percentage of labelled mitoses was plotted against time (PLM curve) at stages 34 and 35 (Fig. 1). Estimations of the durations of the cell cycle phases were made according to the method of Quastler & Sherman (1959).

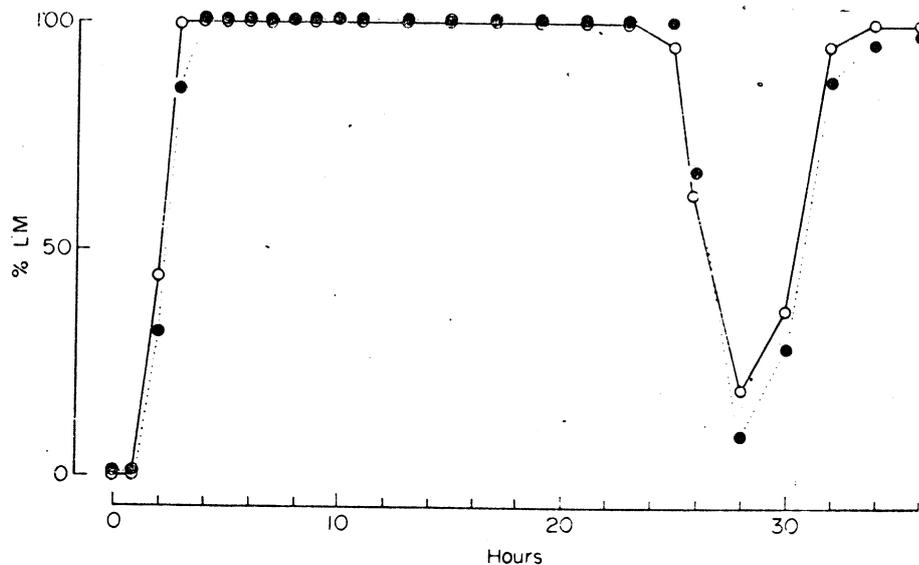


FIG. 1. Percentage of labelled mitoses (PLM curve) in intestine of pleurodele embryos reared up to stage 34 (○) and stage 35 (●) at the temperature of 20°C and injected i.p. with $^3\text{H-TdR}$ at the beginning of both stages.

Cytophotometric studies

Age distribution of cells in the cycle was studied in the intestine of the embryos fixed 5 hr and 26 hr after injection of fractions, 1, 9 and 37. Measurement of nuclear DNA content was made using a Leitz MPV microphotometer. Two measurement methods were applied successively to about 1000–1300 nuclei/intestine of each embryo:

(1) the one-wave length, two-area method of Garcia & Iorio (1966) at 543 ± 10 nm using a 105 \times fluorite oil-immersion objective (N.A.: 1.32) in a transmitted light system with a 60 W quartz-iodine lamp;

(2) the microfluorometric method with the same objective in an incident light system (Leitz Opak) with a 100 W mercury lamp (Excitation filter: JENAer Glaswerk 576 nm; optical filter: 620 nm). The fluorescence fading was less than 5% per minute and each measurement lasted 3 sec.

Because of the large size of pleurodele nuclei (8–15 μm diameter), the ratio between values of DNA content obtained from these methods was nearly constant with a maximal systematic difference of less than 16% for the most heterogenous nuclei. The average between measurements performed by the two procedures was considered to be representative of the DNA content expressed in arbitrary units.

RESULTS

Kinetics of epithelial gut cell proliferation

Kinetics of intestinal cell proliferation from stage 34 to stage 35 is inferred from PLM curve and mitotic index studies. Graphical estimation of the average durations of the cell cycle phases (Fig. 1) gives the following values for both stage 34 and 35: $T_c = 29$ hr, $G_1 = 2$ hr, $S = 24$ hr, $G_2 = 1$ hr and $M = 2$ hr. Nevertheless, the MI is lower in the intestine of control embryos stage 35 than in that of control embryos stage 34 as shown in

TABLE 1. Mitotic index in the telencephalon and the intestine of control embryos injected with HOP buffer. Injection has been performed at the beginning of stage 34 but embryos sacrificed 26 hr later have reached stage 35.

Hours after injection	Mitotic index \pm standard deviation (‰)	
	Intestine	Telencephalon
5	27.9 \pm 0.8	22.3 \pm 0.9
26	19.3 \pm 1.7	21.3 \pm 0.6

Table 1. It is clear from this result that a marked decrease of mitotic activity takes place between stage 34 and stage 35. Since cell cycle duration remains the same during this period, it is obvious that the diminution of mitotic activity is related to a decrease of growth fraction. Nevertheless, the phase of the cell cycle in which are blocked the cells thus prevented from dividing cannot be known from study of MI and PLM curve. The growth fraction (P) is given by $P = e^{MI/(M/T_c)}$ derived from a mathematical model previously established for exponential growing cell populations of embryos (Brugal & Bertrandias, 1970). Thus the calculated intestinal P values are $P = 0.500 \pm 0.020$ at stage 34 and $P = 0.325 \pm 0.035$ at stage 35. This decrease already described (Brugal, 1971) accompanies great progress of the differentiation of epithelial gut cells and precedes hatching and feeding. Since growth fraction and durations of cell cycle phases are known, the fraction of the intestinal cell population in each phase of the cycle (phase index) is given by the following equations derived from our mathematical model (Brugal & Bertrandias, 1970): $MI = (P + 1)^{M/T_c} - 1$; $G_2I = (P + 1)^{(M+G_2)/T_c} - (P + 1)^{M/T_c}$; $SI = (P + 1)^{(M+G_2+S)/T_c} - (P + 1)^{(M+G_2)/T_c}$; $G_1I = (P + 1) - (P + 1)^{1-(G_1/T_c)}$; $G_0I = 1 - P$ and $(G_1 + G_0)I = 2 - (P + 1)^{1-(G_1/T_c)}$. The calculated values of these indices are shown in Table 2.

TABLE 2. Proportions of epithelial gut cells in each phase of the cell cycle in the intestine of embryos. Proportions of cells in the control embryos injected with HOP buffer alone are calculated from MI and P values. Proportions of cells in embryos treated with fractions 1, 9 and 37 are estimated graphically from corresponding normalized histograms.

Hours after injection	Injected fraction no.	Number of measured nuclei	Proportion of intestinal cells in phase \pm standard deviation (%)				Fig.
			M	G ₂	S	G ₁ + G ₀	
5	HOP buffer alone		27.9 \pm 0.8	13.5 \pm 0.5	415.8 \pm 16.7	541.4 \pm 18	
	1	1137	28.1 \pm 1.2	14.9 \pm 1.7	436.2 \pm 20.1	520.7 \pm 21	5
	9	1158	29.4 \pm 0.9	15.5 \pm 1.8	346.3 \pm 19.6	608.8 \pm 12.4	
	37	1274	8.6 \pm 2.0	76.1 \pm 5.1	433.3 \pm 18.0	482.0 \pm 16.8	9
26	HOP buffer alone		19.3 \pm 1.7	10.5 \pm 0.5	270 \pm 30	700.5 \pm 32	
	1	1029	20.4 \pm 1.3	12.6 \pm 1.1	305.2 \pm 21.6	661.8 \pm 17	6
	9	1309	9.9 \pm 1.7	6.1 \pm 1.9	84.0 \pm 27.2	899.9 \pm 11.1	8
	37	1026	25.3 \pm 0.9	21.4 \pm 1.3	323.6 \pm 19.7	629.6 \pm 17.7	10

Effects of fractionated tissue extract on mitotic index

In embryos sacrificed 5 hr after injection of the fractions (Fig. 2), a depression of MI was observed in the intestine of animals injected with fractions 35–40. In the intestine of embryos treated with fraction 37, this diminution corresponds to a 63% inhibition of mitotic activity compared to controls ($p < 0.01$). On the other hand, the MI in the intestine of embryos treated with other fractions ($28.3 \pm 1.2\%$) did not differ from that of the controls ($27.9 \pm 0.8\%$). The MI in telencephalon does not exhibit any significant change whatever fraction was injected and did not differ from that of the controls ($22.3 \pm 0.9\%$).

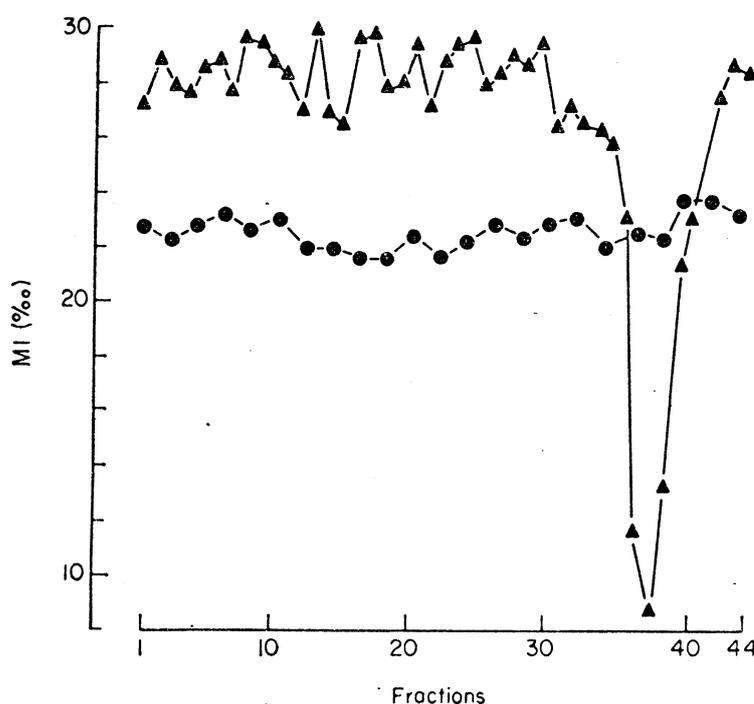


FIG. 2. Mitotic indices in telencephalon (●) and intestine (▲) of pleurodele embryos 5 hr after injection, at stage 34, of adult intestinal extract fractionated by Sephadex chromatography.

In embryos sacrificed 26 hr after injection of the fractions (Fig. 3) a significant decrease in MI was observed in the intestine of animals injected with fractions 8–10. In embryos treated with fraction 9 this decrease corresponds to a 47% inhibition of mitotic activity compared to controls ($p < 0.01$). Moreover, embryos treated with fractions 36–39 exhibited a significantly higher intestinal MI than that of the controls. In embryos injected with other fractions, the intestinal MI ($19.9 \pm 0.9\%$) did not differ statistically from that of the controls ($19.3 \pm 1.7\%$). Whatever fraction had been injected, no change of MI was observed in telencephalon of treated embryos when compared to the controls ($21.3 \pm 0.7\%$).

These results strongly suggest that two mitotic inhibitors are contained in the intestinal tissue extract of the adult pleurodele. One (factor 1) is eluted with fractions 8–10 and exhibits antimutagenic effect 26 hr after it has been injected; the other (factor 2) is eluted with fractions 35–40 and shows its effect on MI 5 hr after injection.

Effects of fractionated tissue extract on thymidine incorporation

The relative amount of ^3H -TdR incorporated during 2 hr in the intestine of embryos is shown in Fig. 4. The ratios were scattered on both sides of $31.0 \pm 5.1\%$ value which was

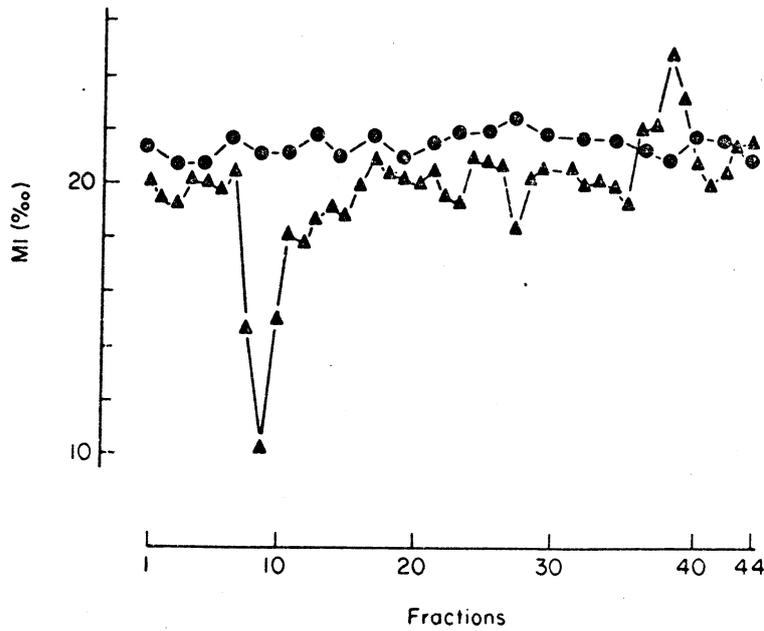


FIG. 3. Mitotic indices in telencephalon (●) and intestine (▲) of pleurodele embryos 26 hr after injection, at stage 34, of adult intestinal extract fractionated by Sephadex chromatography.

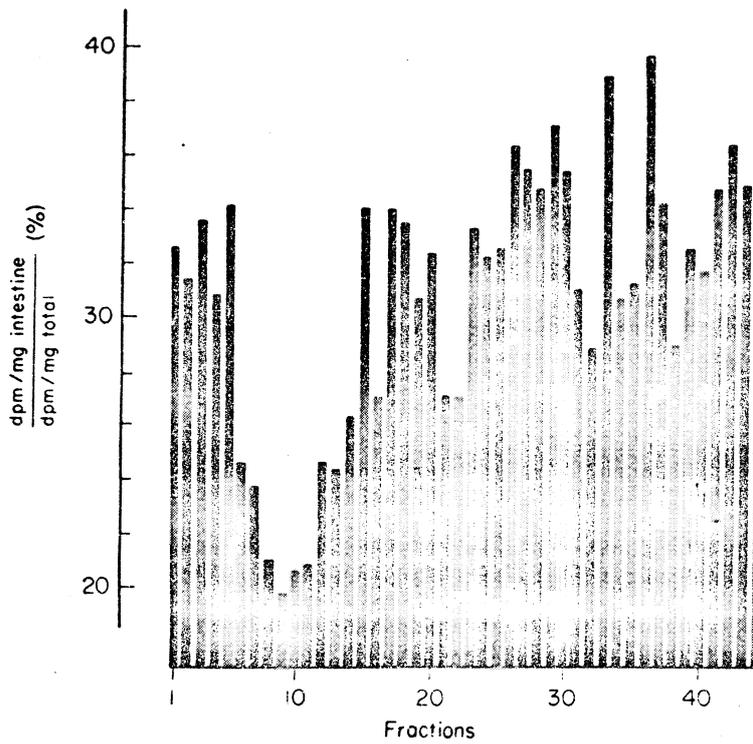


FIG. 4. Incorporation of ^3H -TdR in intestine of pleurodele embryos 26 hr after injection, at stage 34, of adult intestinal extract fractionated by Sephadex chromatography. ^3H -TdR was injected i.p. 2 hr before sacrifice and activities were measured by liquid scintillation counting.

not significantly different from the control group of embryos ($33.7 \pm 1.8\%$). Nevertheless, analysis of variances shows that the relative thymidine incorporation in the intestine of embryos treated with fractions 8–11 was significantly lower than in the intestine of all other embryos ($p < 0.01$). We conclude from this result that intestinal DNA synthesis is depressed 26 hr after injection of fractions 8–11. Moreover, no significant change was noticed in the intestine of embryos treated with fractions 35–40 although they exhibited a mitotic depression 5 hr after injection of these fractions and a mitotic overshoot 26 hr later.

Since 26 hr is the duration of $S + G_2 + \frac{1}{2} M$, it is assumed from thymidine incorporation and MI experiments that intestinal cells are delayed in G_1 phase by factor 1 contained in fractions around fraction 9, and are delayed in G_2 phase by factor 2 contained in fractions around fraction 37. Nevertheless, cytophotometric measurements of DNA content of nuclei were necessary in order to display such an inhibition either in G_1 or in G_2 phase.

Cytophotometric results

Histograms of DNA content in intestinal nuclei are shown in Figs. 5–10 for embryos sacrificed 5 hr and 26 hr after injection of fractions 1, 9 and 37. DNA content frequencies are distributed within two modes separated by a low frequency band. Modes are settled around two mean DNA contents. The lower one corresponds to the average DNA content of G_1 and G_0 cell nuclei, and the other one, which is twice the first, corresponds to the average DNA content of G_2 and M cells. Intermediate values correspond to S cells.

In order to normalize these histograms to a total population size of unity, they were transformed into histograms in which fractions of the population in each phase of the cycle are represented by columns whose widths equal the duration of the corresponding phase and areas equal the proportion of the cell population in this phase. Fractions of the population in G_2 and M phases are respectively represented by single columns. The S cells are distributed into thirteen columns of gradually increasing DNA content; the width of each is equal to the thirteenth part of the total S duration and its area is equal to the proportion of S cells in every one of the thirteen groups of 10 units of DNA content graded from diploid to tetraploid nuclei. Because of the inability of Feulgen-DNA cytophotometry to discriminate between G_1 and G_0 cells, the proportion of the cell population in the diploid state is represented by the area of a single column with arbitrary width and height chosen in order to facilitate graphical comparisons.

Embryos treated with fraction 1

Histograms of DNA content of epithelial gut cells and the corresponding normalized histograms plotted from the intestine of embryos injected with fraction 1 are shown in Figs. 5 and 6. It is assumed from our mathematical model (Brugal & Bertrandias, 1970) that the fraction of the total cell population $F(t)$ at time (t) of the cell cycle is given by the following distribution function: $F(t) = \log(P+1)/T_c \cdot e^{-t/T_c \log(P+1)}$ for $0 < t < T_c$ where T_c is the generation time and P the growth fraction. Therefore the fraction of the population at the beginning of the G_1 phase (young cells: $-t = T_c$) is equal to $\log(P+1)/T_c \cdot (P+1)$, and the fraction of the population at the end of M phase (old cells: $t = 0$) is equal to $\log(P+1)/T_c$. Age distribution curves for the intestine of embryos at stage 34 and those at stage 35 are plotted against cell cycle time in Figs. 5 and 6 taking into account the P values calculated from intestinal MI. These curves are in good agreement with the outline of the normalized histograms of embryos treated with fraction 1.

According to Table 2, the proportion of population in any phase of the cycle in the intestine of embryos injected with fraction 1 and sacrificed 5 or 26 hr later, is not statistically different from that in corresponding control embryos injected with HOP buffer alone. It is thus concluded that animals injected with either fraction 1 or HOP buffer are similar with respect to the kinetics of their intestinal proliferation.

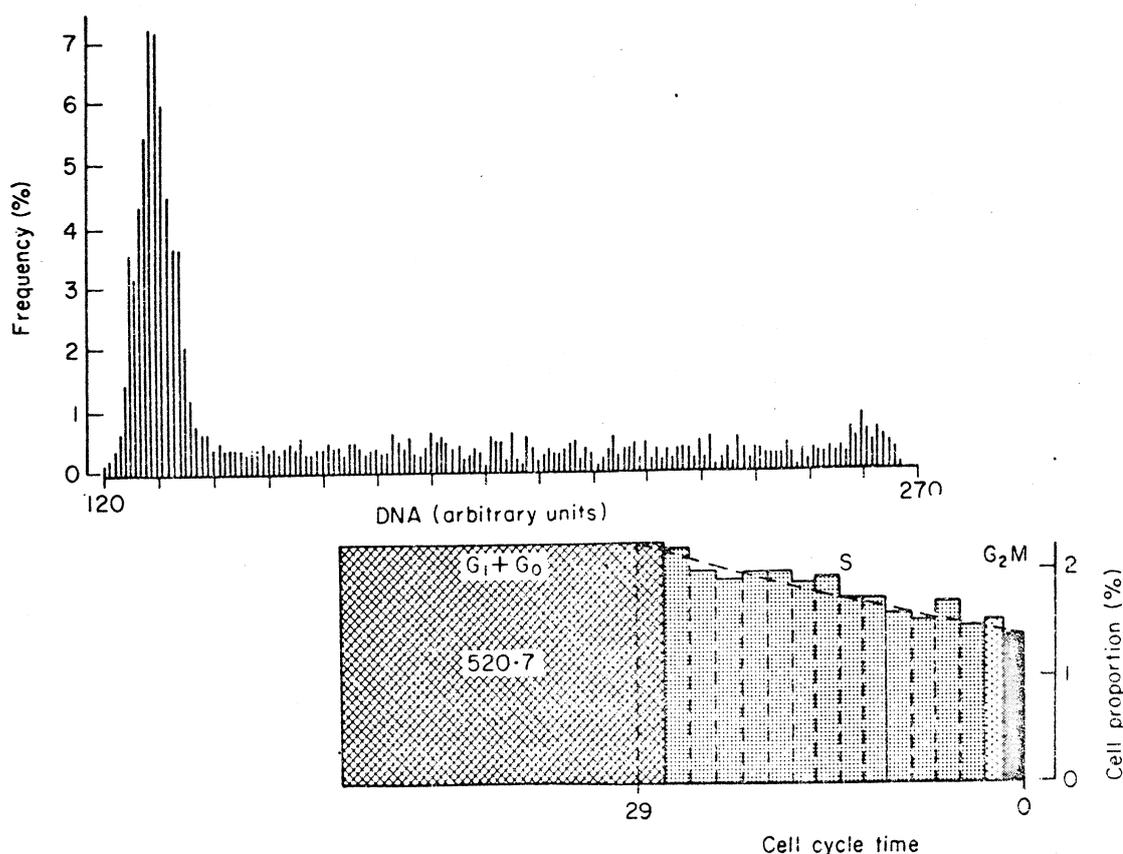


FIG. 5. Fraction 1, 5 hr.

FIGS. 5-10. Histograms of Feulgen-DNA content of intestinal nuclei of pleurodele embryos injected i.p. with fractions 1, 9 and 37 obtained by Sephadex chromatography of intestinal extract of adult pleurodele. These histograms are normalized in order to display the age distribution of intestinal cells in the cycle 5 hr and 26 hr after injection of tested fractions. The theoretical age distribution curve (---) plotted against cell cycle time is in good agreement with the outlines of the normalized histograms from intestine of pleurodeles injected with fraction 1 and it allows estimation of the age distribution disturbance induced by fractions 9 and 37.

Comparison between Fig. 5 and Fig. 6 shows that the age distribution curve and the columns of the normalized histogram are lower in the intestine of embryos stage 35 fixed 26 hr after injection (Fig. 6) than those in intestine of embryos stage 34 fixed 5 hr after injection (Fig. 5). This fact corroborates the decrease of growth fraction from stage 34 to 35, as mentioned above. Since $52.07 \pm 2.1\%$ cells are in G₁ + G₀ phase in the intestine of embryos stage 34 and $66.18 \pm 1.7\%$ in that of embryos stage 35, it is obvious that cells which go out of the cycle to enter the G₀ phase between stage 34 and stage 35 are delayed in G₁ phase.

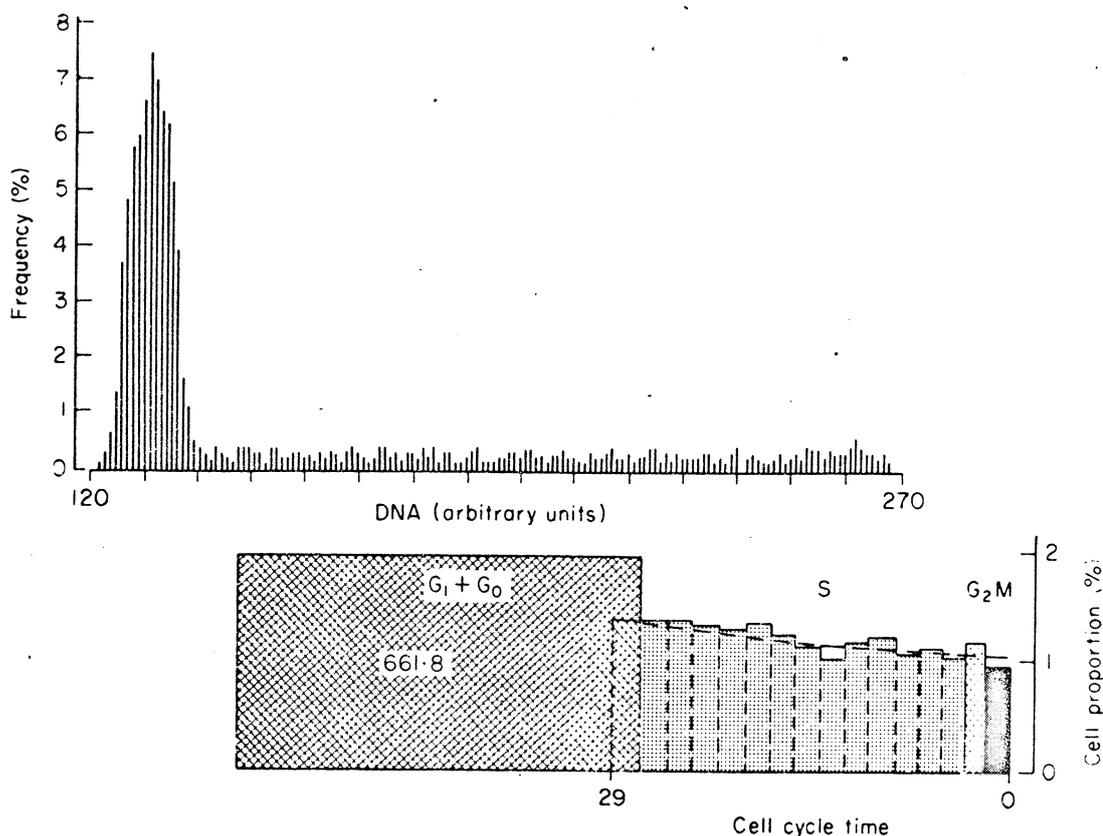


FIG. 6. Fraction 1, 26 hr.

Embryos treated with fraction 9

There are two main differences between the normalized histogram plotted from embryos sacrificed 5 hr after injection of fraction 9 (Fig. 7) and that plotted from embryos sacrificed 5 hr after injection of fraction 1 (Fig. 5). In the former, there is a lack of cells in the first three columns of S phase and an excess of cells in $G_1 + G_0$ columns. The lack and the excess are both almost equal to 90% as calculated from Table 2, so it is clear that cells which are prevented from entering into S phase are those delayed in $G_1 + G_0$ phase. Factor 1 contained in fraction 9 is assumed to be responsible for this delay. Since the time interval between injection and sacrifice is 5 hr and since the time spent in the first three columns of S phase is also about 5 hr, it is concluded that the cell cycle is inhibited by factor 1 at the end of the G_1 phase.

There are also two main differences between the histogram in Fig. 8 from embryos injected with fraction 9 and sacrificed 26 hr later and that in Fig. 7 from embryos injected with fraction 9 and sacrificed at stage 35. In the former, both a lack of cells in S phase and a marked excess of cells in the $G_1 + G_0$ phase are observed. Furthermore, a lack of cells in G_2 and M phases is also noticed in the intestine of embryos sacrificed 26 hr after injection of fraction 9 compared to embryos sacrificed 26 hr after injection of fraction 1. The deficit in M cells was already found in the mitotic index study. Since the total lack of cells in S, G_2 and M phases and the excess of cells in $G_1 + G_0$ phase are both equal to about 23.8%, it is obvious that cells out of the cycle are delayed in G_1 phase. It thus becomes clear that fraction 9 contains at least one cell cycle inhibitor (factor 1) which prevents cells from entering S phase and thus gives rise to a subsequent lack of synthesizing

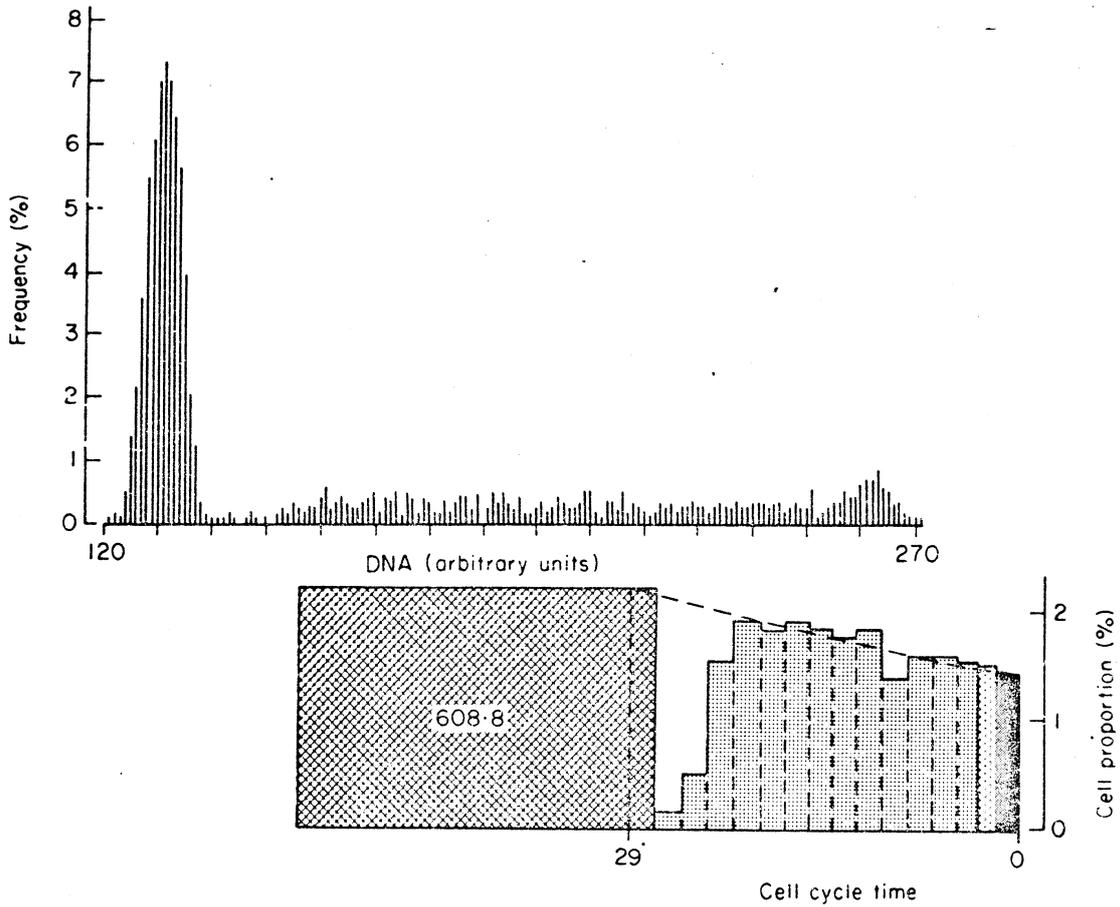


FIG. 7. Fraction 9, 5 hr.

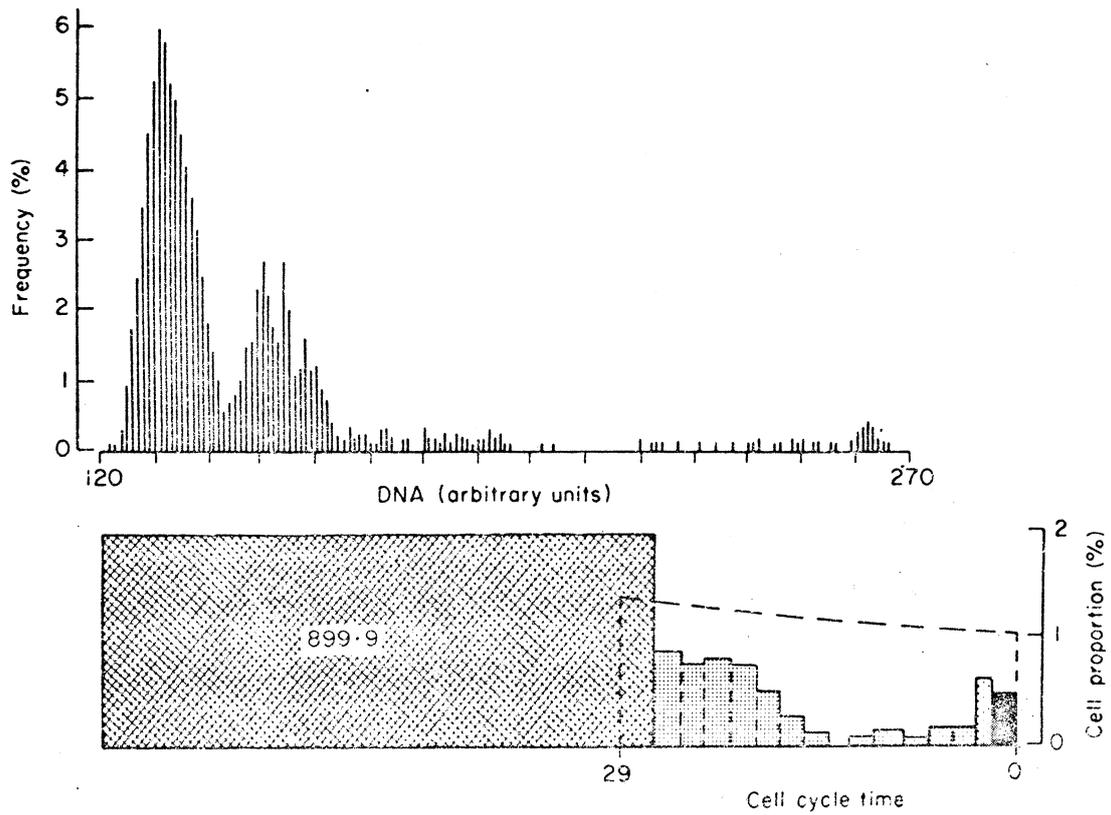


FIG. 8. Fraction 9, 26 hr.

S cells; this deficit then reaches the G_2 and the M cell population while $G_1 + G_0$ cells become more and more numerous.

The normalized histogram plotted in Fig. 8 from the epithelial gut cell population of embryos injected with fraction 9 and sacrificed 26 hr later, exhibits the fewest S cells in the eighth block, i.e. about 14 hr after the beginning of S phase. The early S cells of columns 1-7 are more numerous than the late S cells of columns 8-13; so it is concluded that the fraction of the population entering into S phase decreases during the 12 hr (26-14 hr) following injection and then increases rapidly until it reaches about half the normal value 26 hr after injection. Therefore, inhibition of cell progression from G_1 phase to S phase lasts about 12 hr.

Embryos treated with fraction 37

The normalized histogram from the intestinal cell population of embryos sacrificed 5 hr after injection of fraction 37 (Fig. 9) exhibits a higher G_2 column and a lower $G_1 + G_0$ column than the corresponding histogram from embryos sacrificed 5 hr after injection of fraction 1 (Fig. 5). It is concluded from this comparison that factor 2 contained in fraction 37 has delayed cells in G_2 phase so that cell progression from G_2 to M and G_1 phases has decreased. This inhibition results in a MI depression as soon as 5 hr after injection.

The normalized histogram of the intestinal cell population of embryos sacrificed 26 hr after injection of fraction 37 (Fig. 10) exhibits higher G_2 and M columns than the

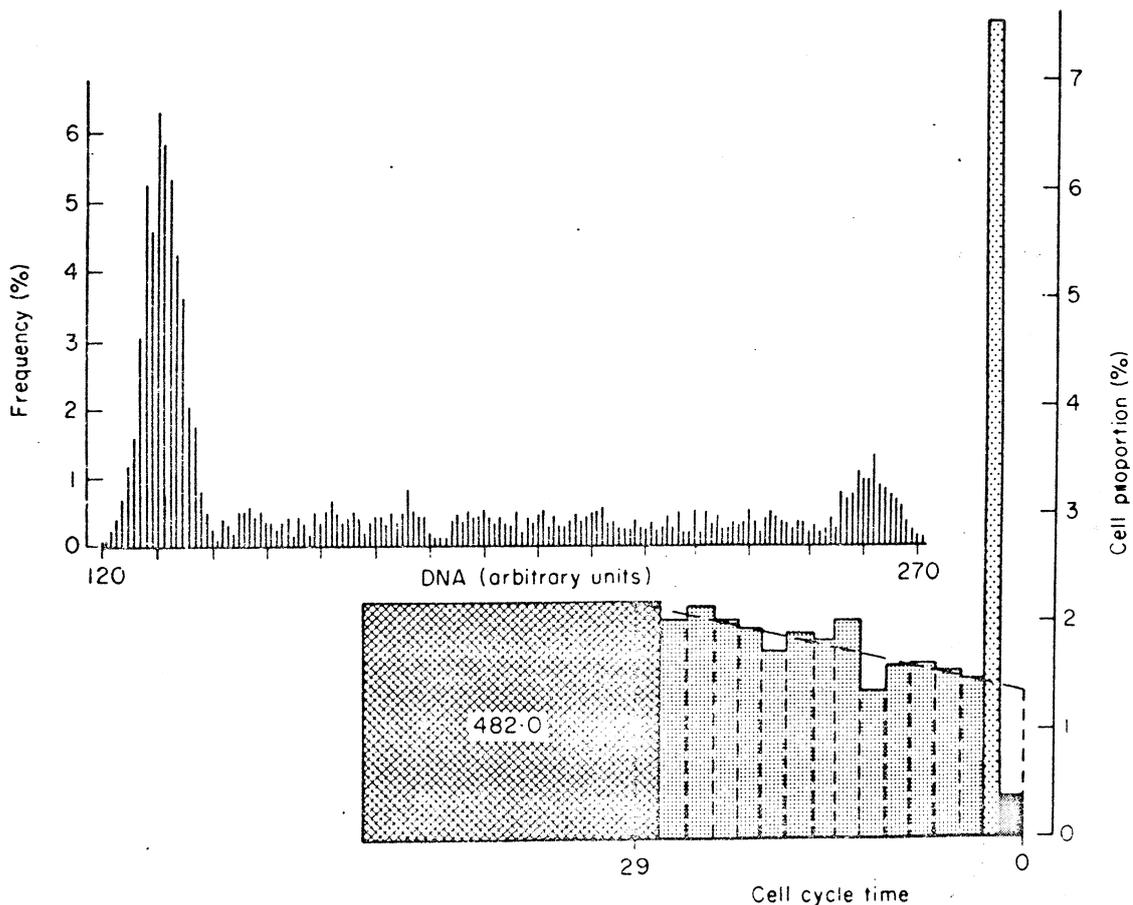


FIG. 9. Fraction 37, 5 hr.

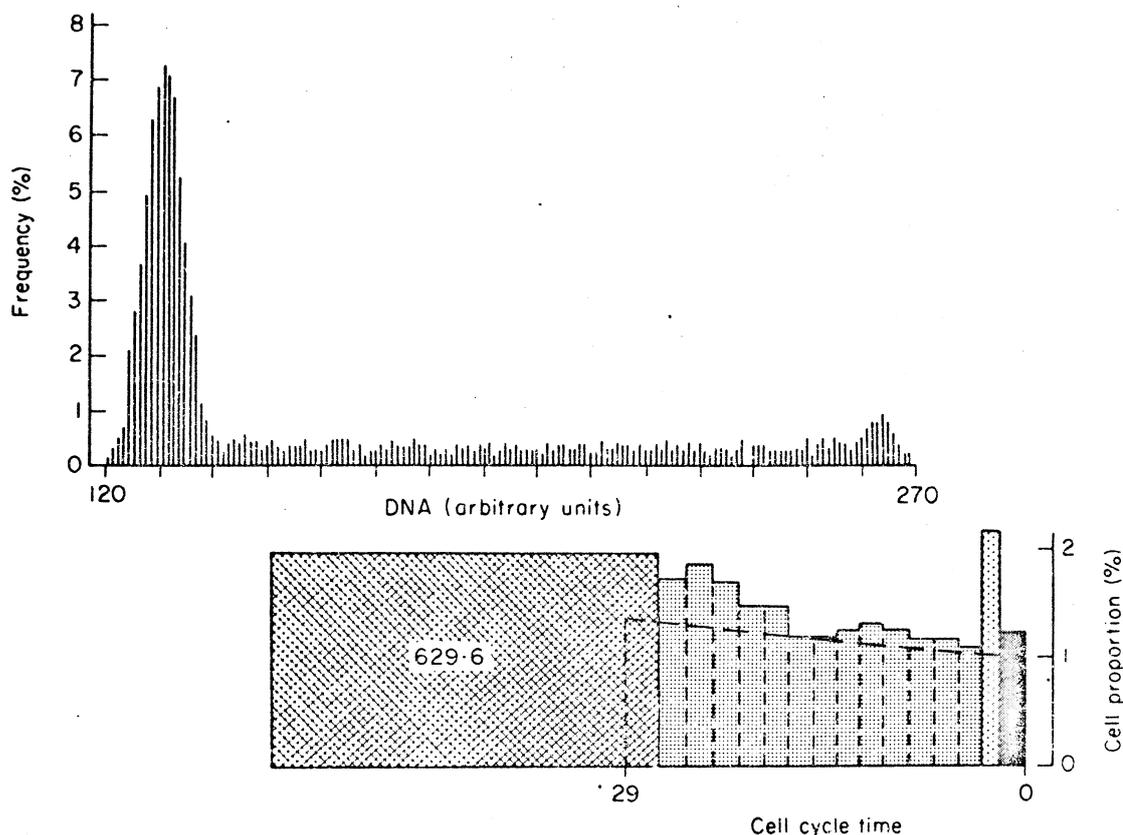


FIG. 10. Fraction 37, 26 hr.

corresponding histogram from embryos sacrificed 26 hr after injection of fraction 1 (Fig. 6). Although the G_2 column is higher than normal in the intestine of embryos sacrificed 26 hr after injection of fraction 37, it is about one third of that in the intestine of embryos injected with the same fraction but sacrificed 5 hr later (Fig. 9). It is thus clear that cells delayed in G_2 phase after injection of this fraction have escaped from inhibition and have gradually started to divide in addition to normally dividing cells. This observation which demonstrates that G_2 inhibition is reversible is in agreement with the MI overshoot previously described (Fig. 3). The comparison between $G_1 + G_0$ column from treated embryos sacrificed after 26 hr (Fig. 9) and that from treated embryos fixed after 5 hr (Fig. 10) shows that this column is larger in the former than in the latter. According to Table 2, the increment (14.8%) of the $G_1 + G_0$ block from stage 34 to stage 35 in embryos treated with fraction 37 is not statistically different from that (14.0%) in embryos treated with fraction 1. It is inferred from this fact that most of the cells which have escaped from G_2 inhibition have entered into $G_1 + G_0$ phase after their passage through M phase. Since variances analysis shows that the first five columns of S phase in embryos sacrificed 26 hr after injection of fraction 37 (Fig. 10) are higher than corresponding ones in embryos treated with fraction 1 and fixed also 26 hr later (Fig. 6), it is concluded that the first cells which have escaped from G_2 inhibition have already entered S phase 26 hr after injection. These cells synthesize DNA for a maximum of 10 hr in addition to normally DNA synthesizing cells. They left G_2 phase about 14 hr previously (10 hr in S, 2 hr in G_1 , 2 hr in M), so they were inhibited transiently in G_2 phase for 12 hr (26 - 14 hr).

Molecular weight estimation of inhibiting factors

The eluted peaks of standard proteins of known molecular weights are plotted against elution volume in Fig. 11. The corresponding standardization curve of the G-200 Sephadex column allowed us to estimate graphically the molecular weight of the inhibiting factors. The factor 1 which is eluted between glucose oxydase and alkaline phosphatase is thus assumed to be characterized by a molecular weight of between 120,000 and 150,000. The factor 2, which is eluted with fraction 37 far from cytochrome C has a molecular weight of less than 2000.

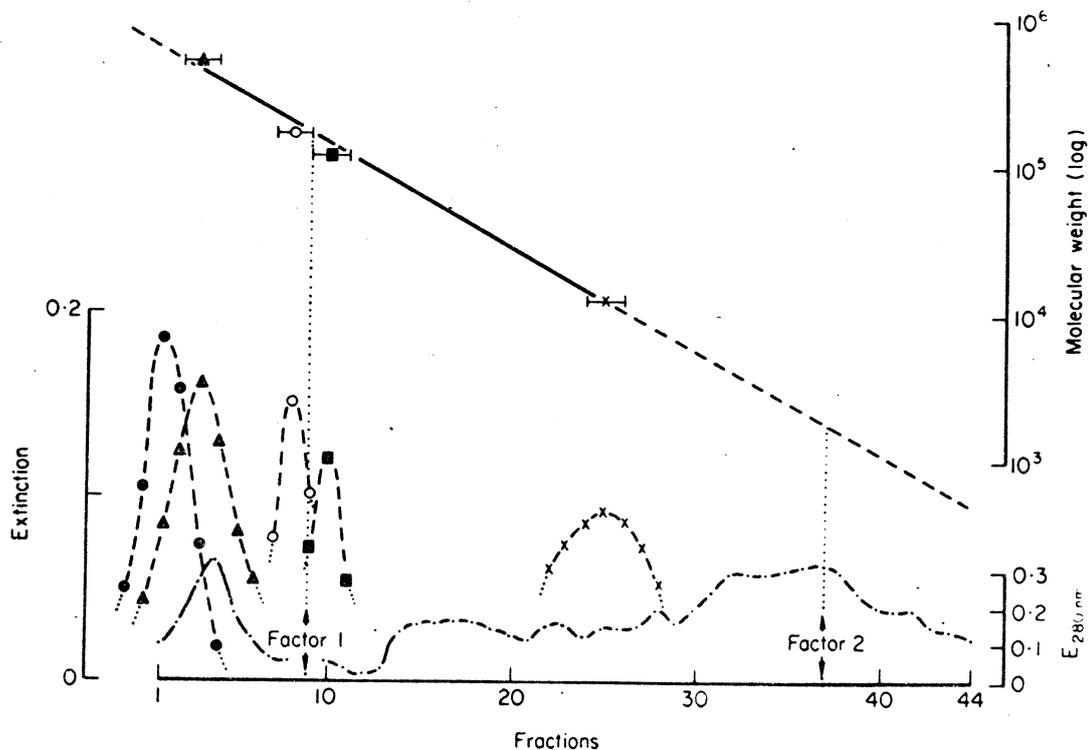


FIG. 11. Peaks of Dextran blue (●), β galactosidase from *Escherichia coli* (▲), glucose oxydase (○), alkaline phosphatase from calf intestine (■) and cytochrome C (×) eluted from the G-200 Sephadex column used to fractionate the intestinal extract of adult pleurodele. The well-known molecular weights of these proteins allow us to plot the standardization curve and, therefore, to give a graphical estimation of the molecular weight of factor 1 contained mainly in fraction 9 and of factor 2 contained mainly in fraction 37. The quantity of protein in the fractionated intestinal extract was estimated by extinction measurements at 280 nm (---).

DISCUSSION

The results indicate that the intestinal mucosa of adult pleurodeles contains two chalone-like substances which inhibit the cell cycle in embryonic intestinal epithelium. The factor 1, with a molecular weight of between 120,000 and 150,000, delays cells in G_1 phase, whereas the factor 2, with a molecular weight lower than 2000, delays cells in G_2 phase. Both these factors exhibit an inhibiting effect lasting about 12 hr.

Preliminary studies of MI during the 23 hr following injection of crude intestinal extract have demonstrated the G_2 -inhibition (Brugal, 1973), but the G_1 -inhibition which should cause a decrease of MI about 26 hr after injection of extract has not been observed: on the

contrary, an overshoot of MI was noticed from 22 hr to 32 hr after injection. This overshoot due to division of cells previously delayed in G_2 phase probably masked the mitotic depression caused by G_1 inhibitor.

Heparin is known to be a mitotic inhibitor *in vitro* (Heilbrunn & Wilson, 1949) and was contained in the Holtfreter solution used to perfuse the pleurodeles before excision of the intestine. This raised the doubt whether heparin contaminated the intestinal extract and thus accounted for the mitotic inhibition observed? This uncertainty can be rejected because G_2 inhibition has been previously obtained with extract made from pleurodeles perfused with heparin free Holtfreter solution (Brugal, 1973) and also because the molecular weight of the heparin used was 12,000–14,000 and so its size is quite different from that of either factor 1 or factor 2. Moreover, mitotic counts in heparinized rats failed to demonstrate any *in vivo* inhibition of cell proliferation in the gastrointestinal epithelium (Räsänen, Cederberg & Taskinen, 1966).

Little experimental data is available to elucidate control mechanisms of intestinal cell proliferation homeostasis. Partial resection of the rat intestine induces a depletion of intestinal epithelium and an increase in mitotic activity of the remaining intestine which were both attributed to a humoral stimulating proliferation factor (Loran, Crocker & Carbone, 1964); this hypothesis has not yet been corroborated by other experiments (Meer-Fiegggen, 1973). On the contrary, resection and X-irradiation of the rat intestine yielded evidence for a local feedback control of cell proliferation (Galjaard, Meer-Fiegggen & Giesen, 1972; Meer-Fiegggen, 1973). Furthermore, possible chalone-like substances are involved in inhibition of cell proliferation in the intestine of the 14 day chick embryos treated *in vivo* or *in vitro* with extract from duodenum of the 19 day chick embryo (Bischoff, 1964). Evidence has also been presented that stomach mucosa of the old chick embryo contains inhibitors which selectively suppress *in vitro* cell division in gastric epithelium of younger embryos (Philpott, 1971).

In a number of cell renewing systems such as liver, kidney, melanocytes, fibroblasts and granulocytes (see review by Houck & Hennings, 1973) a single chalone-like substance seems to be involved in the feedback regulation of cell proliferation. This inhibitor acts either on cells in G_1 phase or on cells in G_2 phase according to the tissue. Nevertheless, the presence of both an inhibitor acting in G_1 and one acting in G_2 was demonstrated in the epidermal system (Elgjo *et al.*, 1971, 1972). Both G_1 and G_2 factors are also synthesized in the intestine of pleurodele as shown by our results, suggesting the following hypothesis: tissues such as the epidermis or intestine which are able under normal conditions to yield numerous cells in response to an aggression (healing after injury or continuous erosion) and also have a short cell turnover time, may possess both G_1 and G_2 chalones in higher concentrations than in other tissues. This hypothesis is in agreement with the presence of both a G_1 -population and a G_2 -population of non-cycling G_0 cells in the epidermis (Gelfant, 1962) and in the intestine (Pederson & Gelfant, 1970) as shown in the mouse. The cells blocked indefinitely in G_2 phase are able to enter quickly into mitoses during compensatory growth after cells are lost.

The chalone effect has been shown to be reversible in epidermis with respect to both G_1 (Elgjo, 1974) and G_2 (Bullough & Laurence, 1960) inhibition. In the intestine of pleurodeles, the results we obtained demonstrate that at least a part of the cells blocked in G_2 phase by factor 2 is not permanently delayed in this phase. These cells leave G_2 phase to M phase about 12 hr after injection in addition to the normally dividing cells causing

an overshoot of MI and of synthesizing cells at the beginning of S phase 26 hr after injection while the proportion of cells in $G_1 + G_0$ phase which was decreased after injection increased towards the normal value. Our experiments did not last long enough to find out whether all delayed cells escape from inhibition or not. Though G_1 inhibition lasts about 12 hr, the proportion of cells which enter phase in embryos treated with factor 1 did not overcome the normal rate in the course of the experiments whereas G_2 inhibited cells did. It is likely that G_1 inhibition is irreversible and that cells inhibited in this phase differentiate. Moreover, Bischoff (1964) has observed that in some cases epithelial gut cells of the chick embryos start to differentiate when they are prevented from dividing by intestinal extract; however, it is obvious that long-term experiments must be performed to corroborate these observations.

The chalones extracted from various tissues have molecular weight ranging from 100,000 to less than 2000. Most of them seem to be glycoproteins with a molecular weight of about 30,000–50,000 or peptides of one tenth or less of that weight (Houck & Hennings, 1973). The diversity of chalone sizes appears more likely to be related to the variety of extraction, purification and characterization procedures used than to either the tissue from which they are extracted or the phase of the cell cycle on which they act. Though factor 1 seems to be a protein essentially because its molecular weight reaches 120,000–150,000, further biochemical experiments are needed to corroborate this hypothesis. No assumption can be made regarding the chemical nature of factor 2. It is perhaps of importance to ascertain that inhibition exerted by factor 1 and factor 2 lasts about 12 hr suggesting that the respective catabolic pathways may be analogous. Thus it is not unreasonable to consider that essential chemical groups in factor 1 and factor 2 may be the same, the difference between these two factors may be that in factor 1 these essential groups are bound to a macromolecular entity.

Although mitotic inhibitors are obviously contained in intestinal tissue extract from adult pleurodeles, our results did not give any evidence that such inhibitors are the physiological regulators of cell proliferation in the adult or embryonic intestine. If a chalone mechanism is progressively established in the course of intestinal development in embryos, it is likely that factor 1 would be the first to appear because G_0 differentiating cells are indefinitely and gradually blocked in the G_1 phase of the cell cycle (Brugal, 1971). Factor 2 would appear later during larval stages when feeding and epithelial gut renewal begin (Brugal, 1971). In order to test this hypothesis, further experiments must be designed; the most convincing result would be experimental mitotic stimulation induced in response to *in situ* inactivation of possible chalone by antiserum obtained from rabbit immunized with the inhibitory intestinal extract by the method of Chopra & Simnett (1971).

REFERENCES

- ANDREWS, P. (1964) Estimation of the molecular weights of proteins by sephadex gel-filtration. *Biochem. J.* **91**, 222.
- BISCHOFF, R. (1964) Inhibition of mitoses by homologous tissue extracts. *J. Cell Biol.* **23**, 10A.
- BRUGAL, G. (1971) Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires: étude autoradiographique chez les embryons et les jeunes larves de *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien Urodèle). *Develop. Biol.* **24**, 301.
- BRUGAL, G. (1973) Effects of adult intestine and liver extracts on the mitotic activity of corresponding embryonic tissues of *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibia, Urodela). *Cell Tissue Kinet.* **6**, 519.

- BRUGAL, G. & BERTRANDIAS, J.P. (1970) Méthode mathématique d'évaluation du coefficient de prolifération dans les populations cellulaires embryonnaires en croissance exponentielle. *C. r. Acad. Sci., Paris*, **270**, 1603.
- BULLOUGH, W.S. (1965) Mitotic and functional homeostasis. *Cancer Res.* **25**, 1683.
- BULLOUGH, W.S. & LAURENCE, E.B. (1960) The control of epidermal mitotic activity in the mouse. *Proc. roy. Soc. B*, **151**, 517.
- CHIBON, P. & BRUGAL, G. (1973) Durée de disponibilité de la thymidine exogène chez la larve et le jeune du Triton *Pleurodeles waltlii*, Michah. *Ann. Embryol. Morph.* **6**, 81.
- CHOPRA, D.P. & SIMNETT, J.D. (1971) Stimulation of cell division in larval kidney (*Xenopus laevis*) by rat kidney antiserum. *Exp. Cell Res.* **64**, 396.
- ELGJO, K. (1974) Reversible inhibition of epidermal G₁-cells by repeated injections of aqueous skin extracts (chalone). *Virchows Arch., Abt. B, Zellpath.* **15**, 157.
- ELGJO, K., LAERUM, O.D. & EDGEHILL, W. (1971) Growth regulation in mouse epidermis. I. G₂ inhibitor present in the basal cell layer. *Virchows Arch., Abt. B, Zellpath.* **8**, 277.
- ELGJO, K., LAERUM, O.D. & EDGEHILL, W. (1972) Growth regulation in mouse epidermis. II. G₁ inhibition present in the differentiating cell layer. *Virchows Arch., Abt. B, Zellpath.* **10**, 229.
- GALJAARD, H., MEER-FIEGGEN, W. & GIESSEN, J. (1972) Feedback control by functional villus cells on cell proliferation and maturation in intestinal epithelium. *Exp. Cell Res.* **73**, 197.
- GALLIEN, L. & DUROCHER, M. (1957) Table chronologique du développement de *Pleurodeles waltlii*. *Bull. Biol. Fr. Belg.* **91**, 97.
- GARCIA, A.M. & IORIO, R. (1966) A one-wave length two-area method in cytophotometry for cells in smears or prints. *Introduction to Quantitative Cytochemistry* (Ed. by L. Wied), p. 239. Academic Press, London.
- GELFANT, S. (1962) Initiation of mitosis in relation to the cell division cycle. *Exp. Cell Res.* **26**, 395.
- HEILBRUNN, L.V. & WILSON, W.L. (1949) The effect of heparin on cell division. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **70**, 179.
- HOUCK, J.C. & HENNINGS, H. (1973) Chalone specific endogenous mitotic inhibitors. *FEBS Letters*, **32**, 1.
- LORAN, M.R., CROCKER, T.T. & CARBONE, J.V. (1964) The humoral effect of intestinal resection on cellular proliferation and maturation in parabiotic rats. *Fed. Proc.* **23**, 407.
- MARGOLIASH, E., SMITH, E.L., KRIEL, G. & TUPPY, H. (1961) Amino acid sequence of the horse heart cytochrome C. *Nature*, **192**, 1121.
- MEER-FIEGGEN, W. VAN DER (1973) Regulation of cell proliferation and differentiation in intestinal epithelium. Thesis, Rotterdam.
- PEDERSON, T. & GELFANT, S. (1970) G₂-population cells in mouse kidney and duodenum, and their behavior during the cell division cycle. *Exp. Cell Res.* **59**, 32.
- PHILPOTT, G.W. (1971) Tissue-specific inhibition of cell proliferation in embryonic stomach epithelium *in vitro*. *Gastroenterology*, **61**, 25.
- QUASTLER, H. & SHERMAN, G.F. (1959) Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.* **17**, 420.
- RÄSÄNEN, T., CEDERBERG, A. & TASKINEN, E. (1966) The mitotic count in the gastrointestinal epithelium and regenerating liver of heparinized rats. *Gastroenterology*, **50**, 41.
- SWOBODA, B.E.P. & MASSEY, V. (1965) Purification and properties of the glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J. biol. Chem.* **240**, 2209.
- ULLMANN, A., GOLDBERG, M.E., PERRIN, D. & MONOD, J. (1968) On the determination of molecular weight of proteins and protein sub-units in the presence of 6M guanidine hydrochloride. *Biochemistry*, **7**, 261.
- WEISS, P. & KAVANAU, J.L. (1957) A model of growth and growth control in mathematical terms. *J. gen. Physiol.* **41**, 1.

SPECIFICITE ZOOLOGIQUE DES CHALONES INTESTINALES

Les chalones extraites des organes adultes, et notamment de la peau, ne semblent pas présenter de spécificité zoologique parmi les Vertébrés (BULLOUGH et col., 1967) : ce caractère est d'ailleurs retenu comme l'un des critères permettant d'attribuer le nom de "chalone" aux substances antimitotiques d'origine tissulaire (International Chalone Conference, Brook Lodge, U.S.A., 1972 - Actes publiés dans Nat. Cancer Inst. Monogr. 38, 1973). Nous avons donc entrepris de vérifier si les facteurs antimitotiques extraits de l'intestin de pleurodèle adulte et inhibant spécifiquement la prolifération cellulaire dans l'épithélium intestinal embryonnaire méritent le nom de chalones intestinales (BRUGAL et PELMONT, 1975). Pour cela, nous avons recherché la présence éventuelle de ces facteurs dans les extraits de muqueuse intestinale de caille et de souris adultes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'intestin grêle a été prélevé chez une caille et 2 souris préalablement anesthésiées par le chloroforme et perfusées par la solution physiologique de HOLTFRETER à 37° C additionnée d'héparine (0,5 g/l). L'intestin de chaque animal a été lavé dans la solution de HOLTFRETER stérile tamponnée par le phosphate de sodium (10^{-2} M), ouvert longitudinalement et étalé sur une plaque métallique à -15° C. La muqueuse intestinale a été râclée à l'aide d'un scalpel, broyée dans un POTTER, puis ultracentrifugée dans 2 ml de solution tamponnée de HOLTFRETER (10^5 g, 20 mn). Le surnageant obtenu a constitué l'extrait tissulaire brut. Un extrait a également été préparé à partir de l'intestin de 4 pleurodèles selon la méthode déjà décrite (BRUGAL et PELMONT, 1974 ; 1975). Les extraits intestinaux de pleurodèle, de caille et de souris ont été chromatographiés successivement sur la même colonne de Sephadex G 200 selon la méthode déjà décrite (BRUGAL et PELMONT, 1974 ; 1975). 44 fractions de 1 ml ont été recueillies, pour chaque extrait, après élution de bleu dextran utilisé comme marqueur du front de migration. Un aliquot de 10^{-3} ml des fractions de chaque extrait a été injecté à des embryons de pleurodèle au stade 34 de GALLIEN et DUROCHER (1957). Les embryons traités ont été fixés dans le liquide de SMITH, les

uns 5h et les autres 30h après l'injection. Le télencéphale et l'intestin de ces embryons ont été prélevés, écrasés entre lame et lamelle histologiques puis colorés par le réactif de FEULGEN. L'indice mitotique a été calculé après comptage de 2 000 à 2 700 cellules dans chacun de ces tissus. Les valeurs de cet indice en fonction de la fraction injectée sont portées graphiquement dans les figures 1, 2 et 3.

RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION

Chez les embryons fixés 5 heures après l'injection des fractions, l'indice mitotique intestinal est significativement abaissé par les fractions 34 à 40 d'intestin de pleurodèle (figure 1 a), 34 à 37 d'intestin de caille (figure 2 a) et 38 à 40 d'intestin de souris (figure 3 a). Aucune de ces fractions ne provoque d'abaissement de l'indice mitotique dans le télencéphale des embryons correspondants. Ainsi, les fractions éluées au voisinage de la fraction 37 provoquent une inhibition spécifique de l'activité mitotique intestinale embryonnaire quelle que soit l'espèce d'origine de l'extrait intestinal. Ayant montré précédemment (BRUGAL et PELMONT, 1974 ; 1975) que les fractions 36 à 39, obtenues dans les mêmes conditions à partir d'extrait intestinal de pleurodèle adulte, contiennent un facteur (facteur 2) antimitotique de poids moléculaire 2 000 environ, inhibant en phase G_2 les cycles mitotiques de l'épithélium intestinal embryonnaire, nous concluons de la similitude des figures 1 a, 2 a et 3 a que les extraits intestinaux de caille et de souris contiennent un facteur ayant les mêmes effets antimitotiques et un poids moléculaire voisin de celui extrait de l'intestin du pleurodèle.

Chez les embryons fixés 30h après l'injection des fractions, l'indice mitotique intestinal est significativement abaissé par les fractions 6 à 12 d'intestin de pleurodèle (figure 1 b), 8 à 9 d'intestin de caille (figure 2 b) et 7 à 9 d'intestin de souris (figure 3 b). Aucune de ces fractions n'altère l'indice mitotique dans le télencéphale des embryons correspondants. Donc, les fractions éluées au voisinage de la fraction 8 provoquent une inhibition spécifique de l'activité mitotique de l'épithélium intestinal embryonnaire quelle que soit l'espèce d'origine de l'extrait intestinal. Ayant montré précédemment (BRUGAL et PELMONT, 1974 ; 1975) que les fractions 8 à 10, obtenues dans les mêmes

conditions à partir d'extrait intestinal de pleurodèle, contiennent un facteur antimitotique (facteur 1) de poids moléculaire 120 000-150 000 inhibant en phase G_1 les cycles mitotiques de l'épithélium intestinal embryonnaire, nous concluons de la similitude des figures 1 b, 2 b et 3 b, que les extraits intestinaux de caille et de souris contiennent un facteur ayant les mêmes effets antimitotiques et un poids moléculaire voisin de celui extrait de l'intestin du pleurodèle.

L'augmentation de l'indice mitotique intestinal provoquée par les fractions 34 à 36 d'extrait d'intestin de pleurodèle (Figure 1 b) a déjà été observée dans les expériences précédentes (BRUGAL et PELMONT, 1974 ; 1975) et correspond à la division des cellules préalablement inhibées temporairement en phase G_2 par ces fractions. Les figures 2 b et 3 b montrent qu'une augmentation de l'indice mitotique intestinal s'observe également chez les embryons traités par les fractions 35 à 37 d'extrait d'intestin de caille (2 b) et 39 à 40 d'extrait d'intestin de souris (3 b). Nous concluons de ces résultats que l'inhibition exercée par le facteur antimitotique contenu dans les fractions d'intestin de caille et de souris voisines de la fraction 38 n'introduit qu'un retard temporaire de l'activité mitotique intestinale très semblable à celui provoqué par le facteur antimitotique contenu dans les fractions correspondantes de l'extrait intestinal de pleurodèle.

Chez les embryons fixés 5h et 30h après l'injection des fractions intestinales de caille et de souris, les fractions qui abaissent l'indice mitotique intestinal embryonnaire sont encadrées, dans tous les cas, par des fractions qui augmentent paradoxalement cet indice (fractions 31-32 et 39 de la figure 2 a ; 6-7 et 11-12 de la figure 2 b ; 35-36 et 41-42 de la figure 3 a ; 5-6 et 11 de la figure 3 b). Bien que dans chaque cas, cette augmentation soit peu significative ($p > 0,05$), le fait qu'elle se manifeste de façon systématique, aussi bien de part et d'autre de l'inhibition en phase G_1 (figures 2 b et 3 b) que de part et d'autre de l'inhibition en G_2 (figures 2 a et 3 a), est certainement remarquable. Cet effet paradoxal peut s'expliquer en admettant que les fractions qui augmentent l'indice mitotique contiennent le facteur antimitotique mais à faible dose et que,

FIGURES

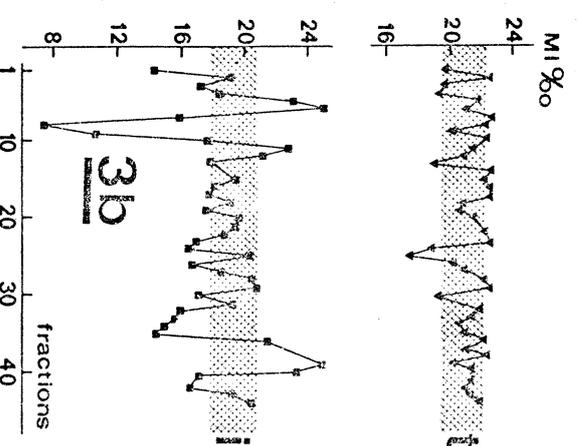
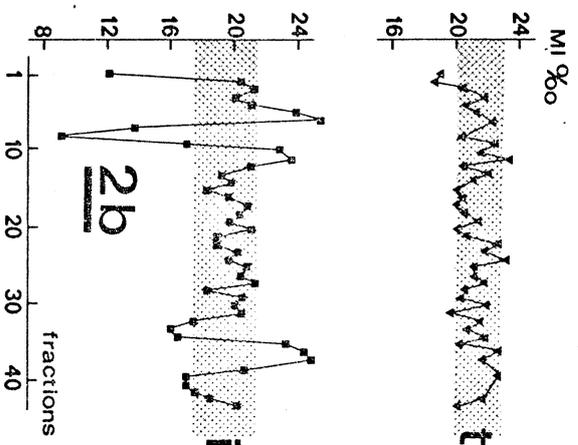
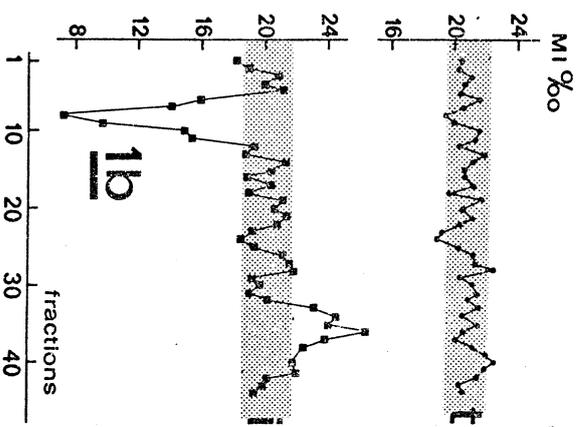
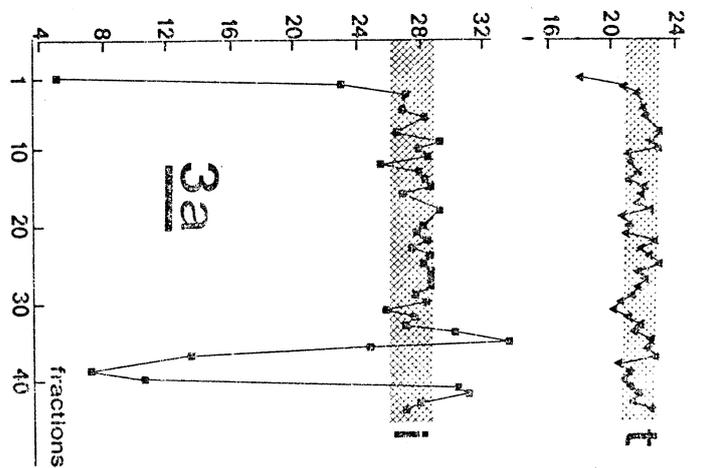
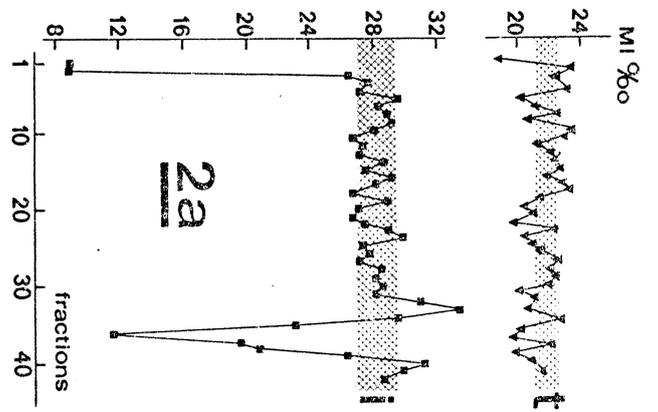
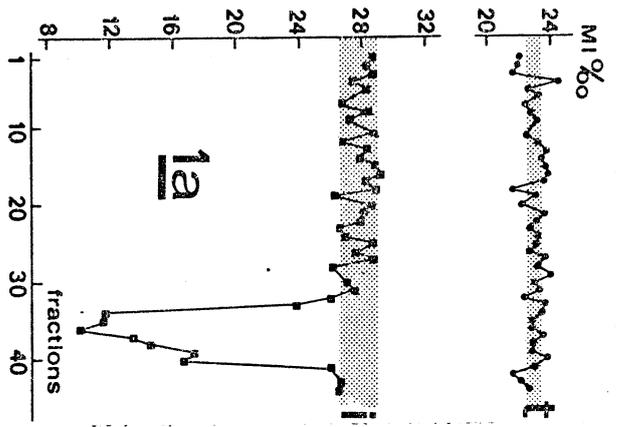
Variations de l'indice mitotique (MI ‰) dans le télencéphale (t) et l'épithélium intestinal (i) d'embryons de pleurodèle au stade 34.

1 - Indices mitotiques chez des embryons traités par des fractions d'extrait intestinal de pleurodèle et fixés 5 heures (1 a) ou 30 heures (1 b) après les injections.

2 - Indices mitotiques chez des embryons traités par des fractions d'extrait intestinal de caille et fixés 5 heures (2 a) ou 30 heures (2 b) après les injections.

3 - Indices mitotiques chez des embryons traités par des fractions d'extrait intestinal de souris et fixés 5 heures (3 a) ou 30 heures (3 b) après les injections.

Les plages hachurées correspondent à l'intervalle de confiance de l'indice mitotique dans le télencéphale et l'épithélium intestinal d'embryon de pleurodèles non traités.



pleurodèle

caïlle

souris

pour de faibles concentrations, le facteur inhibiteur a un effet stimulateur. HALL (1970) avait déjà remarqué que des extraits épidermiques inhibant les cellules en phase G_1 du cycle mitotique avaient un effet stimulateur a très faible concentration. Bien que des effets paradoxaux de stimulation ou d'inhibition selon la dose soient des phénomènes pharmacologiques classiques, la question reste posée de savoir pourquoi une situation comparable n'est pas observée chez les embryons ayant reçu les fractions intestinales de pleurodèle (figures 1 a et 1 b)?

Les inhibitions de l'activité mitotique intestinale des embryons provoquées par la (ou les) première(s) fraction(s) d'extraits intestinal de caille ou de souris (figures 2 a, 2 b, 3 a, 3 b) s'accompagnent dans la plupart des cas d'une inhibition corrélative de l'activité mitotique télencéphalique et semblent de ce fait relever d'un effet cytotoxique sans spécificité tissulaire.

CONCLUSION

Deux facteurs antimitotiques inhibant respectivement en phase G_1 et G_2 du cycle mitotique les cellules de l'épithélium intestinal embryonnaire de pleurodèle sont présents dans les extraits intestinaux de pleurodèle, de caille et de souris adultes. L'absence de spécificité zoologique permet de considérer ces facteurs antimitotiques comme des chalone intestinales. L'une, chalone 1, inhibe les cycles cellulaires en phase G_1 ; l'autre, chalone 2, inhibe les cycles cellulaires en phase G_2 .

BIBLIOGRAPHIE

- BRUGAL, G. et PELMONT, J. - Présence, dans l'intestin du Triton adulte Pleurodeles waltlii Michah., de deux facteurs antimitotiques naturels (chalones) actifs sur la prolifération cellulaire de l'intestin embryonnaire. C.R. Acad. Sci. Paris, 278 : 2831-2834 (1974).
- BRUGAL, G. et PELMONT, J. - Existence of two chalone-like substances in intestinal extract from the adult newt, inhibiting embryonic intestinal cell proliferation. Cell Tissue Kinet., 8 : 171-187 (1975).
- BULLOUGH, W.S. ; LAURENCE, E.B. ; IVERSEN, O.H. et ELGJO, K. - The Vertebrate epidermal chalone. Nature (London), 214 : 578 (1967).
- GALLIEN, L. et DUROCHER, M. - Table chronologique du développement de Pleurodeles waltlii. Bull. Biol. Fr. et Belg., 91 : 97-114 (1957).
- HALL, R.G. - DNA synthesis in organ cultures of the hamster cheek pouch. Inhibition by a homologous extract. Exp. Cell Res., 58 : 429-431 (1970).
-

CHAPITRE - V -

RÉGULATION DE LA PROLIFÉRATION ET DE LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRES

- RELATIONS ENTRE LA PROLIFÉRATION ET LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRES DANS L'INTESTIN EMBRYONNAIRE ET LARVAIRE

" Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires dans l'intestin embryonnaire et larvaire de Pleurodeles waltlii Michah. I - Développement normal "

" Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires dans l'intestin embryonnaire et larvaire de Pleurodeles waltlii Michah. II - Effets des chalones intestinales extraites de l'intestin de pleurodèle adulte "

- LES CHALONES INTESTINALES : CONCLUSION ET HYPOTHÈSE

" Presence of intestinal chalones "

Relations entre la prolifération et la
différenciation cellulaires dans l'intestin
embryonnaire et larvaire de Pleurodeles
waltlii, Michah..

I : Développement normal.

Relationships between the cell proliferation
and the differentiation in the embryonic
and larval intestine of Pleurodeles waltlii,
Michah..

I : Normal development.

G. BRUGAL *

Laboratoire de Zoologie et Biologie animale,
Université Scientifique et Médicale de
Grenoble, B. P. 53, 38 041 GRENOBLE-CEDEX.

FRANCE

* Ce travail a bénéficié de l'aide du CNRS
(ATP N° A655 1799) et de l'INSERM (AT N° 74142036).

SOU MIS POUR PUBLICATION DANS WILHELM ROUX'ARCHIV

RESUME

re la fin du développement embryonnaire (stade 34) et de la vie larvaire (stade 37), l'épithélium intestinal pleurodèle passe en 4 jours de l'état de cordon endodermique pleurodèle à celui d'épithélium fonctionnel constitué de cellules à mucus et de cellules à plateau strié. Au cours de cette différenciation, le nombre de cellules augmente trois fois environ bien que l'activité mitotique diminue légèrement par abaissement du coefficient de prolifération de 50%. Les mitoses qui, dans le cordon endodermique au stade 34, sont uniformément distribuées, apparaissent brusquement localisées, au stade 36, dans les nids cellulaires sous-épithéliaux. Ces nids représentent dès lors la totalité du compartiment géométrique intestinal. Avant même d'être localisés, ce compartiment contient autant de cellules qui, bloquées en phase G₁ du cycle cellulaire, cessent de se diviser et se différencient, que de cellules qui parcourent le cycle mitotique et se divisent à nouveau. Un tel processus laisse persister dans l'épithélium intestinal un nombre constant de cellules douées d'activité mitotique et capables d'assurer ainsi le renouvellement de ce compartiment. L'évolution de la prolifération et de la différenciation des cellules dans l'intestin de pleurodèle est très comparable à celle observée chez les Mammifères et confirme, en particulier, la théorie longtemps contestée entre les cryptes de LIEBERKÜHN et les nids cellulaires sous-épithéliaux des

SUMMARY

The differentiation of the intestinal epithelium of the pleurodele occurs during the last period of embryogenesis (stage 34) and completes during the first steps of larval development before the onset of feeding (stage 37). In the course of this 4-days period the intestinal epithelium, which is a closed endodermal cylinder at stage 34, becomes a functional epithelium constituted by columnar absorbing cells and goblet cells. During the intestinal differentiation, the cell number raises although the growth fraction decreases from 52% to 22%. At stage 34, the mitoses are randomly distributed throughout the endoderm but, at stage 36, they become confined to the cell nests which appear beneath the epithelium.

The cell nests correspond to the proliferating compartment which produces an equal number of dividing cells and of resting cells : these cells are arrested in the G_1 phase of the generative cycle and differentiate. Such a pattern of proliferation and differentiation maintains a constant number of proliferating stem cells which subserve the renewing function in the intestinal epithelium after the onset of feeding. The relationships between cell proliferation and differentiation in the developing intestinal epithelium of the pleurodele are closely similar to those observed in Mammals and suggest particularly that the intestinal cell nests of Urodela are analogous to the crypts of LIEBERKÜHN in higher Vertebrates.

INTRODUCTION

Les relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires relèvent de mécanismes encore mal connus. De nombreux travaux révèlent qu'un accroissement de l'activité mitotique et de la synthèse d'ADN précède l'histo-différenciation dans divers tissus tels que l'épithélium glandulaire mammaire (TURKINGTON et TOPPER, 1967), le pancréas (WESSELLS, 1968), les tissus hématopoïétiques (PAUL et HUNTER, 1968 ; GROSS et GOLDWASSER, 1970), la peau (STERN et al, 1971), les ébauches dentaires (RUCH et KARCHER-DJURICIC, 1971), l'épithélium gastrique (LIPKIN, 1972) et l'épithélium intestinal (DOURNON et CHIBON, 1974). Il semble qu'au moins un cycle cellulaire particulier soit un préalable nécessaire à la différenciation ; ce cycle est appelé, selon les auteurs : " mitose terminale " (RUCH et KARCHER-DJURICIC, 1971), " quantal cell cycle " (HOLTZER et al, 1972) ou " critical mitosis " (OWENS et al, 1973). Les mécanismes par lesquels le cycle mitotique terminal serait associé à l'achèvement de la différenciation cellulaire restent conjecturaux. Pour HOLTZER (1963) et HOLTZER et al (1972), il se produirait au cours de la phase S ou de la phase M de ce cycle mitotique, un événement particulier nécessaire à l'expression des gènes et à la réalisation, dans les cellules filles, d'un nouveau programme de synthèses caractéristique de l'état différencié et fonctionnel. Pour VONDERHAAR et TOPPER (1974), le cycle mitotique terminal aurait pour fonction de conduire les cellules aptes à la différenciation, à un moment particulier de la phase G₁ pendant lequel elles peuvent répondre à d'éventuels agents humoraux de différenciation. L'existence d'un tel moment particulier de la phase G₁ pendant lequel la cellule est sensible aux conditions humorales de son environnement a été confirmée par divers travaux (PARDEE, 1974). Arrivée à ce moment critique de la phase G₁ - appelé " dichophase " (BULLOUGH, 1965), " restriction point " (PARDEE, 1974) ou " critical point " (VONDERHAAR et TOPPER, 1974) - la cellule cesserait de se diviser et achèverait sa différenciation si elle est en présence de facteurs humoraux tels que des chalone ou des hormones ; en l'absence de ces facteurs, la cellule

continuerait jusqu'à la mitose le cycle commencé et les cellules-filles entreraient à nouveau en phase G_1 . Cette hypothèse est cohérente avec le fait que l'histo-différenciation s'accompagne, dans les tissus embryonnaires comme dans les tissus adultes, d'une diminution rapide de l'activité mitotique (BRUGAL, 1971 a ; STERN et al, 1971 ; LIPKIN, 1973 ; GRAF et BESCOT-LIVERSAC, 1974 ; EASTWOOD et TRIER, 1974 ; DOURNON et CHIBON, 1974). Il reste néanmoins difficile de comprendre actuellement comment les mécanismes de régulation de la prolifération cellulaire, faisant intervenir des chalcones, interfèrent avec les mécanismes qui président au déroulement de la différenciation cellulaire. Ces derniers dépendent en effet à la fois de facteurs extrinsèques tels que les hormones et de facteurs intrinsèques liés à la détermination et à la spécialisation génétiques (KITANO et HU, 1970) ainsi qu'à l'histoire mitotique des cellules (HOLTZER et al, 1972).

Pour contribuer à préciser nos connaissances dans ce domaine, l'étude des relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires a été entreprise dans l'épithélium intestinal de l'embryon et de la larve de Pleurodeles waltlii, Michah., au cours du développement normal, et fait l'objet du présent mémoire. Une étude parallèle a été effectuée dans les conditions expérimentales après perturbation de la prolifération cellulaire de l'intestin embryonnaire par des inhibiteurs mitotiques naturels, ou chalcones (BRUGAL, 1977, même volume).

MATERIEL ET METHODES

La différenciation de l'épithélium intestinal du pleurodèle se manifeste à la fin du développement embryonnaire. Au stade 34 (GALLIEN et DUROCHER, 1957) l'intestin embryonnaire est un cordon endodermique plein et d'aspect histologique indifférencié ; par contre, au stade 37, atteint en moyenne 93 heures plus tard à 20°C, l'intestin a acquis un aspect fonctionnel et la jeune larve (éclosion aux stades 35-36) commence à se nourrir.

DURÉES DU CYCLE CELLULAIRE ET DE SES PHASES

Les durées du cycle cellulaire et de ses phases dans l'épithélium intestinal embryonnaire et larvaire ont été évaluées graphiquement par la méthode de QUASTLER et SHERMAN (1959) aux stades 34, 35 et 36. A cette fin, des animaux élevés à la température de 20°C depuis la ponte, ont été anesthésiés par le MS 222 (1 g/l) aux stades choisis et ont subi une injection de thymidine tritiée ($^3\text{HTdR}$) (concentration : 100 $\mu\text{Ci/ml}$; activité spécifique : 5 Ci/mM ; 2.10^{-4} ml par animal). A divers intervalles de temps après cette injection, les animaux ont été fixés dans le liquide de SMITH, inclus dans la paraffine et débités en coupes sériées de 5 μm d'épaisseur. Les préparations obtenues ont été colorées par la réaction de FEULGEN puis recouvertes d'émulsion ILFORD L4 et développées après 45 à 65 jours d'exposition à 12°C. Le pourcentage de mitoses marquées (MM^*) a été calculé après comptage de 50 à 150 mitoses dans l'intestin de chaque animal. L'indice de marquage (IL) et l'indice mitotique (IM) ont été calculés dans l'intestin des mêmes animaux après comptage de 1800 à 3200 cellules. Seules les cellules surmontées de plus de 3 grains d'argent ont été considérées comme marquées.

Le coefficient de prolifération intestinal (P) a été calculé à divers intervalles de temps après l'injection de $^3\text{HTdR}$ en utilisant les relations établies par BRUGAL et BERTRANDIAS (1970) pour les populations cellulaires croissantes :

$$(1) \quad IM = \frac{T_M}{T_C} \cdot \text{Log} (P + 1)$$

$$(2) \quad IL = \frac{T_S}{T_C} \cdot \text{Log} (P + 1) \left[1 + \text{Log} (P + 1) \frac{T_M + T_{G_2} + T_S/2}{T_C} \right]$$

NOMBRE DE CELLULES

Le nombre de cellules constituant l'intestin à la fin du développement de l'embryon de pleurodèle est difficile à évaluer avec précision ; par contre, le taux d'augmentation du nombre de cellules au cours du développement est plus facile à déterminer par comptage de cellules sur les coupes histologiques et par dosage de l'ADN intestinal total.

Les comptages de cellules ont été réalisés à divers intervalles de temps entre les stades 34 et 37, sur 25 coupes consécutives de l'intestin à partir de la région pylorique. En raison de l'allongement insignifiant de l'intestin entre les stades 34 et 37, la variation de la moyenne du nombre de cellules rencontrées sur les sections transversales représente valablement le taux d'augmentation du nombre de cellules intestinales pendant la période étudiée.

Les dosages de l'ADN total de l'intestin ont été réalisés à divers intervalles de temps entre les stades 34 et 37. Pour chaque dosage, les intestins entiers ont été prélevés dans 2 lots de 10 embryons ou larves. Dans chaque lot, les cellules intestinales ont été dissociées et cassées par broyage à l'aide d'un Potter (50 tours/mn ; 4 mn) puis déposées sur une solution tamponnée de saccharose (1,8 M) et centrifugées (40.000 g ; 15 mn) de façon à précipiter les noyaux cellulaires. Les culots ont été fixés dans le liquide de SMITH et hydrolysés par HCl 6N pendant 1 h à 20°C. Pour chaque dosage, les noyaux cellulaires intestinaux de l'un des deux lots sont colorés par la réaction de FEULGEN (1 h à 20°C). Les noyaux des deux lots sont homogénéisés par broyage dans un Potter (200 tours/mn ; 15 mn) et la densité optique de l'homogénat nucléaire coloré est mesurée à 560 nm contre celle de l'homogénat non coloré. L'augmentation de la densité optique entre les stades 34 et 37 permet

d'évaluer le taux d'augmentation du nombre de cellules intestinales pendant la période étudiée.

PROPORTION DE CELLULES AU REPOS MITOTIQUE

Afin d'évaluer la proportion (R) de cellules qui ont cessé de parcourir le cycle mitotique aux stades étudiés, de la thymidine tritiée (concentration : 50 μ Ci/ml ; activité spécifique : 5 Ci/mM) est injectée toutes les 8 heures aux embryons et aux larves à partir des stades 34, 35 et 36 ($2 \cdot 10^{-4}$ ml par animal). Les animaux ainsi traités sont fixés à divers intervalles de temps après chacun des stades étudiés. Les histoautoradiographies ont été préparées comme précédemment et le pourcentage de cellules intestinales marquées, ou indice de marquage cumulé (ILC) a été calculé après comptage de 1200 à 1800 cellules dans chaque animal. Compte tenu de la durée du cycle cellulaire et de ses phases, la première injection de 3 HTdR marque les cellules qui sont en phase S à cet instant ; par contre les cellules alors en phase G₁, G₂ ou M sont marquées par la seconde injection à l'exception de celles qui, en phase G₂ ou M au moment de la première injection, cessent de parcourir le cycle cellulaire à l'issue de la mitose. Ainsi, dès la seconde injection, toutes les cellules qui sont engagées dans le cycle mitotique sont marquées et les variations de la proportion ($R=1 - \text{ILC}$) de celles qui ne se marquent pas pendant la durée de l'expérience représentent l'évolution de la fraction de la population en repos mitotique à partir de la seconde injection.

CYTOPHOTOMÉTRIE

Afin de déceler une localisation préférentielle des cellules engagées dans les phases S ou G₂ du cycle mitotique d'une part et les cellules en phase G₁ ou G₀ d'autre part, l'ADN des cellules intestinales a été dosé au stade 37 par fluorométrie sur des coupes histologiques colorées par la réaction de FEULGEN. Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un micro-

photomètre LEITZ MPV par excitation en lumière incidente (lampe HBO 100W et illuminateur LEITZ OPAK POL) à 576 nm avec un filtre d'arrêt à 620 nm. Compte tenu de la taille des noyaux cellulaires intestinaux (15 μm de diamètre en moyenne), les mesures effectuées sur des tranches de 5 μm d'épaisseur ne représentent qu'une estimation de la concentration nucléaire en ADN.

DIFFÉRENCIATION DE L'EPITHELIUM INTESTINAL

L'histo-différenciation de l'intestin du pleurodèle entre les stades 34 et 37 a été observée sur des coupes histologiques colorées par le bleu alcian, l'hémalun et la phloxine selon la méthode de ADAMS et SLOPER modifiée.

RESULTATS

DURÉES DU CYCLE CELLULAIRE ET DE SES PHASES

Variations du pourcentage de mitoses marquées

Les courbes de variations du pourcentage de mitoses marquées établies aux stades 34, 35 et 36 sont données dans la figure 1. Comme toutes les courbes homologues obtenues dans divers tissus d'Amphibiens Urodèles embryonnaires ou larvaires, elles sont caractérisées par un plateau stable (100%) limité par une branche ascendante et une branche descendante régulières (CHIBON, 1968 ; BRUGAL, 1971 b). L'abaissement très prononcé du pourcentage de mitoses marquées entre deux cycles mitotiques successifs atteste de la faible variabilité du temps de génération et de la durée des phases entre les cellules de la population intestinale. Les durées de T_C , T_{G_1} , T_S , T_{G_2} et T_M , calculées graphiquement d'après les courbes de la figure 1, sont portées dans le tableau I.

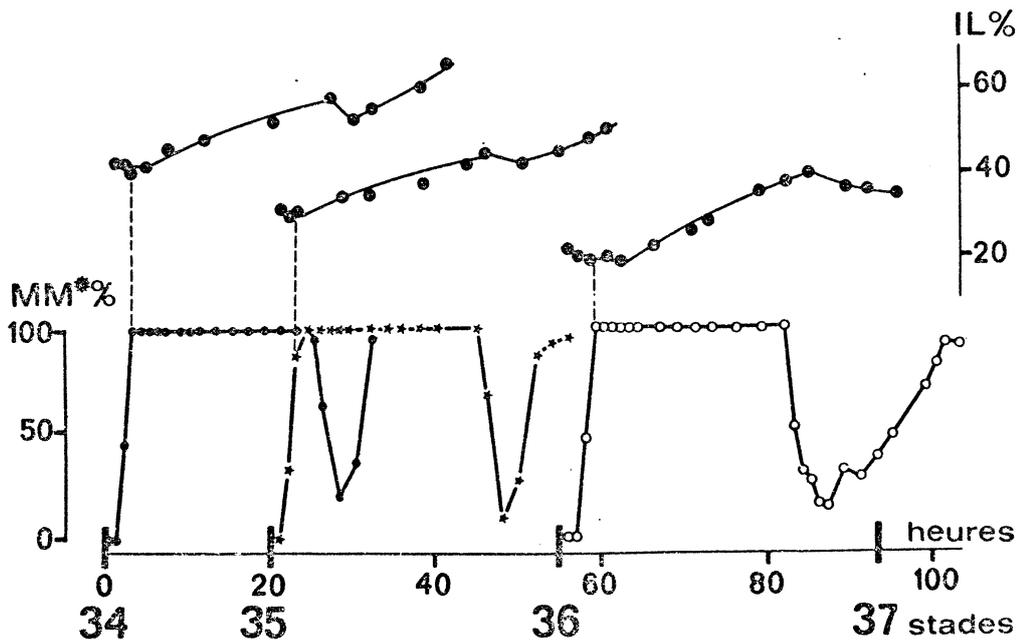


Figure 1 - Courbes de variations du pourcentage de mitoses marquées (MM*) et de cellules marquées (IL) obtenues après injections de thymidine tritiée à des embryons de pleurodèles au stade 34 et à des larves aux stades 35 et 36 élevés à la température de 20°C.

Variations de l'indice de marquage

Les courbes de variations de l'indice de marquage en fonction du temps écoulé après un marquage bref par $^3\text{HTdR}$ aux stades 34, 35 et 36 sont données dans la figure 1. La forme de ces courbes caractérise les populations cellulaires croissantes (BRUGAL et CHIBON, 1970) et leur périodicité permet de calculer graphiquement les durées du cycle cellulaire et de ses phases ; en particulier :

- le temps écoulé entre le premier minimum et le premier maximum de la courbe représente la durée de la phase S ;

- le temps écoulé entre le premier et le second minimum représente le temps de génération.

La correspondance entre la périodicité des variations de l'indice de marquage et celle du pourcentage de mitoses marquées confirme les valeurs des durées du cycle cellulaire et de ses phases portées dans le tableau I.

La figure 1 montre que l'intervalle de temps de 93 h, séparant le début du stade 34 du début du stade 37, correspond au déroulement de 3 cycles cellulaires successifs (29 h + 29 h + 37 h = 95 h). Les 2 premiers cycles sont caractérisés par les mêmes paramètres ; par contre, le troisième cycle qui se déroule entre les stades 36 et 37 présente une phase G_1 quatre fois plus longue que dans les deux cycles précédents.

AUGMENTATION DU NOMBRE DE CELLULES

La figure 2 montre que l'augmentation du nombre de cellules constituant l'épithélium intestinal est grossièrement proportionnelle au temps écoulé entre les stades 34 et 37. Le taux d'augmentation est évalué à 2,3 par comptage du nombre de cellules dans les coupes transversales d'intestin, et à 2,8 par mesure de la quantité d'ADN total de l'intestin. Compte tenu des erreurs d'évaluation introduites par ces deux méthodes, le nombre de cellules intestinales au stade 37 peut être estimé comme environ 2,6 fois plus grand qu'au stade 34.

Tableau I : Durées, en heures, du cycle cellulaire et de ses phases, établies à 20°C dans l'épithélium intestinal de l'embryon âgé et de la jeune larve de pleurodèle.

Stades	T _C	T _{G₁}	T _S	T _{G₂}	T _M
34	29	2	24	1	2
35	29	2	24	1	2
36	37	8	25	2	2

Tableau II : Valeurs du coefficient de prolifération (P), dans l'épithélium intestinal d'embryons âgés et de jeunes larves de pleurodèles, calculées d'après l'indice mitotique (IM) et l'indice de marquage (IL). Le nombre moyen (N) de cellules comptées au niveau de 25 coupes transversales antérieures de l'intestin permet de calculer le nombre moyen (PN) de cellules en activité mitotique au niveau d'une coupe.

Stades	P%		N	PN
	déduit de IM	déduit de IL		
34	52 ± 3	45 ± 3	72	37
35	38 ± 2	33 ± 3	95	36
36	27 ± 2	26 ± 2	135	36
37	22 ± 3	21 ± 2	168	37

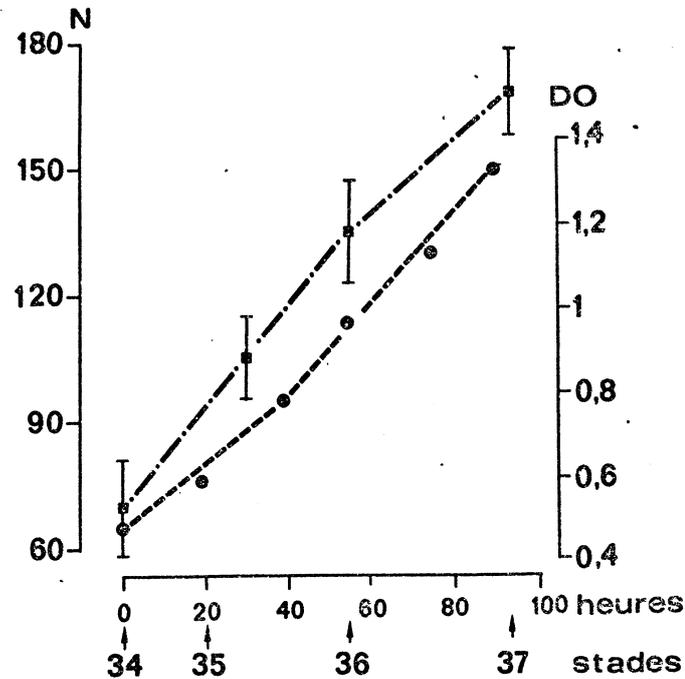


Figure 2 - Courbes de variations du nombre de cellules dans l'épithélium intestinal entre les stades 34 et 37 du développement du pleurodèle. N : nombre moyen de cellules par coupe transversale d'intestin ; les valeurs de l'intervalle de confiance ($2\sigma/\sqrt{n}$) sont portées graphiquement. DO : densité optique à 560 nm de l'ADN intestinal total coloré par la réaction de Feulgen. Nombre de cellules (---). Densité optique (— · — · —).

COEFFICIENT DE PROLIFÉRATION

Le coefficient de prolifération (P) a été calculé, à chaque stade étudié, à partir de l'indice mitotique et de l'indice de marquage observé 1 h après l'injection de $^3\text{HTdR}$.

Indice mitotique

L'indice mitotique intestinal décroît de 29⁰/oo à 11⁰/oo entre les stades 34 et 37 (Figure 3). Les valeurs de P, déduites de l'indice mitotique par application de la relation 1 connaissant la durée de la mitose et du temps de génération, sont portées dans le tableau II. Ce tableau montre que la diminution de l'indice mitotique observée entre les stades 34 et 37 (Figure 3) est à attribuer essentiellement à la diminution de la proportion des cellules en activité mitotique durant cette période.

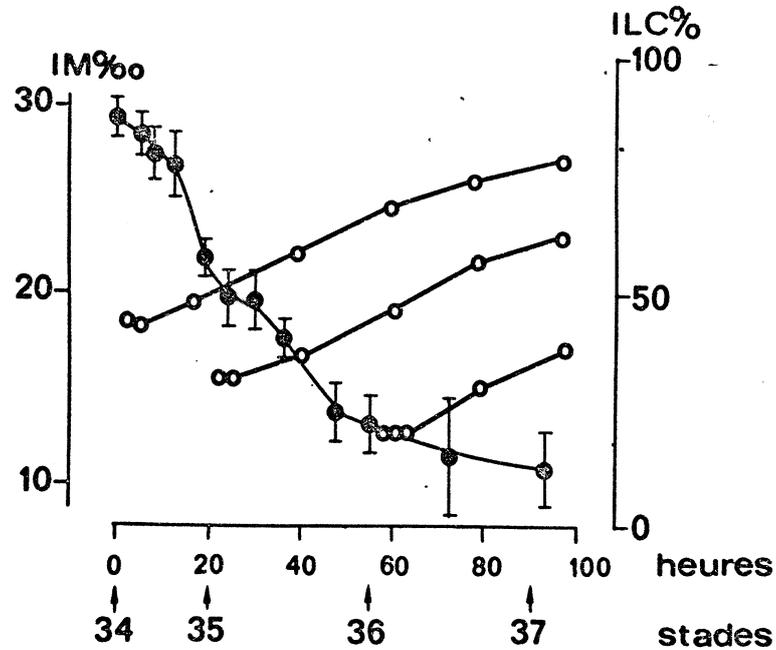


Figure 3 - Courbe de variations de l'indice mitotique IM (—●—) et de l'indice de marquage cumulé ILC (—○—) après des injections répétées de thymidine tritiée commencées aux stades 34, 35 et 36 du développement du pleurodèle élevé à 20°C. Les intervalles de confiance ($2\sigma/\sqrt{n}$) de l'indice mitotique sont portés graphiquement.

Tableau III : Nombre (NR) de cellules en repos mitotique au niveau d'une coupe transversale de l'intestin d'embryons et de larves de pleurodèle, évalué après des injections répétées de $^3\text{HTdR}$ commencées aux stades 34 (NR_{34}), 35 (NR_{35}) et 36 (NR_{36}).
 N : nombre de cellules au niveau d'une coupe transversale ;
 R : valeur de la relation $1 - \text{ILC}$ dans laquelle ILC représente la proportion de cellules marquées à la suite des injections répétées de $^3\text{HTdR}$; R représente donc la proportion de cellules non marquées ou cellules au repos mitotique.

Stades	34	35	36	37
NR_{34}	40 ± 6	41 ± 5	36 ± 4	35 ± 6
NR_{35}	-	72 ± 5	68 ± 6	66 ± 5
NR_{36}	-	-	108 ± 6	106 ± 8

Indice de marquage

L'indice de marquage évalué 1 h après l'injection de $^3\text{HTdR}$ décroît de 45% à 27% entre les stades 34 et 37 (Figure 1). Les valeurs de P, déduites de l'indice de marquage par application de la relation (2) connaissant la durée des phases G_2 , M et S et du temps de génération, sont portées dans le tableau II. Ce tableau montre que la diminution de l'indice de marquage entre les stades 34 à 37 est due principalement à la diminution de la proportion des cellules en activité mitotique pendant cette période.

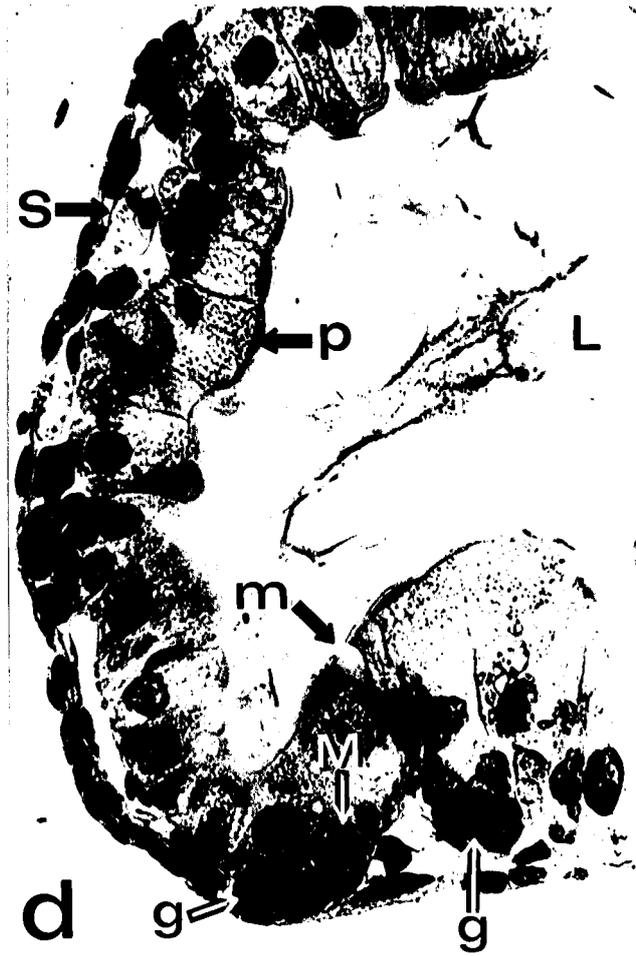
Les valeurs du coefficient de prolifération déduites de l'indice mitotique et de l'indice de marquage sont en bon accord ; néanmoins les secondes sont inférieures aux premières de 1 à 10% environ. Ceci est principalement dû à ce que la valeur de l'indice de marquage qui, dans les populations croissantes, diminue tout d'abord avec le temps (BRUGAL et CHIBON, 1970) est inférieure dès 1 h après l'injection de $^3\text{HTdR}$ à la proportion réelle de cellules en phase S.

Le produit P.N du nombre moyen (N) de cellules par coupe transversale d'intestin et du coefficient de prolifération (P) permet d'évaluer à chaque stade, le nombre de cellules engagées dans un cycle mitotique. Les valeurs obtenues sont portées dans le tableau II ; elles ne varient pas de façon significative entre les stades 34 et 37. Pendant cette période, le nombre de cellules parcourant le cycle mitotique peut donc être considéré comme constant et égal à 36 environ au niveau d'une coupe transversale.

PROPORTION DE CELLULES AU REPOS MITOTIQUE

Les courbes de variation des indices de marquage cumulés (ILC) obtenues après des injections répétées de $^3\text{HTdR}$ à partir des stades 34, 35 et 36, sont portées dans la figure 3. Dès la seconde injection de $^3\text{HTdR}$ l'indice de marquage cumulé représente la proportion de cellules qui, après le stade de la première injection, a parcouru au moins un cycle mitotique. Si N

Figure 4 - Aspect histologique de l'intestin de pleurodèle aux stades 34 (a), 35 (b), 36 (c) et 37 (d) - L : lumière intestinale ; S : splanchopleure ; M : noyau en mitose ; m : cellule à mucus ; g : cellule génératrice d'un nid sous-épithélial ; V : plaquettes vitellines ; p : cellule principale de l'épithélium avec bordure absorbante. Coloration par le bleu alcian, l'hémalun et la phloxine ; grossissement : 250 x.



représente le nombre de cellules au niveau d'une coupe transversale de l'intestin, la valeur de ILC permet de calculer à chaque stade le nombre

$$NR = N(1-ILC)$$

de cellules qui, au niveau de la coupe, ne sont pas marquées et par conséquent en repos mitotique. Les valeurs de NR_{34} , NR_{35} et NR_{36} calculées à partir des expériences d'injection répétées réalisées aux stades 34, 35 et 36, sont portées dans le tableau III. Ce tableau montre que le nombre (NR) de cellules non marquées, à un stade donné, ne varie pas de façon significative au cours du développement ultérieur et que ce nombre est d'autant plus grand que l'expérience d'injections répétées est réalisée à des stades de développement plus avancés. A chaque stade, le nombre (NR) de cellules en repos mitotique, augmenté du nombre (PN) de cellules engagées dans un cycle mitotique (tableau II), est égal au nombre (N) total de cellules au niveau d'une coupe transversale de l'intestin aux erreurs d'expérience près (tableau II) : cette vérification confirme la validité des méthodes employées pour déterminer le coefficient de prolifération (P) et la proportion (R) de cellules en repos mitotique. Comme le montre le tableau III, l'augmentation du nombre de cellules en repos mitotique entre les stades 34 et 35 ($NR_{35} - NR_{34}$) et entre 35 et 36 ($NR_{36} - NR_{35}$) est du même ordre de grandeur et égale, de plus, au nombre constant (NP) de cellules en activité mitotique, soit : 36 à 37 cellules au niveau d'une coupe transversale.

Il résulte clairement de ces observations que chaque cellule qui se divise entre les stades 34 et 37 donne naissance statistiquement à une cellule qui parcourt un nouveau cycle mitotique et à une cellule qui, cessant de se diviser, passe en phase G_0 (Figure 6).

HISTO-DIFFÉRENCIATION DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL

Au stade 34, l'intestin de l'embryon de pleurodèle est un cordon de cellules endodermiques remplies de plaquettes vitelli-

nes et histologiquement indifférenciées ; les noyaux cellulaires dépourvus de nucléole occupent la région centrale des cellules (Figure 4a). Le cordon épithélial est limité par une splanchnopleure monostratifiée.

Au stade 35, la lumière intestinale apparaît par écartement des cellules dans la région axiale ; les membranes cellulaires s'épaississent pour former le plateau strié (Figure 4b)

Au stade 36, l'épithélium intestinal a acquis les caractères d'un épithélium cylindrique absorbant : les noyaux cellulaires sont disposés au pôle basal des cellules et pourvus de 1 ou 2 nucléoles ; le plateau strié s'est épaissi et des cellules à mucus (2%), disséminées entre les cellules principales, commencent à se différencier en acquérant une gouttelette muqueuse. Des dépressions de l'épithélium intestinal, ou infundibula, apparaissent par endroits. Au niveau des infundibula, certaines cellules endodermiques (29%) passent en position sous-épithéliale pour constituer des nids composés chacun de 1 à 4 cellules pauvres en cytoplasme. Contrairement aux cellules principales de l'épithélium, les cellules des nids sont en général dépourvues de plaquettes vitellines (Figure 4c).

Au stade 37, la plupart (87%) des cellules de l'épithélium intestinal ont perdu leurs plaquettes vitellines. Les cellules à mucus (11%) commencent à s'ouvrir dans la lumière intestinale et les nids sous-épithéliaux regroupent 19% des cellules. L'épithélium a acquis un aspect fonctionnel et les larves, dont l'éclosion est survenue entre les stades 35 et 36, commencent à se nourrir dès le stade 37 (Figure 4d).

RAPPORTS ENTRE LA PROLIFÉRATION ET LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRES

Aux stades 34 et 35, les mitoses apparaissent en tous points du cordon épithélial intestinal ; par contre, dès le stade 36, les mitoses se rencontrent dans les nids sous-épithéliaux qui s'individualisent. Quelques figures mitotiques sont cependant encore observées exceptionnellement dans la couche des cellules principales. De façon à vérifier la localisation préférentielle apparente des cellules proliférantes au niveau des nids

sous-épithéliaux, l'ADN des noyaux cellulaires a été dosé par fluorométrie dans les nids et l'épithélium fonctionnel au stade 37. Les résultats obtenus sont exprimés par l'histogramme de la figure 5 et montrent que la plupart (82%) des cellules principales contiennent 10 à 49 unités arbitraires d'ADN alors que la plupart (93%) des cellules des nids contiennent 40 à 119 unités arbitraires d'ADN. Il apparaît donc que les cellules épithéliales sont en phase G_0 ou G_1 avec un taux diploïde d'ADN alors que les cellules des nids, qui ont un taux d'ADN compris entre le taux diploïde et le taux tétraploïde, sont des cellules en phases S et G_2 du cycle cellulaire.

La proportion (P) de cellules engagées dans un cycle mitotique (tableau II) est très peu différente de la proportion de cellules endodermiques constituant les nids sous-épithéliaux aux stades 36 (29%) et 37 (19%). Les cellules engagées dans un cycle mitotique et constituant les nids sous-épithéliaux représentent donc la totalité du compartiment générateur intestinal qui s'individualise histologiquement dès le stade 36.

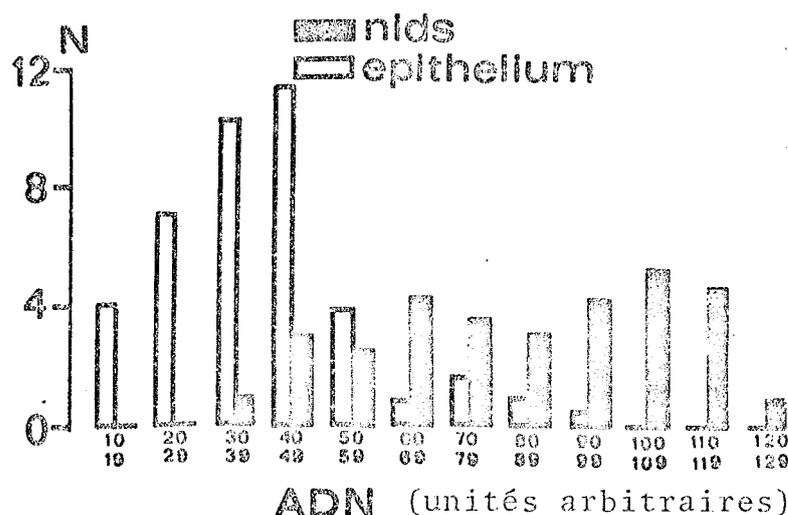
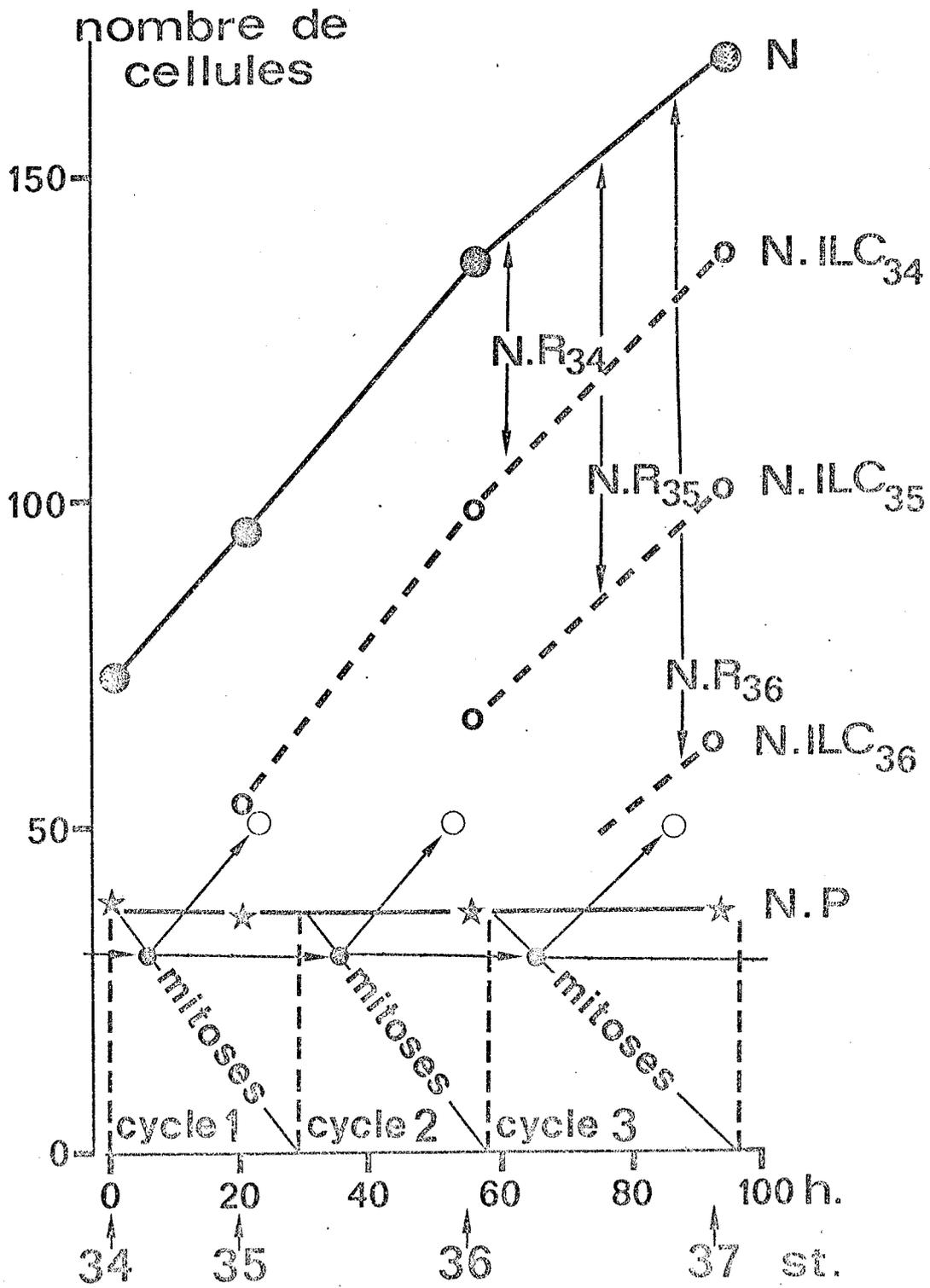


Figure 5 - Histogramme de la concentration en ADN des noyaux des cellules des nids sous-épithéliaux et des cellules principales de l'épithélium, mesurée par fluorométrie après coloration par la réaction de Feulgen. N : nombre de cellules.

Figure 6 - Cinétique de la prolifération cellulaire dans l'intestin embryonnaire et larvaire du pleurodèle entre les stades 34 et 37. Trois cycles cellulaires (cycles 1, 2 et 3) se déroulent pendant cette période ; les mitoses successives donnent chacune naissance statistiquement à une cellule capable de se diviser une nouvelle fois ($\rightarrow \bullet$) et à une cellule qui cesse de se diviser et se différencie ($\rightarrow \circ$). Par ce processus, le nombre NP ($- \star -$) de cellules en activité mitotique reste constant et le nombre de cellules différenciées augmente après chaque cycle cellulaire d'une valeur ($NR_{35} - NR_{34}$; $NR_{36} - NR_{35}$) égale au nombre (NP) de cellules en activité mitotique. Une telle cinétique explique l'augmentation observée du nombre total N ($- \bullet -$) de cellules dans l'épithélium intestinal et l'augmentation parallèle du nombre de cellules $N.ILC_{34}$, $N.ILC_{35}$ et $N.ILC_{36}$ ($\leftarrow \bullet \rightarrow$) marquées à la suite d'injections répétées de thymidine tritiée commencées aux stades 34, 35 et 36 respectivement.



DISCUSSION

Durant les 4 jours de développement qui séparent, à 20°C, le stade 34 du stade 37, l'intestin de pleurodèle passe d'un état histologiquement indifférencié chez l'embryon âgé à un état différencié et fonctionnel chez la jeune larve. L'état indifférencié se caractérise par l'absence de lumière intestinale, le canal archentérique étant partiellement oblitéré. Les cellules apparemment toutes semblables et remplies de plaquettes vitellines, constituent un cordon dans lequel les figures mitotiques sont distribuées au hasard. L'état différencié et fonctionnel se caractérise, au contraire, par une lumière intestinale largement ouverte limitée par un épithélium constitué de cellules absorbantes à plateau strié et de cellules à mucus. L'activité mitotique est localisée au niveau des nids cellulaires sous-épithéliaux.

Pendant la période de différenciation, la prolifération cellulaire présente une cinétique simple résumée dans la figure 6 : 3 cycles mitotiques successifs sont parcourus de façon asynchrone par un nombre constant de cellules ; après chaque cycle cellulaire, l'augmentation du nombre des cellules en repos mitotique dans la population intestinale est égale au nombre de cellules proliférantes. Les mitoses donnent donc naissance statistiquement à une cellule qui cesse de parcourir le cycle mitotique pour passer en phase G_0 correspondant à une phase G_1 indéfiniment prolongée, et à une cellule qui parcourt le cycle mitotique pour se diviser à nouveau.

Le stade 36, qui marque la fin du développement embryonnaire, représente un moment critique de l'évolution de la différenciation et de la prolifération intestinales ; en effet, c'est à partir de ce stade qu'apparaissent les premières cellules ayant résorbé la totalité de leurs réserves vitellines, que les nucléoles apparaissent dans les noyaux des cellules principales et que les premières cellules à mucus se différencient. La durée de la phase G_1 quadruple dans la population cellulaire en activité mitotique qui, dès le début du stade 36 s'individualise histologiquement pour constituer des nids cellulaires sous-épithéliaux représentant un compartiment générateur discontinu.

L'épithélium intestinal des Urodèles diffère de celui des Mammifères par l'absence de cryptes de LIEBERKÜHN et de villosités ; cependant, les modalités de la différenciation intestinale sont très semblables dans ces deux groupes ; en effet, chez le rat comme chez le pleurodèle, la différenciation du tractus intestinal se produit à la fin du développement embryonnaire et s'accompagne de modifications comparables de la prolifération. EASTWOOD et TRIER (1974) rapportent qu'au 16^{ème} jour de la gestation, le colon du foetus de rat est un cordon indifférencié de cellules endodermiques présentant une activité mitotique non localisée, et qui, peu avant le 22^{ème} et dernier jour de gestation, s'organise rapidement en un épithélium absorbant dans lequel l'activité mitotique est confinée à la moitié inférieure des cryptes : c'est à ce moment que se différencient les cellules à mucus comme chez l'embryon de pleurodèle. Les mêmes événements ont été décrits dans le duodénum du rat et de la souris (LEBLOND et MESSIER, 1958 ; QUAESTLER et SHERMAN, 1959 ; HERMOS et al, 1971). Dans le phénomène de localisation de l'activité mitotique par lequel un compartiment générateur s'individualise au moment de la différenciation intestinale, les nids sous-épithéliaux du pleurodèle représentent l'équivalent des cryptes des Mammifères. L'analogie entre ces deux formations est d'ailleurs également vérifiée chez les adultes puisque les nids sous-épithéliaux assurent, comme la base des cryptes des Mammifères (QUAESTLER et SHERMAN, 1959 ; LIPKIN et QUAESTLER, 1962), le renouvellement des cellules intestinales chez les Urodèles étudiés à cet égard (PATTEN, 1960 ; MARTIN, 1971). Le compartiment générateur, responsable du renouvellement de l'épithélium intestinal fonctionnel du pleurodèle adulte, s'individualise donc au moment de la différenciation de l'intestin et correspond aux seules lignées cellulaires qui, au stade 34 et avant même que la différenciation histologique ne se manifeste, sont responsables de toute l'activité mitotique intestinale conservée au cours du développement ultérieur par un nombre fixe de cellules. La diminution relative de l'activité mitotique intestinale est la conséquence d'une baisse progressive du coefficient de prolifération qui passe de 50% environ au stade 34 à 5,5% chez le pleurodèle adulte (CHIBON et BRUGAL, 1973).

La cinétique de la prolifération cellulaire au cours de la différenciation intestinale du pleurodèle est d'un type fondamentalement opposé à celui qui a été décrit au cours de la différenciation du système nerveux axial de l'embryon de souris (SMART, 1972) : dans ce dernier cas, la différenciation s'établit brusquement à la suite de l'arrêt simultané des divisions des cellules génératrices (Figure 7a). Dans l'épithélium intestinal, au contraire, les résultats que nous avons obtenus montrent que la différenciation ne s'établit qu'après l'arrêt de division de la moitié seulement des nouvelles cellules apparaissant à chaque génération, ce qui laisse ainsi persister dans la population une proportion décroissante de cellules en activité mitotique (Figure 7b). Une telle différence de cinétique cellulaire est évidemment à mettre en relation avec l'absence de renouvellement cellulaire dans le système nerveux par opposition au remplacement continu des cellules intestinales.

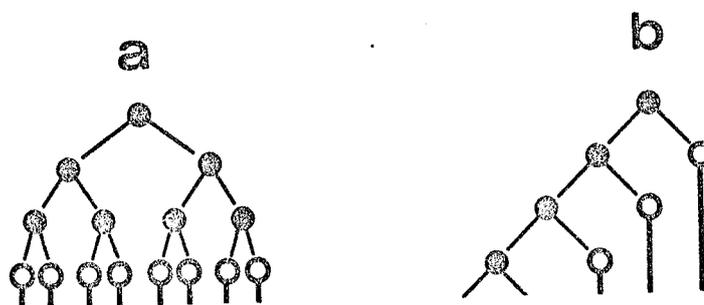


Figure 7 - Modèles de cinétique cellulaire comportant deux types de cellules : les cellules génératrices capables de se diviser (●) et les cellules différenciées ayant cessé leur activité mitotique (○).

a - Modèle dans lequel l'apparition des cellules différenciées est brusque et s'accompagne de la disparition des cellules génératrices.

b - Modèle dans lequel l'apparition des cellules différenciées est progressive et laisse persister des cellules génératrices.

La question reste posée de savoir pourquoi le déclenchement de la différenciation fonctionnelle des cellules intestinales associé à l'arrêt de division se produit à un moment précis du développement embryonnaire ? Les travaux déjà réalisés dans ce domaine permettent d'envisager actuellement deux hypothèses répondant à cette question : la première invoque des causes cellulaires intrinsèques liées au nombre de divisions survenues dans la lignée endodermique depuis la fécondation ; la seconde suppose l'apparition, à un moment donné du développement, de substances inhibitrices de la prolifération cellulaire intestinale.

La première hypothèse est fondée sur l'étude des effets de la température sur la prolifération cellulaire dans divers tissus de l'embryon de pleurodèle (BRUGAL, 1971 b). Ces travaux ont montré que le coefficient de prolifération des tissus embryonnaires à un stade donné du développement est indépendant de la température ; par contre, la durée des cycles cellulaires varie grandement avec la température et dans les mêmes proportions que la vitesse du développement : chaque stade embryonnaire est donc atteint, quelle que soit la température, après un nombre défini de divisions cellulaires particulier à chaque tissu. Il semble donc, en accord avec des résultats similaires obtenus par DETTLAFF (1964) et ROTT et SHEVELEVA (1968), que l'arrêt de division d'une cellule, précédant sa différenciation, est conditionné par le nombre de cycles mitotiques, parcourus depuis la fécondation, dans la lignée qui lui donne naissance et intervient au moment où est atteint un certain degré de dilution ou de ségrégation des répresseurs cytoplasmiques de son génôme (BRUGAL, 1971 b). Ainsi, l'apparition soudaine de cellules à mucus, par exemple, qui a lieu au stade 36 surviendrait après un nombre défini de divisions cellulaires dans la lignée qui leur donne naissance.

La seconde hypothèse est fondée sur la mise en évidence, dans l'épithélium intestinal différencié du pleurodèle adulte, de 2 substances antimitotiques inhibant, en phase G_1 et G_2 respectivement, les cycles cellulaires de l'épithélium intestinal embryonnaire (BRUGAL, 1973 ; BRUGAL et PELMONT, 1974 ; 1975). L'apparition de telles substances dans l'endoderme à la

fin du développement embryonnaire du pleurodèle pourrait être responsable de la diminution de la proportion de cellules en activité mitotique. L'achèvement de la différenciation des cellules endodermiques apparaîtrait dans ce cas comme une conséquence du blocage mitotique.

L'une ou l'autre de ces hypothèses est insuffisante pour rendre compte à la fois de la rigueur chronologique constatée dans le déroulement de la différenciation associée aux modifications de la prolifération cellulaire, et des possibilités de régulation et de cicatrisation observées dans les tissus embryonnaires.

BIBLIOGRAPHIE

- BRUGAL, G. : Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires : étude autoradiographique chez les embryons et les jeunes larves de Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibien, Urodèle). *Develop. Biol.* 24, 301-321 (1971_a)
- BRUGAL, G. : Etude autoradiographique de l'influence de la température sur la prolifération cellulaire chez les embryons âgés de Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibien, Urodèle). *Wilhelm Roux's Archiv.* 168, 205-225 (1971_b)
- BRUGAL, G. : Effects of adult intestine and liver extracts on the mitotic activity of corresponding embryonic tissues of Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibia, Urodela). *Cell Tissue Kinet.* 6, 519-524 (1973)
- BRUGAL, G. : Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires dans l'intestin embryonnaire et larvaire de Pleurodeles waltlii Michah. II-Effet des chalones intestinales extraites de l'intestin adulte. *Wilhelm Roux's Archiv.*, (même volume).
- BRUGAL, G., BERTRANDIAS, J. P. : Méthode mathématique d'évaluation du coefficient de prolifération dans les populations cellulaires embryonnaires en croissance exponentielle. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 270, 1603-1606 (1970)
- BRUGAL, G., CHIBON, P. : Signification des variations périodiques de l'indice de marquage en fonction du temps dans les tissus embryonnaires. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 270, 998-1001 (1970)
- BRUGAL, G., PELMONT, J. : Présence, dans l'intestin du Triton adulte Pleurodeles waltlii Michah., de deux facteurs antimitotiques naturels (chalones) actifs sur la prolifération cellulaire de l'intestin embryonnaire. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 278, 2831-2834 (1974)

- BRUGAL, G., PELMONT, J. : Existence of two chalone-like substances in intestinal extract from the adult newt, inhibiting embryonic intestinal cell proliferation. *Cell Tissue Kinet.* 8, 171-187 (1975)
- BULLOUGH, W. S. : Mitotic and functional homeostasis : a speculative review. *Cancer Res.* 25, 1683-1727 (1965)
- CHIBON, P. : Etude au moyen de la thymidine tritiée de la durée des cycles mitotiques dans la jeune larve de Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibien, Urodèle). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 267, 203-205 (1968)
- CHIBON, P., BRUGAL, G. : Durée de disponibilité de la thymidine exogène chez la larve et le jeune du triton Pleurodeles waltlii Michah. *Annales Embryol. Morph.* 6, 81-92 (1973)
- DETLAFF, T. A. : Cell division, duration of interkinetic states and differentiation in early stages of embryonic development. *In* : *Advances in Morphogenesis* (M. Abercrombie, J. Brachet, eds.), 3, p. 323-362. Academic Press, New York and London. 1964
- DOURNON, C., CHIBON, P. : Influence de la température, de l'âge et des conditions hormonales (thyroxine) sur la prolifération cellulaire chez la jeune larve et pendant la métamorphose du crapaud Bufo bufo L. (Amphibien Anoure). *Wilhelm Roux's Archiv.* 175, 27-47 (1974)
- EASTWOOD, G. L., TRIER, J. S. : Epithelial cell proliferation during organogenesis of rat colon. *Anat. Rec.* 179, 303-310 (1974)
- GALLIEN, L., DUROCHER, M. : Table chronologique du développement de Pleurodeles waltlii. *Bull. Biol. Fr. et Belg.* 91, 97-114 (1957)
- GRAF, B., BESCOT-LIVERSAC, J. : Variation du coefficient mito-

tique et activité biochimique. Etude de la différenciation du parenchyme hépatique chez l'oie en période embryonnaire et après l'éclosion. Bull. Ass. Anatomistes. 163, 877-884 (1974)

GROSS, M., GOLDWASSER, E. : On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. VII - The relationship between stimulated deoxyribonucleic acid synthesis and ribonucleic acid synthesis. J. Biol. Chem. 245, 1632-1636 (1970)

HERMOS, J. A., MATHAN, M., TRIER, J. S. : DNA synthesis and proliferation by villous epithelial cells in fetal rats. J. Cell Biol. 50, 255-258 (1971)

HOLTZER, H. : Mitosis and cell transformations. General physiology and cell specialization. (D. Mazia and A. Tyler, eds.), p. 80-90. Mc Graw-Hill Book Company, New York. 1963

HOLTZER, H., WEINTRAUB, H., MAYNE, R., MOCHAN, B. : The cell cycle, cell lineages and cell differentiation. In : Current Topics in Developmental Biology, 7, p. 229-256. Academic Press. New York and London. 1972

KITANO, Y., HU, F. : Proliferation and differentiation of pigment cells in vitro. J. Invest. Dermatol. 55, 444-451 (1970)

LEBLOND, C. P., MESSIER, B. : Renewal of chief and goblet cells in the small intestine as shown by radioautography after injection of thymidine- H^3 into mice. Anat. Rec. 132, 247-260 (1958)

LIPKIN, M. : Proliferation and differentiation of gastrointestinal cells. Physiol. Rev., 53, 891-915 (1973)

LIPKIN, M., QUASTLER, H. : Cell population kinetics in the colon of the mouse. J. Clin. Invest. 41, 141-146 (1962)

- MARTIN, R. : Etude autoradiographique du renouvellement intestinal de l'axolotl (Amphibien, Urodèle). C. R. Acad. Sci. Paris, 272, 2816-2819 (1971)
- OWENS, I. S., VONDERHAAR, B. K., TOPPER, Y. J. : Concerning the necessary coupling of development to proliferation of mouse mammary epithelial cells. J. Biol. Chem. 248, 472-477 (1973)
- PARDÉE, A. B. : A restriction point control of normal animal cell proliferation. Proc. nat. Acad. Sci. USA, 71, 1286-1290 (1974)
- PATTEN, S. F. : Renewal of the intestinal epithelium of the Urodele. Exp. Cell Res. 20, 638-641 (1960)
- PAUL, J., HUNTER, J. A. : DNA synthesis is essential for increased haemoglobin synthesis in response to erythropoietin. Nature (London) 219, 1362-1363 (1968)
- QUASTLER, H., SHERMAN, F. G. : Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. Exp. Cell Res. 17, 420-438 (1959)
- ROTT, N. N., SHEVELEVA, G. A. : Changes in the rate of cell divisions in the course of early development of diploid haploid loach embryos. J. Embryol. exp. Morphol. 20, 141-150 (1968)
- RUCH, J. V., KARCHER-DJURICIC, V. : Action de la 5-fluoro-deoxyuridine sur la différenciation in vitro de molaires d'embryons de souris. Arch. Biol., 82, 115-129 (1971)
- SMART, I. H. M. : Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the spinal cord in the mouse. J. Anat. 111, 365-380 (1972)
- STERN, J. B., DAYTON, L., DUECY, J. : The uptake of tritiated

thymidine by the dorsal epidermis of the fetal and newborn rat. *Anat. Rec.*, 170, 225-234 (1971)

TURKINGTON, R. W., TOPPER, Y. J. : Androgen inhibition of mammary gland differentiation in vitro. *Endocrinology*. 80, 329-336 (1967)

VONDERHAAR, B. K., TOPPER, Y. J. : A role of the cell cycle in hormone-dependent differentiation. *J. Cell Biol.* 63, 707-712 (1974)

WESSELLS, N. K. : Problems in the analysis of determination, mitosis, and differentiation. *Epithelial-Mesenchymal Interactions*. (R. Fleischmajer, R. E. Billingham, eds.), p. 132-151. The Williams & Wilkins Company, Baltimore 1968

Relations entre la prolifération et la
différenciation cellulaires dans l'intestin
embryonnaire et larvaire de Pleurodeles
waltlii, Michah.

II : Effets des chalones intestinales extraites
de l'intestin de pleurodèle adulte

Relationships between the cell proliferation
and the differentiation in the embryonic
and larval intestine of Pleurodeles waltlii,
Michah.

II : Effects of intestinal chalones
extracted from the intestine of
the adult newt.

G. BRUGAL*

Laboratoire de Zoologie et Biologie animale,
Université Scientifique et Médicale de
Grenoble, B. P. 53, 38041 GRENOBLE CEDEX

FRANCE

* Ce travail a bénéficié de l'aide du CNRS
(ATP N° A655 1799) et de l'INSERM (AT N° 74142036).

SOU MIS POUR PUBLICATION DANS WILHELM ROUX'ARCHIV

RESUME

Les chalones 1 et 2, extraites de l'intestin de pleurodèle adulte, inhibent en phase G_1 et G_2 respectivement les cycles mitotiques de l'épithélium intestinal embryonnaire. Les effets de ces chalones sur la prolifération et la différenciation cellulaires dans ce tissu ont été étudiés en fonction de la dose injectée, du stade de développement et de la durée du traitement. L'inhibition provoquée par la chalone 2 est proportionnelle à la dose injectée entre deux seuils de concentration. Le quart environ des cellules intestinales en activité mitotique est insensible à la chalone 2 même à la suite d'injections répétées de l'inhibiteur. Seules les cellules intestinales des embryons âgés (stade 34) sont sensibles à cette chalone et répondent par un allongement de la phase G_2 qui, malgré des injections répétées de l'inhibiteur, n'excède pas une vingtaine d'heures. La sensibilité des cellules de l'épithélium intestinal à la chalone 1 se manifeste à la fin du développement (stade 33), comme dans le cas de la chalone 2. A l'égard de la chalone 1, la population cellulaire en activité mitotique dans l'intestin embryonnaire apparaît hétérogène et comprend : 50 % de cellules aptes à être inhibées par des doses faibles de chalone 1 ; 25 % de cellules aptes à n'être inhibées que par des doses de chalone 1 cent fois plus élevées et 25% environ de cellules insensibles à cet inhibiteur. Les injections répétées de chalone 1 bloquent définitivement en phase G_1 la moitié environ des cellules en activité mitotique dans l'épithélium intestinal indifférencié au stade 34 ; en outre, elles accélèrent la consommation du vitellus, favorisent la différenciation des cellules à mucus et diminuent le nombre des cellules constituant les nids sous-épithéliaux qui apparaissent au stade 36 et représentent le compartiment générateur de l'épithélium intestinal. Les résultats obtenus permettent de proposer un modèle de cinétique de la prolifération cellulaire au cours de la différenciation de l'épithélium intestinal du pleurodèle ; de plus, ils conduisent à l'hypothèse que le nombre de divisions subies par une cellule embryonnaire et le taux de chalone dans le tissu auquel elle appartient, sont les deux signaux complémentaires qui déclenchent le blocage du cycle mitotique et l'achèvement de la différenciation dans cette cellule.

SUMMARY

The intestinal chalones 1 and 2, extracted from the intestine of the adult newt, are known to inhibit the G_1 and G_2 phases of the cell cycle in the embryonic intestine. The effects of the intestinal chalones 1 and 2 on the proliferation and the differentiation of the intestinal cells of the newt embryos, was studied regarding the dose-response relationship, the embryonic stages and the duration of treatment. The chalone 2 triggered a linear dose-dependent inhibition between two concentration thresholds ; nevertheless about 25% of the cycling cells were not inhibited, neither by the highest doses injected nor by repeated injections. The sensitivity to chalone 2 appeared in the intestinal epithelium at the end of the embryonic development (stage 34) but the cells were not delayed in the G_2 phase for more than about 20 h in spite of repeated injections. It was inferred from the dose-response curve of the mitotic inhibition by chalone 1, that the intestinal cell population was heterogeneous : about 50% of the cycling cells were inhibited by low concentrations of chalone 1 ; an additional proportion of about 25% of cycling cells was inhibited by 100 x more concentrated chalone 1 and the remaining 25% was insensitive to the inhibitor. The repeated injections of chalone 1 blocked definitively in the G_1 phase about 50% of the cycling cells, quickened the digestion of the yolk platelets, promoted the differentiation of the goblet cells and depressed the number of stem cells in the proliferative compartment located beneath the epithelium. A kinetics model of cell proliferation and cell differentiation in the intestinal cell lineages was elaborated and it was suggested that the arrest of the mitotic activity and the completion of the differentiation in an embryonic cell depends on two incoming signals : one is intracellular and appears when the required number of cell cycles has occurred in the cell lineage, leading to a committed stem cell sufficiently differentiated to synthesise chalone and to respond to chalone ; the other signal is extracellular and appears when the chalone concentration is high enough : i. e. when the required number of cells is obtained in this tissue.

INTRODUCTION

Dans leur modèle mathématique de régulation de la croissance, WEISS et KAVANAU (1957) postulent que, dans les tissus en état stable des organismes adultes, les pertes cellulaires qui affectent le compartiment des cellules différenciées et fonctionnelles sont compensées exactement par la production de nouvelles cellules par le compartiment générateur. L'équilibre entre les pertes cellulaires et l'activité mitotique génératrice serait réalisé grâce à la synthèse, par les cellules différenciées, de substances inhibant l'activité mitotique dans le compartiment générateur selon un mécanisme de "feedback" négatif. De nombreux travaux ont fourni des fondements expérimentaux à ce modèle et ont conduit à la généralisation du concept de "chalone" (voir revue dans Natl. Cancer. Inst. Monograph., 38, 1973). Les chalones sont des substances antimitotiques naturelles produites par le tissu sur lequel elles agissent ; elles présentent une stricte spécificité tissulaire mais pas de spécificité zoologique. Bien que ces substances aient des caractères biochimiques et un mode d'action encore imparfaitement connus, elles semblent jouer un rôle de première importance dans les relations entre la différenciation et l'activité mitotique des cellules. En effet, la plupart des chalones actuellement recensées inhibent la synthèse de l'ADN (LOZZIO et al., 1975) en bloquant les cellules en phase G_1 du cycle mitotique. Or, c'est précisément dans cette phase que sont arrêtées les cellules qui se différencient pour devenir fonctionnelles. Le début de la phase G_1 est un moment critique pendant lequel se présente à la cellule l'alternative de poursuivre le cycle mitotique et de se diviser à nouveau, ou de cesser toute activité mitotique et de se différencier. C'est à ce moment, appelé "dichophase" (BULLOUGH, 1965) ou "restriction point" (PARDEE, 1974) que la cellule devient sensible aux conditions de son environnement à la suite, probablement, d'une brève modification de sa membrane (STOKER, 1974). Le passage d'une cellule par ce moment critique de la phase G_1 semble donc un préalable nécessaire à sa différenciation provoquée par des facteurs extrinsèques tels que les hormones (VONDERHAAR et TOPPER, 1973).

les chalones (BULLOUGH, 1975) ou tout autre signal connu comme inducteur. Le rôle de ces facteurs extrinsèques de différenciation semble permissif plutôt qu'informatif, les cellules qui se différencient ne faisant qu'exprimer des possibilités de spécialisation dépendant de la lignée à laquelle elles appartiennent (HOLTZER et al, 1972). La différenciation apparaît donc comme le résultat de l'interaction entre facteurs extrinsèques et facteurs intrinsèques. Parmi ces derniers, l'histoire mitotique des cellules, au cours du développement embryonnaire précoce, semble l'un des plus importants (DETTLAFF, 1964 ; BRUGAL, 1971). L'aptitude d'une cellule à se différencier apparaît donc comme l'aboutissement de son histoire mitotique ; celle-ci ayant pour fonction de permettre, de façon probablement progressive, l'expression des gènes commandant les synthèses spécifiques de l'état différencié fonctionnel, et l'extinction corrélative des gènes commandant la division.

Dans le but de contribuer à comprendre les interactions entre un facteur extrinsèque (chalone) et un facteur intrinsèque (nombre de divisions cellulaires) au cours de la différenciation de l'intestin, les effets des chalones intestinales sur la différenciation et la prolifération cellulaire de l'épithélium intestinal embryonnaire et larvaire ont été étudiés chez Pleurodeles waltlii Michah. Deux chalones, inhibant spécifiquement la prolifération cellulaire de l'épithélium intestinal embryonnaire, ont été extraites de l'intestin de pleurodèle adulte et partiellement purifiées (BRUGAL et PELMONT, 1975) : l'une, caractérisée par un poids moléculaire de 120 000 environ, bloque les cellules intestinales en phase G_1 du cycle mitotique ; l'autre, caractérisée par un poids moléculaire de 2 000 environ, bloque les cellules intestinales en phase G_2 . Ces chalones fournissent un outil expérimental permettant de perturber le développement normal des cycles cellulaires dans l'épithélium intestinal au moment où, à la fin du développement embryonnaire, ce tissu passe rapidement d'un état indifférencié à un état fonctionnel. L'effet des chalones sur la différenciation et l'activité mitotique des cellules intestinales est décrit dans le présent mémoire en faisant référence aux conditions normales de la différenciation et de la prolifération cellu-

lares dans l'intestin embryonnaire et larvaire, décrites précédemment (BRUGAL, 1977 même volume).

MATERIEL ET METHODES

Les effets des chalones intestinales sur la prolifération et la différenciation cellulaires de l'épithélium intestinal embryonnaire ont été étudiés en fonction de l'âge de l'embryon, de la dose injectée et de la durée du traitement.

PRÉPARATION DES CHALONES INTESTINALES

Les chalones intestinales ont été extraites de l'intestin de pleurodèle adulte selon la méthode déjà décrite (BRUGAL et PELMONT, 1974) et séparées par chromatographie sur gel de "Sephadex G 200" après élution par la solution saline opératoire de Holtfreter tamponnée par le phosphate de sodium $10^{-2}M$ à pH 7 (solution HOP). Parmi les 45 fractions de 1 ml chacune, issues de la chromatographie de l'extrait aqueux de 4 intestins, les fractions 7 à 10 contiennent la chalone 1 inhibant les cellules intestinales embryonnaires en phase G_1 , et les fractions 35 à 39 contiennent la chalone 2 inhibant ces cellules en phase G_2 (BRUGAL et PELMONT, 1975). Les fractions 7 à 10 ont été groupées puis réduites, par évaporation sous vide, à un volume total de 1 ml représentant la source de chalone 1. Les fractions 35 à 39 ont été groupées et concentrées de la même façon pour constituer la source de chalone 2. L'effet inhibiteur de ces substances sur la prolifération cellulaire est exprimé par le rapport :

$$\frac{IM_t - IM_c}{IM_t} \%$$

dans lequel :

IM_c = indice mitotique après traitement par la chalone

IM_t = indice mitotique chez le témoin correspondant.

EFFETS DES CHALONES EN FONCTION DE L'ÂGE DES EMBRYONS

La chalone 1 a été injectée à des embryons de pleurodèle

(10^{-3} ml par animal) aux stades 20 (fin de neurulation), 26, 30, 33 et 34 (fin de l'organogenèse embryonnaire) de GALLIEN et DUROCHER (1957). Ces stades sont atteints respectivement après 70 h, 110 h, 155 h, 210 h et 260 h de développement à 20°C. Les 16 embryons traités à chaque stade ont été fixés à raison de 2 individus toutes les 5 heures pendant les 40 heures qui ont suivi l'injection. Des embryons témoins ayant reçu une injection de solution HOP ont été fixés dans les mêmes conditions. Une expérience parallèle a été réalisée aux mêmes stades par injection de chalone 2. Les 16 embryons traités à chaque stade par la chalone 2 et les témoins correspondants traités par la solution HOP ont été fixés à raison de 2 individus toutes les 2 heures au cours des 16 heures qui ont suivi l'injection.

L'endoderme représentant le futur tube digestif a été prélevé chez les embryons traités et les témoins, après fixation dans le liquide de SMITH, puis écrasé entre lame et lamelle et coloré par la réaction de Feulgen. L'indice mitotique a été calculé dans ce tissu après comptage de 1 200 à 2 800 cellules par embryon.

EFFETS DE LA DOSE DE CHALONE INJECTÉE

Les sources de chalone 1 et 2 ont été diluées 10, 30, 60, 100, 300, 600 et 1 000 fois par addition de solution HOP. Les solutions de chalone aux différentes dilutions ont été injectées à des embryons de pleurodèle au stade 34 (4 animaux injectés pour chaque dilution ; 10^{-3} ml par animal). Compte-tenu de la durée du cycle cellulaire et de ses phases aux stades 34 et 35 (T = 29 h, G₁ = 2 h, S = 24 h, G₂ = 1 h et M = 2 h), les embryons traités par les diverses doses de chalone 1 ont été fixés 30 h après l'injection et les embryons traités par la chalone 2 ont été fixés 5 h après l'injection. Quatre embryons témoins ont reçu, dans les mêmes conditions, une injection de solution HOP : deux d'entre eux ont été fixés 5 heures après l'injection et les 2 autres, 30 heures après l'injection. L'intestin des embryons traités et des témoins a été prélevé après fixation dans le liquide de SMITH, écrasé entre lame et lamelle, puis coloré par la réaction de Feulgen. L'indice mitotique a

été calculé dans cet organe après comptage de 4 800 à 5 200 cellules par embryon

EFFETS D'UN TRAITEMENT PROLONGÉ PAR LES CHALONES

Dans le but d'étudier d'éventuelles modifications dans le déroulement de la différenciation de l'intestin à la suite d'un blocage de l'activité mitotique durant une longue période, des injections de chalone 1 non diluée (10^{-3} ml/animal) ont été pratiquées toutes les 4 heures pendant les 4 jours qui séparent le stade 34 du stade 37 à 20°C. Les 60 embryons traités au début de l'expérience ont été fixés par groupes de 5 à divers intervalles de temps échelonnés entre 1 h et 93 h après la première injection. Une expérience parallèle a été réalisée par injection de chalone 2 dans les mêmes conditions. Les chalones injectées ont été nouvellement préparées chaque jour et conservées à 4°C entre les injections. Les 24 embryons témoins des deux expériences parallèles ont reçu des injections répétées de solution HOP dans les mêmes conditions que les embryons traités par les chalones 1 et 2 et ont été fixés par groupes de 2 en même temps que ces derniers. Les embryons traités et les témoins ont été fixés dans le liquide de SMITH, inclus dans la paraffine, débités en coupes sériées de 5 μ m d'épaisseur puis colorés par la réaction de Feulgen et le picro-indigo-carmin. Les préparations histologiques obtenues ont permis de calculer l'indice mitotique, la proportion de cellules à mucus, la proportion de cellules dépourvues de vitellus, la proportion de cellules intestinales constituant les nids sous-épithéliaux et le nombre moyen de cellules intestinales au niveau d'une coupe transversale, après comptage de 2 700 à 4 300 cellules par embryon.

RESULTATS

EFFETS DE LA DOSE DE CHALONE INJECTÉE

— La courbe de variations de l'inhibition de l'activité mitotique intestinale, établie en fonction de la dose de chalone 2 injectée à des embryons au stade 34, est donnée dans la figure 1. Cette courbe montre que l'effet antimitotique de la chalone 2 décroît linéairement avec la dilution de l'inhibiteur. Aucun effet n'est obtenu après injection des dilutions 300 x à 1 000 x ; par contre, la plus forte inhibition obtenue après injection de la dilution 10 x (72,9%) n'est pas significativement différente de l'inhibition obtenue après injection de la source de chalone 2 non diluée (71,5%) : les doses correspondantes de chalone 2 représentent donc un seuil d'activité maximale dans nos conditions expérimentales. Il semble donc que le quart environ des cellules intestinales embryonnaires en activité mitotique est insensible à la chalone 2.

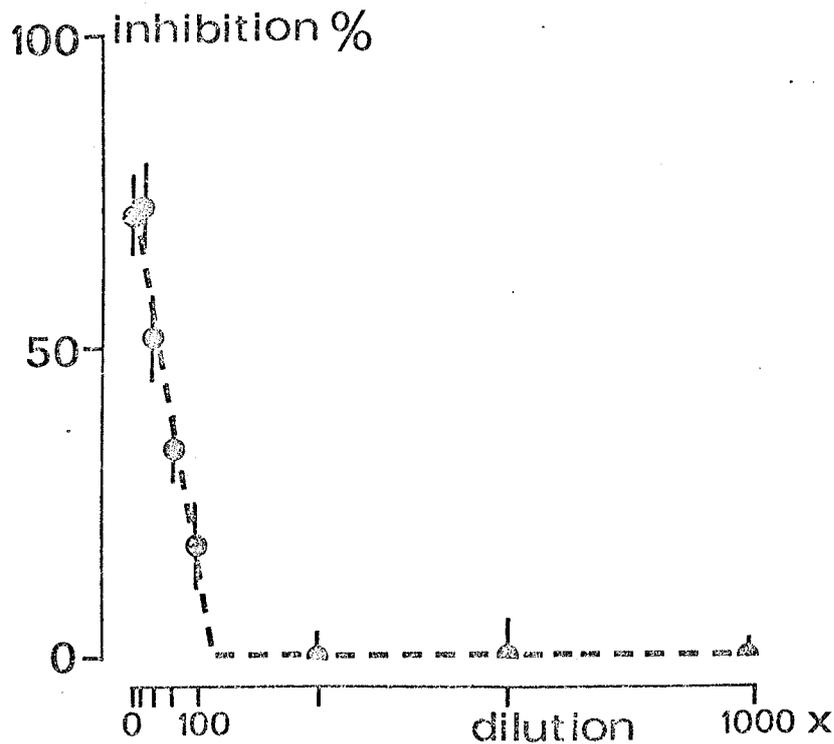


Figure 1 - Variations de l'inhibition de l'activité mitotique dans l'épithélium intestinal en fonction de la dilution de chalone 2 injectée à des embryons de pleurodèle au stade 34. Les intervalles de confiance ($2\sigma/\sqrt{n}$) sont donnés graphiquement.

— La courbe de variations de l'inhibition de l'activité mitotique établie en fonction de la dose de chalone 1 injectée à des embryons au stade 34 est donnée dans la figure 2. Cette courbe montre que l'inhibition, qui est de 73,1% après injection de la source de chalone 1 non diluée, décroît linéairement en fonction de la dose injectée jusqu'à la dilution 60 x pour laquelle elle atteint 47,1%. Les inhibitions observées après injection des dilutions 60 x (47,1%), 100 x (45,1%) et 300 x (43,3%) ne diffèrent pas significativement ; par contre l'inhibition diminue à nouveau après injection de la dilution 600 x (15,2%) et disparaît avec la dilution 1 000 x. Ces résultats montrent que l'effet de la chalone 1 présente, en fonction de la dose décroissante injectée, deux phases de diminution séparées par un plateau établi aux environs de 50%. La population

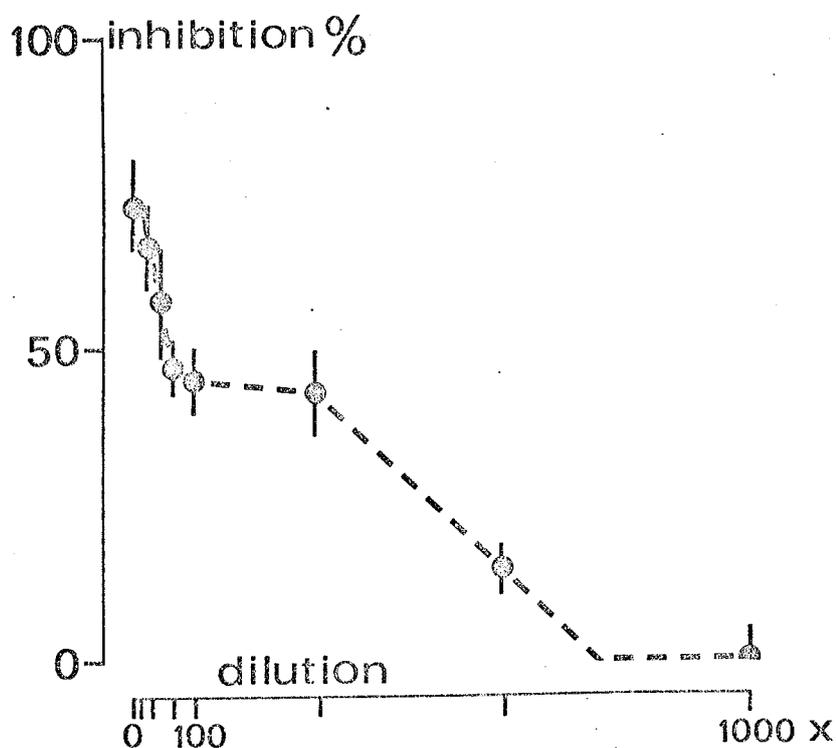


Figure 2 - Variations de l'inhibition de l'activité mitotique dans l'épithélium intestinal en fonction de la dilution de chalone 1 injectée à des embryons de pleurodèle au stade 34. Les intervalles de confiance ($2\sigma/\sqrt{n}$) sont donnés graphiquement.

cellulaire intestinale embryonnaire en activité mitotique est donc hétérogène à l'égard de l'activité inhibitrice de la chalone 1 : elle comporte, pour moitié environ, des cellules capables d'être inhibées par les dilutions 300 x à 1 000 x et toutes inhibées par les dilutions inférieures à 300 x ; les autres cellules intestinales en activité mitotique, ou au moins une partie d'entre elles, sont moins sensibles à la chalone 1 et ne sont inhibées que pour des dilutions inférieures ou égales à 60 x. Les résultats obtenus ne permettent pas de savoir si l'inhibition de 73,1% observée après injection de la source de chalone 1 non diluée représente l'effet inhibiteur maximum qu'il est possible d'obtenir.

EFFETS DES CHALONES EN FONCTION DU STADE DE DÉVELOPPEMENT

Les indices mitotiques observés dans l'endoderme à divers intervalles de temps après l'injection de chalone 1 aux stades 20, 26, 30, 33 et 34, sont portés dans le tableau I. Ce tableau révèle qu'aucune différence significative n'apparaît entre les indices mitotiques observés chez les embryons traités aux stades 20, 26 et 30 et les indices correspondants chez les embryons témoins. Sachant que les temps de génération des cellules endodermiques sont respectivement de 17 h, 20 h et 26 h à ces stades (BRUGAL, non publié), il est évident qu'aucune inhibition de l'activité mitotique endodermique n'est provoquée par la chalone 1. Par contre, au stade 33, l'indice mitotique dans l'endoderme des embryons traités par la chalone 1 est significativement inférieur à celui des témoins correspondants 25 h, 30 h et 35 h après l'injection : les inhibitions observées sont alors respectivement de 33%, 43% et 24%. Au stade 34, plus encore qu'au stade 33, la chalone 1 inhibe l'activité mitotique dans l'endoderme, ce qui confirme les résultats obtenus antérieurement (BRUGAL, 1973 ; BRUGAL et PELMONT, 1975). Les inhibitions observées 25 h, 30 h et 35 h après le traitement sont respectivement de 35%, 72% et 47%. Le temps de génération des cellules endodermiques étant de 28 h au stade 33 (BRUGAL, non publié) et 29 h au stade 34 (BRUGAL et PELMONT, 1975), l'inhibition la plus forte observée 30 h après l'injection de chalone 1 correspond dans ces deux cas au blocage en phase G_1 des cellules

Tableau I - Indices mitotiques observés dans l'endoderme d'embryons de pleurodèle, à divers intervalles de temps après une injection de chalone 1 à différents stades du développement. Les indices mitotiques correspondants chez les embryons témoins ayant reçu une injection de solvant seul (solution HOP) sont indiqués entre parenthèses. Le signe * affecte les indices mitotiques des embryons traités qui sont significativement différents ($p < 0,01$) de ceux des témoins.

Stades	Temps (heures) après l'injection									
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	
20	40(45)	(40)	41(47)	40(41)	38(45)	39(45)	43(47)	45(42)	41(37)	
26	41(38)	37(35)	38(34)	35(34)	34(37)	30(36)	33(37)	35(32)	(35)	
30	29(27)	28(31)	27(26)	24	23(23)	24(26)	24(24)	22(27)	23(22)	
33	34(35)	28(31)	26(28)	21(20)	22(25)	*18(27)	*16(28)	*19(25)	27(31)	
34	30(28)	31(29)	28	27(25)	20(21)	*15(20)	*5(18)	*8(15)	11(16)	

Tableau II - Indices mitotiques observés dans l'endoderme d'embryons de pleurodèle, à divers intervalles de temps après injection de chalone 2 à différents stades du développement. Les indices mitotiques correspondants chez les embryons témoins ayant reçu une injection de solvant seul (solution HOP) sont indiqués entre parenthèses. Le signe * affecte les indices mitotiques des embryons traités qui sont significativement différents ($p < 0,01$) de ceux des témoins.

Temps (heures) après l'injection

	0	2	4	6	8	10	12	14	16
20	41(45)	42(48)	38(-)	41(42)	40(44)	43(47)	- (45)	37(40)	42(41)
26	35(38)	37(37)	38(35)	33(-)	29(31)	- (28)	31(30)	- (30)	28(30)
30	24(27)	26(28)	27(27)	22(23)	25(-)	23(26)	25(24)	27(23)	-
33	35(35)	32(36)	30(34)	28(33)	27(30)	25(-)	28(27)	27(25)	21(24)
34	27(28)	24(28)	*10(27)	*13(28)	*11(26)	*11(25)	*11(25)	*19(24)	18(22)

Stades

en activité mitotique ; cependant, pour une même dose injectée, l'inhibition est plus forte au stade 34 (72%) qu'au stade 33 (43%).

Les indices mitotiques observés dans l'endoderme à divers intervalles de temps après l'injection de chalone 2, aux stades 20, 26, 30, 33 et 34, sont donnés dans le tableau II. Ce tableau révèle qu'aucune différence significative n'apparaît entre les indices mitotiques dans l'endoderme des embryons traités par la chalone 2 et les indices correspondants dans les embryons témoins aux stades 20, 26, 30 et 33. Par contre, une forte diminution de l'indice mitotique est observée, au stade 34, entre 4 h et 14 h après l'injection de chalone 2. Cette inhibition confirme les résultats obtenus antérieurement (BRUGAL et PELMONT, 1975) et traduit un blocage des cellules intestinales en phase G_2 de leur cycle mitotique.

EFFETS D'UN TRAITEMENT PROLONGÉ SUR LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

Les courbes de variations de l'indice mitotique intestinal chez les embryons témoins et les embryons traités par la chalone 2 entre les stades 34 et 37, sont donnés dans la figure 3. Chez les embryons témoins une forte diminution de l'indice mitotique, déjà décrite (BRUGAL, 1973), s'observe dans l'intestin au cours de la période de différenciation structurale et fonctionnelle de cet organe. Chez les embryons traités par la chalone 2, l'indice mitotique décroît rapidement pendant 5 h après le début du traitement et conserve une valeur minimale au cours des 8 heures suivantes. Après 13 h de traitement, l'indice mitotique augmente malgré la répétition des injections de chalone 2 et atteint, après 24 h de traitement, une valeur voisine de celle qu'il avait au début de l'expérience. Entre 24 h et 93 h de traitement, l'indice mitotique intestinal dans les embryons traités par l'inhibiteur est paradoxalement plus élevé que l'indice correspondant dans les embryons témoins. Pendant cet intervalle de temps, l'indice mitotique intestinal dans les embryons traités décroît parallèlement à celui des embryons témoins mais avec un retard de 20 h environ. Un tel résultat peut s'expliquer en admettant que, pendant toute la durée du traitement, les cellules inhibées en phase G_2 de leur cycle ne sont que retardées dans

cette phase pendant 20 h environ. Malgré la répétition des injections de chalone 2, aucune inhibition supérieure à celle de 75% observée après 5 h de traitement n'est obtenue pendant la durée de l'expérience. Ce résultat confirme la conclusion tirée de l'étude des relations entre la dose de chalone 2 et l'effet inhibiteur et selon laquelle le quart environ des cellules intestinales en activité mitotique est réfractaire à l'activité inhibitrice de la chalone 2.

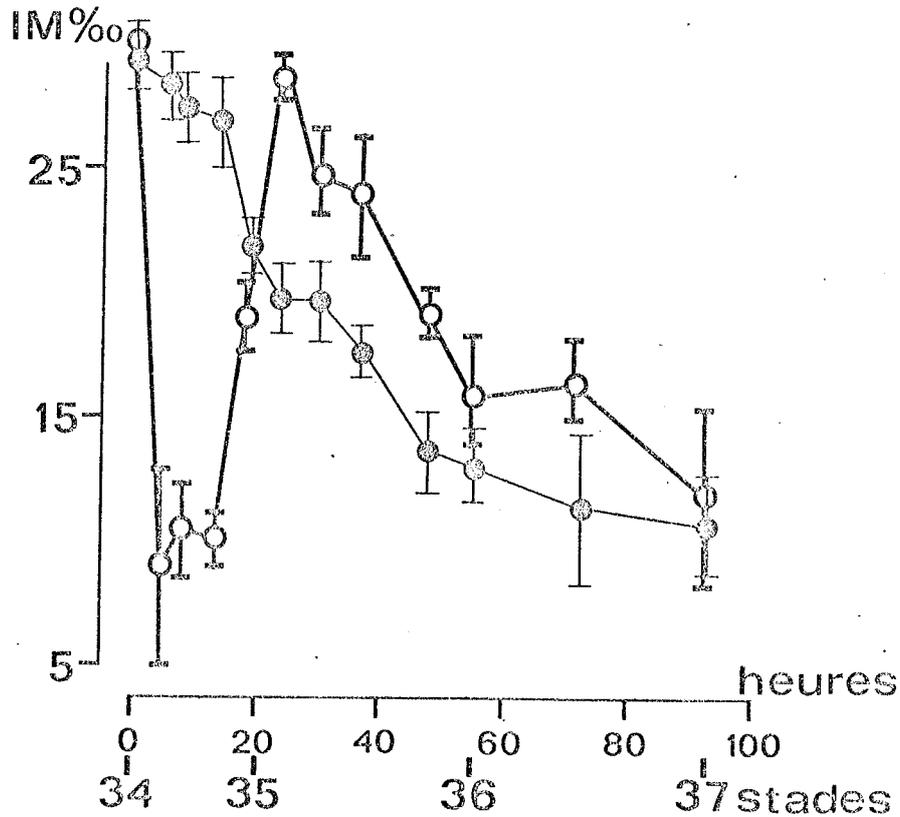


Figure 3 - Variations de l'indice mitotique (IM) de l'épithélium intestinal chez des pleurodèles ayant reçu, entre les stades 34 et 37, des injections répétées de chalone 2 (—○—) ou de solvant seul (témoins —●—). Les intervalles de confiance ($2\sigma/\sqrt{n}$) sont donnés graphiquement.

Les courbes de variations de l'indice mitotique intestinal chez les embryons témoins et les embryons ayant reçu des injections répétées de chalone 1 entre les stades 34 et 37 sont portées dans la figure 4. Chez les embryons traités par la chalone 1, l'indice mitotique décroît plus fortement que chez les témoins entre 20 h et 30 h après le début de l'expérience. Après 36 h

de traitement, l'indice mitotique intestinal croît chez les embryons traités pour atteindre la valeur de celui des témoins après 48 h de traitement ; les indices mitotiques chez les témoins et chez les embryons traités ne sont alors plus significativement différents jusqu'à la fin de l'expérience. Ainsi, malgré la répétition des injections de chalone 1, l'indice mitotique intestinal chez les embryons traités ne s'annule pas au cours de l'expérience car l'inhibition la plus forte n'atteint que 72% après 30 h de traitement. Il semble donc que, comme dans le cas de la chalone 2, un quart environ des cellules intestinales en activité mitotique au stade 34 est réfractaire à l'action inhibitrice exercée par la chalone 1. L'augmentation de l'indice mitotique après 36 h de traitement démontre que certaines cellules initialement inhibées par la chalone 1 se divisent malgré la poursuite du traitement. Etant donné que l'inhibition de l'activité mitotique se manifeste après 24 h de traitement et qu'elle est suivie d'une augmentation de l'indice mitotique qui devient significative entre 36 h et 48 h après le début de l'expérience, la division des cellules initialement inhibées par la chalone 1 est différée d'une vingtaine d'heures environ. Ces mitoses différées correspondent à la division d'une partie seulement des cellules initialement inhibées puisque, en dépit de l'augmentation qu'il manifeste entre 36 h et 48 h de traitement, l'indice mitotique intestinal ne dépasse jamais chez les embryons traités les valeurs correspondantes des embryons témoins. Une partie des cellules initialement inhibées par la chalone 1 reste donc bloquée dans le cycle mitotique pendant au moins la durée de l'expérience. L'indice mitotique observé après 48 h de traitement tient compte des mitoses des cellules réfractaires à la chalone 1 et des mitoses des cellules retardées dans leur cycle mitotique par l'inhibiteur. Cet indice atteint après 48 h de traitement une valeur moyenne de 11°/°° ; or, si toutes les cellules initialement inhibées se divisaient avec retard, l'indice mitotique devrait atteindre la valeur de 20°/°° qui est celle observée chez le témoin au moment où l'inhibition la plus forte se manifeste chez les embryons traités. Ainsi, l'indice mitotique de 11°/°° observé après 48 heures de traitement ne représente que la division de la moitié environ

des cellules engagées dans un cycle mitotique au début de l'expérience, soit : 25% environ de cellules réfractaires à la chalone 1 et 25% environ de cellules dont le déroulement du cycle mitotique n'a été que retardé par la chalone 1. L'autre moitié des cellules engagées dans un cycle mitotique au début de l'expérience ne passe pas en mitose au cours des 93 h de traitement.

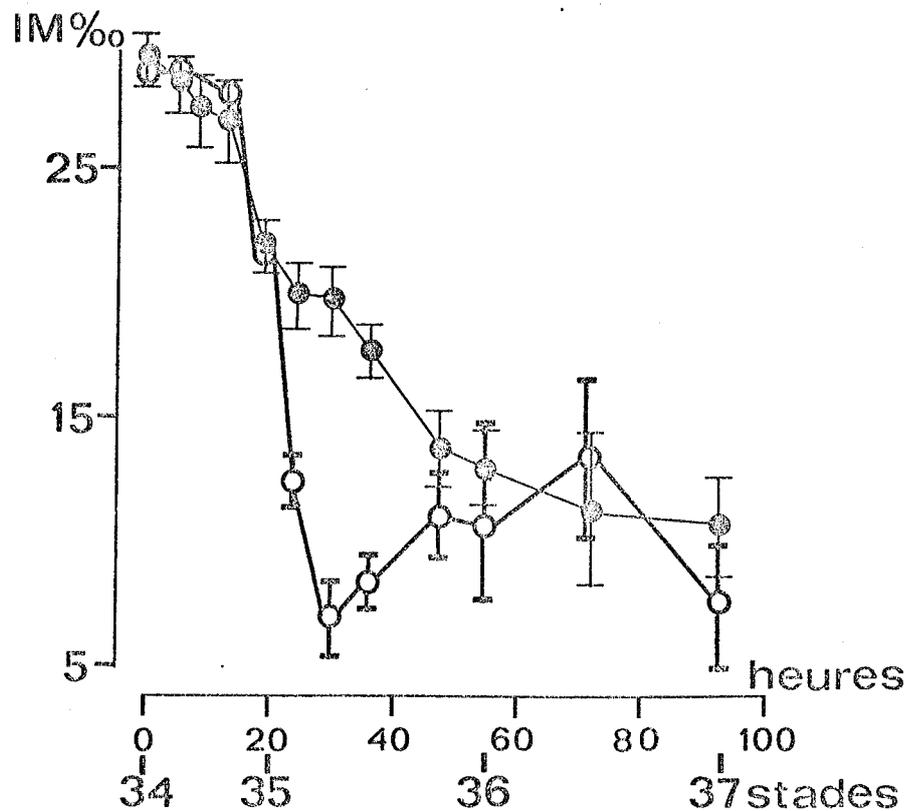


Figure 4 - Variations de l'indice mitotique (IM) de l'épithélium intestinal chez des pleurodèles ayant reçu, entre les stades 34 et 37, des injections répétées de chalone 1 (—○—) ou de solvant seul (témoins —●—). Les intervalles de confiance ($2\sigma/\sqrt{n}$) sont donnés graphiquement.

EFFETS D'UN TRAITEMENT PROLONGÉ SUR LA DIFFÉRENCIATION INTESTINALE

Trois critères de la différenciation structurale et fonctionnelle de l'intestin embryonnaire et larvaire, faciles à observer et à quantifier, ont été retenus ; ce sont : la proportion de cellules pourvues de réserves vitellines, la proportion de cellules à mucus et la proportion de cellules génératrices

constituant les nids sous-épithéliaux. Les valeurs de ces paramètres aux stades 34, 35, 36 et 37 chez les embryons ayant reçu des injections répétées de chalone 1 ou de chalone 2 et chez les embryons témoins, sont consignées dans le tableau III.

Les valeurs obtenues montrent que les paramètres de la différenciation chez les embryons témoins et les embryons traités par la chalone 2 ne sont à aucun stade significativement différents. Ainsi, le fait de différer de 20 h environ le déroulement normal de la prolifération cellulaire dans l'intestin embryonnaire et larvaire ne perturbe pas de façon décelable la différenciation de cet organe. Les animaux traités, comme les animaux témoins, ont d'ailleurs commencé à se nourrir normalement à partir du stade 37.

Chez les animaux ayant reçu des injections répétées de chalone 1, la consommation du vitellus commence plus tôt que chez les témoins ; en effet, dès le stade 35 (tableau III), certaines cellules (14%) ont déjà épuisé leurs réserves vitellines chez les embryons traités alors que chez les témoins toutes en sont encore dotées. Au stade 37, toutes les réserves ont été consommées chez les embryons traités par la chalone 1, alors que 16% des cellules intestinales des témoins sont encore pourvues de plaquettes vitellines. Le traitement par la chalone 1 a donc pour effet de rendre plus précoce la consommation de vitellus.

La différenciation des cellules à mucus est, elle aussi, perturbée par les injections répétées de chalone 1. Au stade 36, ces cellules apparaissent en proportion 2 fois plus élevée chez les animaux traités (42%) que chez les animaux témoins (20%) ; cependant, au stade 37, ce rapport est inversé puisque les cellules à mucus représentent alors une fraction de 110% de la population intestinale chez les témoins et 53% chez les animaux traités.

Enfin, le tableau III montre que le traitement par la chalone 1 diminue significativement le nombre de cellules génératrices constituant les nids sous-épithéliaux chez les embryons traités par rapport aux témoins : au stade 36, le compartiment générateur s'individualise avec, en moyenne, 21,1 cellules

sous-épithéliales au niveau d'une coupe transversale de l'intestin chez les embryons traités au lieu de 38,3 chez les témoins. Cette différence est plus petite au stade 37.

Les résultats obtenus montrent que, dès le stade 36, la proportion de cellules ayant épuisé leurs réserves vitellines et la proportion de cellules à mucus sont plus élevées chez les embryons traités par la chalone 1 que chez les témoins ; inversement, la proportion et le nombre de cellules génératrices sous-épithéliales est plus faible chez les animaux traités que chez les témoins. La chalone 1 a donc pour effet, outre celui de diminuer l'activité mitotique, de favoriser les processus de différenciation histologique de l'intestin embryonnaire. Il est donc très probable que les cellules qui sont inhibées en phase G_1 par la chalone 1 et ne se divisent plus pendant la durée de l'expérience ne migrent pas dans les nids sous-épithéliaux qui apparaissent au stade 36 et se différencient.

Tableau III - Paramètres de la différenciation de l'intestin embryonnaire et larvaire de pleurodèle après des injections de chalone 1 (CH 1), de chalone 2 (CH 2) ou de solvant seul (témoins) (T) répétées toutes les 4 h à partir du stade 34. V : proportion de cellules pour vues de plaquettes vitellines ; M : proportion de cellules à mucus ; les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre moyen de cellules à mucus par coupe transversale ; G : proportion de cellules génératrices constituant les nids sous-épithéliaux ; les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre moyen de cellules sous-épithéliales par coupe transversale ; N : nombre total moyen de cellules par coupe transversale. Le signe * affecte les paramètres significativement différents ($p < 0,01$) de ceux des témoins.

Stades :	34			35			36			37		
	CH1	CH2	T	CH1	CH2	T	CH1	CH2	T	CH1	CH2	T
V%	100	100	100	*86	100	100	*61	77	73	*0	18	16
M°/oo	0	0	0	0	0	0	*42 *(4,9)	18 (2,3)	20 (2,6)	*53 *(7,3)	96 (16,5)	110 (18,5)
G%	0	0	0	0	0	0	*19 *(21,1)	32 (41,0)	29 (38,3)	18 *(24,7)	19 (32,7)	19 (32)
N	75±8	76±11	71±9	87±8	93±8	90±10	111±10	128±16	132±12	*137±12	172±10	168±11

INTERPRETATION ET DISCUSSION

L'étude de la prolifération cellulaire intestinale, dans les conditions normales de développement embryonnaire entre les stades 34 et 37, révèle que chaque mitose donne statistiquement naissance à une cellule qui cesse de se diviser et se différencie et à une cellule qui parcourt un cycle mitotique complet au terme duquel elle se divise à nouveau (BRUGAL, 1977 même volume). Une telle situation peut être représentée par divers modèles de cinétique cellulaire dont trois sont donnés dans la figure 5. L'effet des chalcones sur la prolifération cellulaire et la différenciation de l'intestin embryonnaire montre que tous les cycles cellulaires qui se déroulent dans cet organe entre les stades 34 et 37 ne sont pas équivalents ; en effet, le quart d'entre eux environ ne peut être inhibé ni par les plus fortes concentrations de chalcones 1 et 2 utilisées ni par des injections répétées de ces substances : ces cycles cellulaires réfractaires pourraient donc s'identifier aux cycles de type G de la figure 5c. Les résultats obtenus montrent en outre que la moitié environ des cellules en activité mitotique au stade 34 est bloquée par des doses faibles de chalone 1 (dilution 300 x et 600 x) ; c'est la même proportion de ces cellules qui, après des injections répétées de chalone 1, ne se divisent plus pendant la durée de l'expérience et se différencient probablement. La moitié des cycles cellulaires qui se déroulent au stade 34 semble donc concerner des cellules prêtes à cesser de se diviser ; ces cycles pourraient s'identifier aux cycles de type T de la figure 5c. Enfin, un quart environ des cellules en activité mitotique au stade 34 n'est que retardé dans le déroulement du cycle mitotique après des injections répétées de chalone 1 ; or, c'est la même proportion de ces cellules qui n'est inhibée que par de fortes concentrations de chalone 1 (dilutions 0 à 60 x). Le quart des cycles mitotiques qui se déroulent au stade 34 semble donc concerner des cellules déjà engagées dans la voie de la différenciation mais pas encore aptes, cependant, à cesser définitivement de se diviser (committed stem cells de BERTSCH et MARKS, 1974) : ces cycles cellulaires pourraient s'identifier aux cycles P de la figure 5c. Le modèle

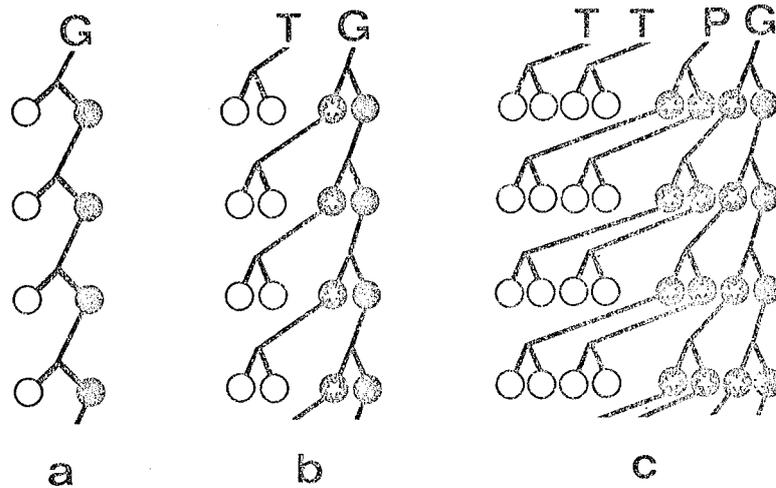


Figure 5 - Modèles de prolifération cellulaire dans lesquels il naît par mitose autant de cellules qui cessent de se diviser (○) que de cellules qui parcourent un nouveau cycle mitotique. Le modèle a fait apparaître un seul type de cycle cellulaire, ou cycle générateur (G) donnant naissance, à chaque génération, à une cellule souche (●) et à une cellule qui cesse de se diviser (○). Le modèle b fait apparaître : 50% de cycles générateurs (G) donnant naissance à une cellule souche (●) et à une cellule engagée dans la voie de la différenciation mais capable de se diviser une nouvelle fois (●) ; 50% de cycles terminaux (T) au terme desquels les deux cellules produites cessent de parcourir le cycle et achèvent leur différenciation (○). Le modèle c fait apparaître : 25% de cycles générateurs (G) donnant naissance à une cellule engagée dans la voie de la différenciation (●) et à une nouvelle cellule souche (●) . 25% de cycles prolifératifs (P) au terme desquels une cellule engagée dans la voie de la différenciation (●) donne naissance à deux cellules de même type ; 50% de cycles terminaux (T) produisant deux cellules qui cessent de se diviser et achèvent leur différenciation pour devenir fonctionnelles (○).

de la figure 5c semble donc le plus adéquat pour représenter la cinétique de la prolifération cellulaire intestinale entre les stades 34 et 37. Il montre que 3 cycles cellulaires se déroulent entre les cellules souches et les cellules qui cessent de se diviser et se différencient : le premier (cycle G) produit une nouvelle cellule souche et une cellule engagée dans la voie de la différenciation (committed stem cell) ; le second (cycle P) produit à partir de cette dernière deux cellules en voie de différenciation qui se divisent à leur tour (cycle T) pour donner naissance à 4 cellules qui quittent le cycle mitotique pendant leur phase G₁ et se différencient. La succession de ces 3 cycles n'est pas obligatoire comme le montre la différenciation des cellules à mucus à la suite d'injections répétées de chalone 1 : ce traitement provoque en effet la différenciation de 2 fois plus de cellules à mucus au stade 36 chez les embryons traités que chez les témoins alors que l'inverse est constaté au stade 37 (tableau III). Ce résultat montre clairement que les cellules en activité mitotique qui, au stade 36, sont engagées dans la voie de différenciation pour devenir des cellules à mucus au stade 37 peuvent se différencier plus tôt lorsque leur prolifération est inhibée. La différenciation précoce de certaines cellules à mucus au stade 36 a pour conséquence un déficit dans le nombre de ces cellules au stade 37 puisque celles-ci n'ont pas parcouru le cycle mitotique qui, dans les conditions normales, sépare les stades 36 et 37. Ce cycle n'a donc qu'un caractère prolifératif ayant pour seul rôle d'augmenter le nombre des cellules : il s'identifie ainsi aux "proliferative cell cycles" décrits par HOLTZER et al (1972). Le fait que les injections répétées de chalone 1, pratiquées dès le stade 34, ne provoquent pas l'apparition de cellules à mucus avant le stade 36 auquel elles apparaissent dans les conditions normales, montre que les cycles mitotiques qui se déroulent dans la lignée des cellules à mucus avant ce stade ont un caractère obligatoire ; ils pourraient s'identifier aux "quantal cell cycles" décrits par HOLTZER et al (1972) au cours desquels s'effectuent les modifications nucléaires nécessaires à l'expression des gènes spécifiques du type de différenciation fonctionnelle de la cellule.

L'action inhibitrice de la chalone 2 ne permet de mettre

en évidence que 2 catégories de cycles cellulaires : ceux qui sont réfractaires à l'inhibiteur et pourraient s'identifier aux cycles G (figure 5c) et ceux dont la mitose est différée par allongement de la phase G_2 . le fait qu'aucune cellule en activité mitotique ne peut être définitivement inhibée entre les stades 34 et 37 même après des injections répétées de chalone 2, est certainement à mettre en relation avec l'absence de sous-population arrêtée en phase G_2 dans l'intestin embryonnaire comme l'ont révélé les études cytophotométriques de ce tissu (BRUGAL et PELMONT, 1975). Il n'est cependant pas exclu que, dans l'intestin fonctionnel soumis à un renouvellement rapide chez l'adulte, un certain nombre de cellules génératrices soit bloqué en phase G_2 pour un temps indéfini. Une telle situation a d'ailleurs été décrite dans divers tissus et en particulier dans l'intestin de souris (PEDERSON et GELFANT, 1970) : les cellules arrêtées en phase G_2 conservent la capacité de se diviser qu'elles manifestent à la suite d'un stimulus approprié. En maintenant une sous-population de cellules arrêtées en phase G_2 , la chalone 2 pourrait être impliquée dans la régulation de la prolifération de l'intestin du pleurodèle adulte mais elle n'est certainement pas responsable des arrêts de division précédant la différenciation de l'intestin embryonnaire.

Les résultats obtenus montrent que la sensibilité des cellules endodermiques aux chalones intestinales n'apparaît qu'à la fin du développement embryonnaire, aux stades 33 pour la chalone 1 et 34 pour la chalone 2. La sensibilité des cellules endodermiques aux chalones extraites de l'intestin adulte apparaît donc comme la manifestation d'un certain état de différenciation. Le fait que la sensibilité aux chalones n'apparaisse pas avant le stade 33 est certainement à mettre en relation avec le fait que le coefficient de prolifération dans l'endoderme de l'embryon de pleurodèle est de 100% aux stades 20, 26 et 30 puis diminue à la fin du développement pour atteindre 83% au stade 33 (BRUGAL, non publié) et 50% au stade 34 (BRUGAL, 1973). La sensibilité à la chalone 1 se manifeste donc au moment précis où apparaissent dans l'endoderme les premières cellules qui cessent de se diviser pour passer dans une phase G_0 interprétée comme une phase G_1 indéfiniment prolongée (BRUGAL, 1971).

La question se pose donc de savoir quels sont les facteurs responsables des arrêts de division qui précèdent la différenciation des cellules intestinales à la fin du développement embryonnaire ? L'étude de l'influence de la température sur la prolifération cellulaire et la vitesse du développement de l'embryon de pleurodèle a montré que chaque stade de développement, et par conséquent chaque stade de différenciation, est atteint après un nombre défini de divisions cellulaires particulier à chaque tissu (BRUGAL, 1971). Cette conception est en accord avec des observations analogues (DETTLAFF, 1964 ; ROTT et SHEVELEVA, 1968) et divers résultats expérimentaux (SLADECEK et al, 1969) selon lesquels l'apparition des fonctions nucléaires spécifiques n'a lieu qu'après un nombre défini de divisions cellulaires. Ainsi, la différenciation d'une cellule serait conditionnée par son histoire mitotique et interviendrait au moment où sont atteints certains degrés de ségrégation et de dilution des répresseurs cytoplasmiques de son génôme. Ces facteurs cellulaires intrinsèques ne sont certainement pas les seuls à déterminer le déclenchement de la différenciation fonctionnelle d'une cellule. La différenciation anticipée de cellules à mucus provoquée par des injections répétées de chalone montre que certains cycles cellulaires ne sont pas obligatoires, du moins à partir d'un certain stade de développement c'est-à-dire après un certain nombre de divisions. Il est donc raisonnable de penser que des facteurs extrinsèques d'origine tissulaire, tels que les chalones, pourraient collaborer avec les facteurs cellulaires intrinsèques (maturité de la cellule dépendant de son histoire mitotique) pour déterminer l'arrêt de division et le déclenchement de la différenciation fonctionnelle d'une cellule. Ainsi, l'arrêt de division d'une cellule endodermique et sa transformation en cellule absorbante ou en cellule à mucus, selon la lignée à laquelle elle appartient, n'interviendrait qu'à condition que cette cellule ait parcouru un nombre suffisant de cycles mitotiques lui conférant la compétence à se différencier, et à condition également qu'elle soit en présence d'une concentration suffisante en chalone 1. La mise en évidence de chalone 1 dans l'intestin embryonnaire confirmerait cette hypothèse mais n'a pas pu être tentée en raison de la très petite taille de cet

organe, qui est un obstacle à la préparation de quantités suffisantes d'extraits. Des preuves expérimentales de la présence de chalone dans les tissus embryonnaires ont cependant été apportées par CHOPRA et SIMNETT (1970) pour la chalone rénale de Xenopus laevis et par BERTSH et MARKS (1974) pour la chalone épidermique de souris.

CONCLUSIONS

L'étude des paramètres de la prolifération cellulaire dans l'épithélium intestinal à la fin du développement embryonnaire du pleurodèle (BRUGAL, 1977, même volume) et l'observation des perturbations de la cinétique cellulaire par les chalone, permettent de comprendre les relations entre la prolifération et la différenciation cellulaire dans ce tissu. La figure 6 schématise les principales conclusions retenues : le compartiment générateur produit à chaque instant autant de cellules qui cessent de se diviser et achèvent leur différenciation que de cellules qui parcourent un cycle mitotique et se divisent à nouveau ; ce processus laisse persister dans l'épithélium intestinal une proportion décroissante de cellules en activité mitotique. La décroissance du coefficient de prolifération (P), imposée par le modèle de la figure 6, conduit à des valeurs de ce paramètre très voisines de celles qui ont été déterminées expérimentalement (BRUGAL, 1976 même volume). En outre, 3 catégories de cycles cellulaires peuvent être définies selon leur sensibilité à la chalone 1 : les cycles réfractaires (G), les cycles dont la phase G_1 ne peut être que temporairement allongée (P) et les cycles dont la phase G_1 peut être indéfiniment prolongée (T) ce qui conduit à la perte d'activité mitotique.

Les résultats obtenus conduisent à l'hypothèse selon laquelle : (1) la chalone 1 serait présente avant le stade 33 dans l'épithélium intestinal où elle serait sécrétée par les cellules endodermiques engagées dans la voie de la différenciation ; (2) l'aptitude des cellules de l'épithélium intestinal à être

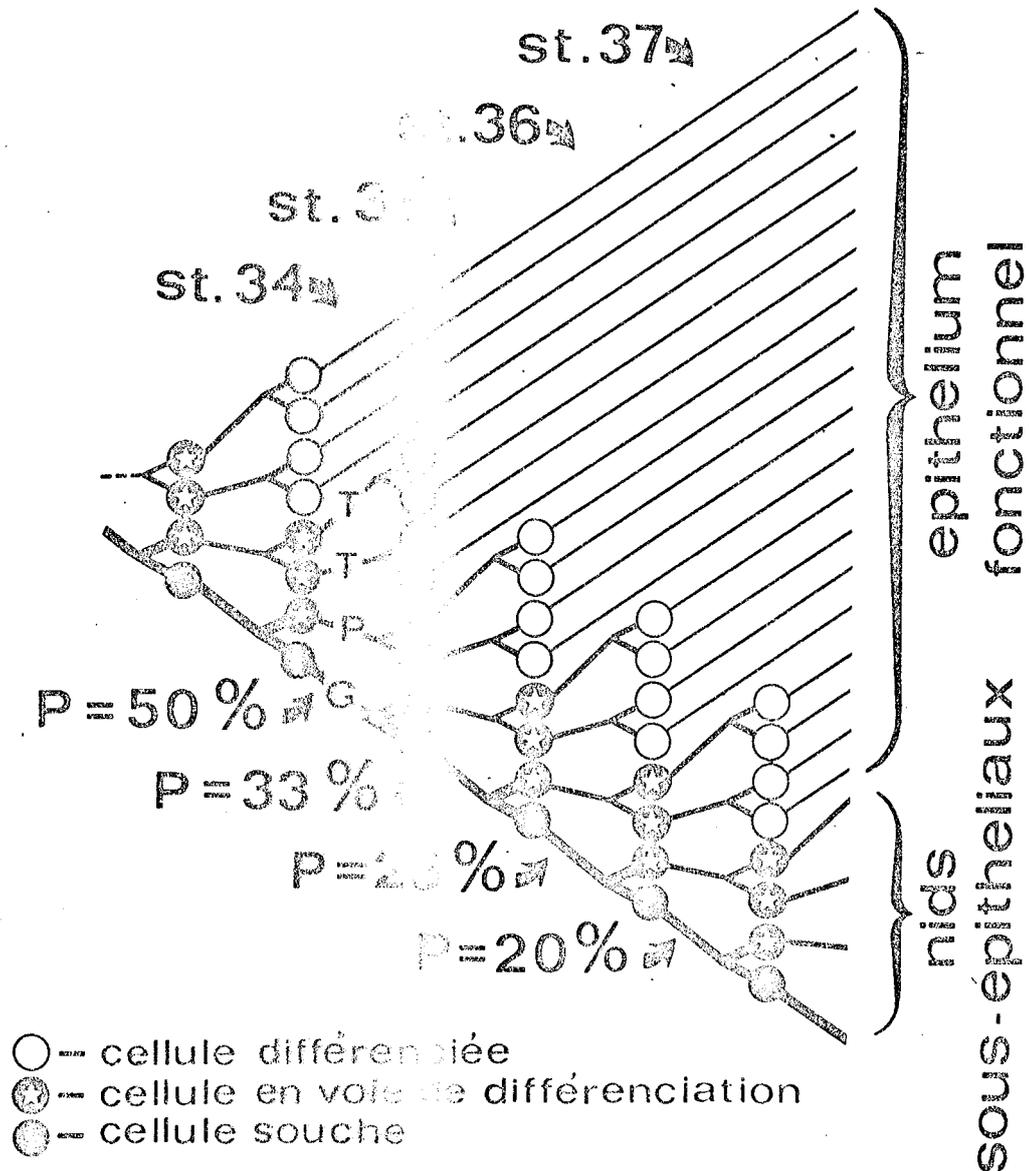


Figure 6 - Schéma des relations entre la différenciation et la prolifération cellulaires dans l'épithélium intestinal du pleurorodèle entre les stades 34 et 37, établi selon le modèle de la figure 5c. La décroissance du coefficient de prolifération (P), imposée par ce modèle, conduit à des valeurs de P très comparables à chaque stade, aux valeurs expérimentales préalablement déterminé (BRUGAL, 1976 même volume).

inhibées en phase G_1 par la chalone 1 ne serait acquise qu'après un nombre défini de divisions cellulaires ; cette aptitude se manifesterait tout d'abord par un allongement temporaire de la phase G_1 en présence de chalone 1 puis par un blocage rendu définitif par l'achèvement de la différenciation cellulaire ; (3) un taux suffisant de chalone dans l'épithélium et un nombre suffisant de cycles mitotiques seraient donc les 2 conditions nécessaires pour qu'une cellule intestinale cesse de se diviser et achève sa différenciation afin de devenir fonctionnelle.

En raison de l'impossibilité de bloquer définitivement en phase G_2 les cellules de l'épithélium intestinal embryonnaire par la chalone 2, cette substance ne semble pas jouer de rôle essentiel dans la régulation de la prolifération cellulaire pendant la période de différenciation de l'intestin ; par contre, il n'est pas exclu que ce facteur joue un rôle important dans la régulation du renouvellement de l'épithélium intestinal à partir du moment où la larve se nourrit.

- Bertsch, S., Marks, F. : Lack of an effect of tumor-promoting phorbol esters and of epidermal G₁ chalone on DNA synthesis in the epidermis of newborn mice. *Cancer Res.* 34, 3283-3288 (1974).
- Brugal, G. : Etude autoradiographique de l'influence de la température sur la prolifération cellulaire chez les embryons âgés de Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibien, Urodèle). *Wilhelm Roux'Archiv.* 168, 205-225 (1971).
- Brugal, G. : Effects of adult intestine and liver extracts on the mitotic activity of corresponding embryonic tissues of Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibia, Urodela). *Cell Tissue Kinet.* 6, 519-524 (1973).
- Brugal, G. : Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires dans l'intestin embryonnaire et larvaire de Pleurodeles waltlii Michah. I - Développement normal. *Wilhelm Roux'Archiv.* même volume (1976)
- Brugal, G., Pelmont, J. : Présence, dans l'intestin du Triton adulte Pleurodeles waltlii Michah., de deux facteurs antimitotiques naturels (chalones) actifs sur la prolifération cellulaire de l'intestin embryonnaire. *C.R. Acad. Sci. (Paris) D*, 278, 2831-2834 (1974).
- Brugal, G., Pelmont, J. : Existence of two chalone-like substances in intestinal extract from the adult newt, inhibiting embryonic intestinal cell proliferation. *Cell Tissue Kinet.* 8, 171-187 (1975).
- Bullough, W.S. : Mitotic and functional Homeostasis : a speculative review. *Cancer Res.* 25, 1683-1727 (1965).
- Bullough, W.S. : Mitotic control in adult Mammalian tissues. *Biol. Rev.* 50, 99-127 (1975).
- Chopra, D.P., Simnett, J.D. : Stimulation of mitosis in Amphibian kidney by organ specific antiserum. *Nature (London)* 225, 657-658 (1970).

- Dettlaff, T.A. : Cell division, duration of interkinetic states and differentiation in early stages of embryonic development. In : Advances in Morphogenesis (Abercrombie, M., et Brachet, J., eds.), vol. 3, p. 323-362. New York-London : Academic Press 1964.
- Gallien, L., Durocher, M. : Table chronologique du développement de Pleurodeles waltlii. Bull. Biol. Fr. et Belg. 91, 97-114 (1957).
- Holtzer, H., Weintraub, H., Mayne, R., Mochan, B. : The cell cycle, cell lineages and cell differentiation. In : Current Topics in Developmental Biology, vol. 7, p. 229-256. New York and London : Academic Press 1972.
- Lozzio, B.B., Lozzio, C.B., Bamberger, E.G., Lair, S.V. : Regulators of cell division : endogenous mitotic inhibitors of Mammalian cells. Intern. Rev. Cytol. 42, 1-47 (1975).
- Pardee, A.B. : A restriction point control of normal animal cell proliferation. Proc. nat. Acad. Sci. USA, 71, 1286-1290 (1974).
- Pederson, T., Gelfant, S. : G₂-population cells in mouse kidney and duodenum and their behavior during the cell division cycle. Exp. Cell Res. 59, 32-36 (1970).
- Rott, N.N., Sheveleva, G.A. : Changes in the rate of cell divisions in the course of early development of diploid haploid loach embryos. J. Embryol. exp. Morphol. 20, 141-150 (1968).
- Sladeczek, F., Melichna, J., Valouch, P. : The number of cell generations in relation to the interspecific differences in primary embryonic induction in Amphibians. Folia Biologica 16, 66-70 (1969).
- Stoker, M.G.P. : Signal and switches : a summary. In : Control of proliferation in animal cells. (Clarkson, B., et Baserga, R., eds.), Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation 1, 1009-1013 Cold Spring Harbor Laboratory (1974).
- Vonderhaar, B.K., Topper, Y.J. : A role of the cell cycle in hormone-dependent differentiation. J. Cell Biol. 63, 707-712 (1974).
- Weiss, P., Kavanau, J.L. : A model of growth and growth control in mathematical terms. J. gen. Physiol. 41, 1-47 (1957).

Presence of Intestinal Chalone

G. BRUGAL^{1,2,3}

*Laboratoire de Zoologie, Université Scientifique
et Médicale de Grenoble, France*

The concept of autoregulation in cell proliferation homeostasis by means of a chalone mechanism has been successfully applied to several tissues (for review articles, see Nat. Cancer Inst. Monogr., 38, '73). Nevertheless, there is a lack of experimental data with which to elucidate the control mechanisms of intestinal epithelium cell proliferation although a considerable amount of information has been obtained concerning the cell kinetics of this tissue (Leblond and Messier, '58; Lipkin, '73).

Partial resection of the rat intestine induces a depletion of the intestinal epithelium and an increase in the mitotic activity in the remaining intestine which were both ascribed to a humoral stimulating proliferation factor (Loran et al., '64). However, this hypothesis has not been corroborated by other resection experiments, and X-irradiation of the rat intestine yielded evidence for a local inhibitory feedback control of the intestinal mitotic activity (Galjaard et al., '72; Meer-Fleggen, '73). Furthermore, possible chalone-like substances seemed to be involved in *in vivo* and *in vitro* inhibition of the intestinal proliferation in young chick embryos treated with duodenal extract from old chick

¹Mailing address: Laboratoire de Zoologie, Université Scientifique et Médicale, B.P. 53, 38041 Grenoble-Cedex, France.

²I am grateful to Professors P. Chibon, J. Pelmont and J.P. Bertrandias for their advice, support and encouragement.

³This work was supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (ATP N° A655 1799) and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (N° 74142036) of France.

embryos (Bischoff, '64). Moreover, convincing evidence for the occurrence of a tissue-specific G_2 inhibitor in the gastric mucosa of old chick embryos has been provided by Philpott ('71). We have shown more recently that crude intestinal extract from the adult newt *Pleurodeles waltlii* inhibited cell proliferation in the intestinal epithelium of the newt embryos. The inhibiting factor(s) was suspected to be tissue-specific as intestinal extract from adult did not prevent cell proliferation in embryonic liver or encephalon and since liver extract from adult did not inhibit cell proliferation in embryonic intestine (Brugal, '73). The present paper deals with a preliminary attempt to purify and characterize the intestinal factor(s) accounting for mitotic inhibition and to specify its biological effect on embryonic cell kinetics.

INTESTINAL CELL PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION IN PLEURODELES EMBRYOS

Functional differentiation of the intestinal epithelium of the pleurodele occurs during the last period of embryogenesis (stage 34) and completes during the first steps of larval development, before the onset of feeding (stage 37). In the course of this 4-day period the intestinal epithelium, which is a closed endodermal cylinder at stage 34, opens at stage 35 while goblet cells and columnar absorbing cells differentiate. At stage 36 the cell-nests appear beneath the epithelium and are assumed to be analogous to the intestinal crypts of higher vertebrates (Patten, '61).

Between stages 34 and 37, the intestinal mitotic index (MI) and the growth fraction (GF) decrease about three-fold while cell number (N) increases (Fig. 1). Since the product $GF \cdot N$ remains constant during this period, it is obvious that the number of cycling cells remains constant while the number of non-dividing cells is increasing. The cell cycle durations are: $T = 29$ hr, $G_1 = 2$ hr, $S = 24$ hr, $G_2 = 1$ hr and $M = 2$ hr at stages 34 and 35, and $T = 37$ hr, $G_1 = 8$ hr, $S = 25$ hr, $G_2 = 2$ hr and $M = 2$ hr at stage 36. Therefore, about 3 cell cycles take place between stages 34 and 37 and the increase in non-dividing cell number, after every cell cycle time interval, is equal to the number of proliferating cells. Since the cells prevented from dividing are arrested in G_1 phase, as shown by cytophotometry (Brugal and Pelmont, '75), it is likely that each mitosis gives rise to another cycling cell and a resting one which is blocked in G_0 phase and possibly differentiates (Brugal, '75).

PRESENCE OF INTESTINAL CHALONES

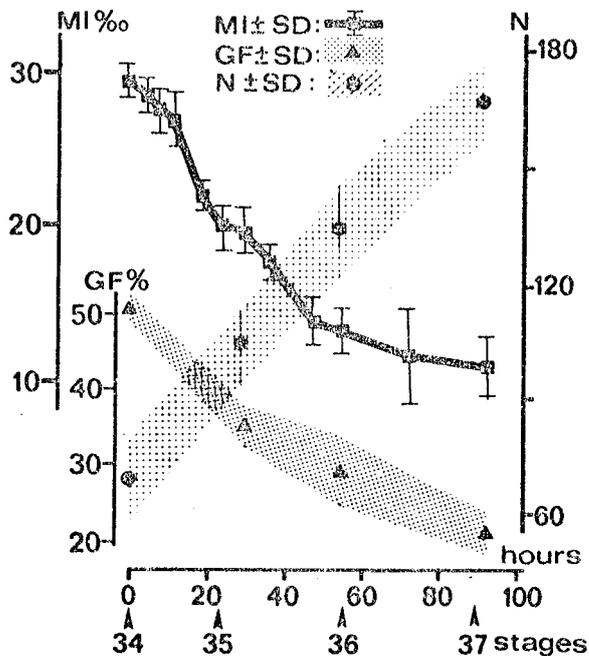


Fig. 1. Variations of the cell proliferation parameters in the intestine of newt embryos between stages 34 and 37. MI: mitotic index; GF: growth fraction; N: number of cells in a transverse section of embryonic intestine.

PRESENCE OF MITOTIC INHIBITORS IN INTESTINAL EXTRACT FROM THE ADULT NEWT

Owing to the decrease of cell proliferation in the differentiating intestinal epithelium of pleurodele embryos, the question has arisen whether such a depression of mitotic activity could also be mediated by a chalone mechanism similar to that involved in the steady state cell populations of adult animals. As reported above, preliminary experiments have shown that crude extract from fully differentiated intestinal epithelium of adult pleurodele caused a drastic mitotic inhibition of immature intestinal cells when injected in embryos at stage 34 (Brugal, '73). In further experiments, crude intestinal extracts were fractionated by G-200 Sephadex chromatography and the effects of the fractions on the intestinal cell proliferation were tested *in vivo* by both mitotic index and ^3H -thymidine incorporation methods. Figure 2 shows that among embryos sacrificed 5 hr after injection of fractions, those treated with fractions 36-38 exhibited a significant depression of the intestinal MI. On the contrary, among embryos sacrificed 26 hr after injections, only those treated with fractions 8-10 exhibited a significant depression of the intestinal MI. Furthermore, animals treated with fractions 36-38 exhibited a significantly higher intestinal MI attributed to the division of those cells that previously were inhibited by these same fractions. It was subsequently demonstrated that fractions 8-10 did not only decrease the intestinal MI 26 hr after their injection, but also depressed the ^3H -thy-

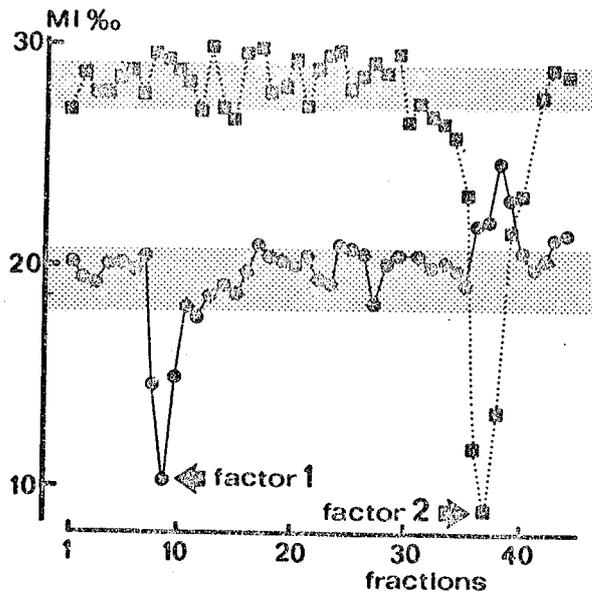


Fig. 2. Mitotic index in the intestine of the newt embryos sacrificed 5 hr (○) or 26 hr (●) after injection, at stage 34, of adult newt intestinal extract fractionated by G-200 Sephadex chromatography.

midine incorporation (Brugal and Pelmont, '74; '75). Since the observed inhibitions appeared as tissue-specific among investigated tissues, it was suggested from these results that two mitotic inhibitors were present in the intestinal extracts from the adult pleurodele: one (factor 1) was eluted with fractions 8-10 and blocked the cells at the end of the G_1 phase and the other (factor 2) was eluted with fractions 36-38 and blocked the cells in the G_2 phase. A cytophotometric study of the inhibited intestinal cell populations was performed by measuring the nuclear DNA content of cells stained with the Feulgen reagent. Age distributions of cells within the cycle were thus computed and undoubtedly demonstrated the accumulation of cells either in G_1 phase after injection of factor 1 or in G_2 phase following injection of factor 2. Moreover, cytophotometric study showed that inhibitory effects of both factor 1 and factor 2 lasted for about 12 hr (Brugal and Pelmont, '75).

BIOCHEMICAL PROPERTIES OF THE INTESTINAL MITOTIC INHIBITORS

As a first step to characterize the intestinal mitotic inhibitors, the effect of factor 1 and factor 2 containing fractions on the intestinal MI was tested after heating at various temperatures. Factor 1 was inactivated at 80°C (pH 7; 5 min) but not at 60°C. On the contrary, the inhibitory activity of factor 2 was not altered by heating at 100°C (pH 7; 5 min). These results are opposite to those concerning the epidermal chalones as G_2 epidermal inhibitor is heat labile (Hondius Boldingh and Laurence, '68) whereas the G_1 epidermal inhibitor is heat stable at 100°C (pH 6) (Marks, '73).

In order to evaluate their molecular weight, the factors 1 and 2 were chromatographed through a G-200 Sephadex gel column previously standardized by proteins of known molecular weights (MW). The results indicated that factor 1 is characterized by a MW ranging from 120,000 to 150,000 and that factor 2 has a MW less than 2,000 (Brugal and Pelmont, '74; '75). Two similar mitotic inhibitors, characterized by the same sizes and inhibiting specifically the G₁ and the G₂ intestinal cells of the newt embryos, were extracted from the intestine of adult quail and mouse. From these results, we conclude that the intestinal mitotic inhibitors are probably not species-specific among vertebrates.

The chalones already extracted from various tissues have a MW ranging from 100,000 to less than 2,000. Most of them seem to be proteins or glycoproteins with a MW of about 30,000-50,000 or peptides of one tenth of that size (Houck and Hennings, '73). The diversity of chalone size appears more likely to be related to the variety of extraction and purification procedures used than to the tissues of origin. Supporting this assumption, Marks ('73) has shown that epidermal G₁ inhibitor had an apparent MW somewhere between 1.10^5 and 3.10^5 as determined by gel filtration whereas it had an apparent MW of about 1.10^4 to 2.10^4 when the epidermal extract was pronase-digested prior to Sephadex chromatography. It was thus concluded that the G₁ chalone is constituted of a small active group linked to a macromolecular entity. Such a structure has also been suggested for the intestinal G₁ inhibitor (Brugal and Pelmont, '75).

In order to get some information on the chemical and physical properties of the intestinal G₁ inhibitor, the factor 1 containing fractions obtained from gel filtration were submitted together to electrofocusing with Ampholine pH 3-10. The collected fractions were injected in stage 34 embryos and the intestinal and telencephalonic MI were calculated 26 hr later and plotted against fractions number (Fig. 3). These results demonstrated a specific inhibition of the intestinal MI in animals treated with fractions 34-35 thus providing evidence that factor 1 is a protein with an isoelectric point at pH 6.7-7.0. The chemical nature of factor 2 is still unknown.

EFFECTS OF REPEATED INJECTIONS OF INTESTINAL MITOTIC INHIBITORS ON EMBRYONIC CELL PROLIFERATION

As our preliminary hypothesis was that the intestinal cell proliferation decrease, correlated to differentiation, may be triggered by an increasing concentration of intestinal mito-

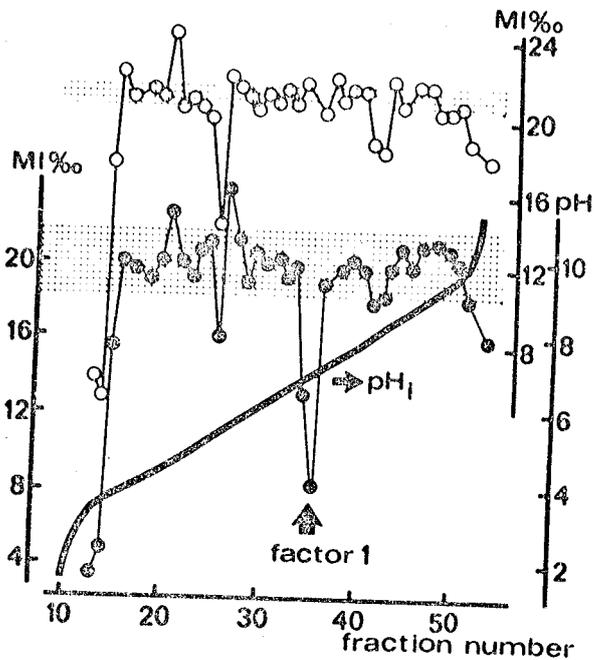


Fig. 3. Mitotic index in the telencephalon (○) and in the intestine (⊙) of newt embryos sacrificed 26 hr after injection, at stage 34, of fractions obtained by electrofocusing of factor 1 containing fractions from G-200 Sephadex chromatography.

tic inhibitors, we have performed repeated injections (one injection every 4 hr) of factor 1 or 2 in stage 34 embryos and sacrificed after various time intervals up to 93hr following the first injection.

Figure 4 shows that the intestinal MI of embryos treated

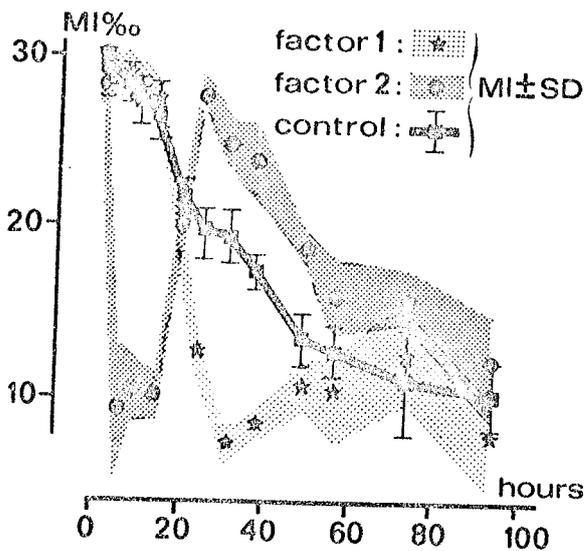


Fig. 4. Effect of repeated injections (one injection every 4 hr from stage 34 to 37) of factor 1 or factor 2 containing fractions, on the intestinal MI in the newt embryos sacrificed at different time intervals after the beginning of the treatment.

with factor 2 collapsed transiently, increased afterwards above the control values and finally decreased. This later diminution correlated to differentiation was delayed for about 20 hr in comparison to that of the controls. Therefore, both single and repeated injections of factor 2 could not delay the intestinal embryonic G₂ cells for more than about

PRESENCE OF INTESTINAL CHALONES.

20 hr. Owing to the inability of factor 2 to maintain G₂ inhibition in spite of repeated injections, and as cytophotometric study of age distribution of cells failed to demonstrate any resting G₂ cell sub-population within the embryonic intestine of the newt, it is very likely that this factor cannot be considered as one of the regulators of embryonic cell proliferation. It may have a role in adult animals since Pederson and Gelfant ('70) have provided evidence for a resting G₂ cell sub-population in the mouse duodenum.

As expected, the intestinal MI of embryos treated with factor 1 decreased drastically between 24 hr and 30 hr after the first injection (Fig. 4). Nevertheless, the increase of this MI up to control values between 36 hr and 48 hr showed some of the cells initially delayed in G₁ phase later divided. On the other hand, since the intestinal MI in treated animals never increased significantly above control values, other cells inhibited in G₁ phase did not divide again in the course of the experiment. It is likely that these cells entered G₀ phase and possibly differentiated (Brugal, '75). Owing to this result and since normally differentiating cells are arrested in the G₁ phase, it is likely that factor 1 may be considered as a potential regulator of cell proliferation in the intestine of the newt embryo. The adult newt intestinal extracts, however, did not induce any alteration of the cell proliferation pattern in entirely proliferating intestine of young newt embryos at stages 28 and 30 (unpublished data). It was thus suggested that responsiveness to chalone indicates some commitment of the cells to the path toward functionalization. In support of this conclusion, it has been shown that the responsiveness to G₁ chalone in the epidermis of newborn mice is also developed with increasing age (Bertsch and Marks, '74).

CONCLUSIONS

Taking into account the present experimental data, we have shown that the intestinal mitotic inhibitory factors extracted from the adult newt intestine are tissue-specific and species-unspecific; therefore, according to Bullough ('62), they should be called intestinal G₁ and G₂ chalones.

A hypothesis on the relations between cell proliferation and differentiation may be elaborated by focusing on the following assumptions: (i) during normal embryonic development, the progression of cell differentiation in a cell lineage is thought to be correlated to a definite number of cell generations, so that every developmental stage is reached after a given tissue-specific number of cell cycles (Dettlaff,

'64; Brugal, '71); (ii) two kinds of cell cycles subserving two distinct functions have been postulated: one is leading to a simple duplication of the mother cell's phenotype ("proliferative" cell cycles), the other is leading to a differentiation step of this phenotype ("quantal" cell cycles) (Holtzer et al., '72); (iii) the cell responsiveness to chalone was expected to require an advanced state of differentiation (Bertsch and Marks, '74; Brugal, '75). We thus assume that at least two "switches" are involved when an embryonic G₁ cell has to "decide" between entering a new cell cycle or taking the path toward functionalization. The first switch is turned on when the required number of quantal cell cycles has occurred, leading to a cell that is sufficiently differentiated to respond to chalone. The second switch is turned on when the chalone concentration within the tissue is high enough, i.e. when the required number of cells is obtained in this tissue. When both switches are turned off or when a single one is turned on, the G₁ cell enters a new quantal or proliferative cell cycle according to its differentiation state. On the contrary, when both switches are turned on, the G₁ cell leaves the mitotic cycle to enter the G₀ phase. It may then complete its differentiation to become functional. When the tissue specific function begins (feeding in the newt larvae for example) additional cell proliferation regulating mechanisms, such as G₂ chalone feedback, may happen in response to the occurrence of cell death and cell loss.

LITERATURE CITED

- Bertsch, S. and Marks, F. 1974. Lack of an effect of tumor-promoting phorbol esters and of epidermal G₁ chalone on DNA synthesis in the epidermis of newborn mice. *Cancer Res.* 34: 3283-3288.
- Bischoff, R. 1964. Inhibition of mitosis by homologous tissue extracts. *J. Cell Biol.* 23: 10A-11A.
- Bullough, W. S. 1962. The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. *Biol. Rev.* 37: 307-342.
- Brugal, G. 1971. Etude autoradiographique de l'influence de la température sur la prolifération cellulaire chez les embryons âgés de *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien, Urodele). *Wilhelm Roux' Archiv* 168: 205-225.
- Brugal, G. 1973. Effects of adult intestine and liver extracts on the mitotic activity of corresponding embryonic tissues of *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibia, Urodele). *Cell Tissue Kinet.* 6: 519-524.

- Brugal, G. and Pelmont, J. 1974. Presence, dans l'intestin du Triton adulte *Pleurodeles waltlii* Michah., de deux facteurs antimitotiques naturels (chalones) actifs sur la proliferation cellulaire de l'intestin embryonnaire. *C. R. Acad. Sc. Paris, Ser. D 278*: 2831-2834.
- Brugal, G. and Pelmont, J. 1975. Existence of two chalone-like substances in intestinal extract from the adult newt, inhibiting embryonic intestinal cell proliferation. *Cell Tissue Kinet. 8*: 171-187.
- Brugal, G. 1975. Effets des chalones intestinaux sur la proliferation et la differenciation cellulaires de l'epithelium intestinal embryonnaire du Triton *Pleurodeles waltlii* Michah. (in preparation).
- Dettlaff, T. A. 1964. Cell divisions, duration of interkinetic states and differentiation in early stages of embryonic development. In: *Advances in Morphogenesis 3*: 323-362.
- Galjaard, H., van der Meer-Fiegggen, W., and Giesen, J. 1972. Feedback control by functional villus cells on cell proliferation and maturation in intestinal epithelium. *Exp. Cell Res. 73*: 197-207.
- Holtzer, H., Weintraub, H., Mayne, R. and Mochan, B. 1972. The cell cycle, cell lineages, and cell differentiation. *Current Topics in Developmental Biology 7*: 229-256.
- Hondius Boldingh, W. and Laurence, E. B. 1968. Extraction, purification and preliminary characterisation of the epidermal chalone: a tissue specific mitotic inhibitor obtained from vertebrate skin. *European J. Biochem. 5*: 191-198.
- Leblond, C. P. and Messier, B. 1958. Renewal of chief cells and goblet cells in the small intestine as shown by radioautography after injection of thymidine-³H into mice. *Anat. Record 132*: 247-259.
- Lipkin, M. 1973. Proliferation and differentiation of gastrointestinal cells. *Physiol. Rev. 53*: 891-915.
- Loran, M. R., Crocker, T. T. and Carbone, J. V. 1964. The humoral effect of intestinal resection on cellular proliferation and maturation in parabiotic rats. *Fed. Proc. 23*: 407.
- Marks, F. 1973. A tissue-specific factor inhibiting DNA synthesis in mouse epidermis. *Natl. Cancer Inst. Monogr. 38*: 79-90.
- Meer-Fiegggen, W. van der. 1973. Regulation of cell proliferation and differentiation in intestinal epithelium. Thesis; Rotterdam.
- Patten, S. F. Jr. 1961. Renewal of the intestinal epithelium of the Urodele. *Exp. Cell Res. 20*: 638-641.

- Pederson, T. and Gelfant, S. 1970. G₂-population cells in mouse kidney and duodenum, and their behavior during the cell division cycle. *Exp. Cell Res.* 59: 32-36.
- Philpott, G. W. 1971. Tissue-specific inhibition of cell proliferation in embryonic stomach epithelium *in vitro*. *Gastroenterology* 61: 25-34.

CHAPITRE - VI -

CONCEPTION ET REALISATION D'UN SYSTEME AUTOMATIQUE D'ANALYSE DES POPULATIONS CELLULAIRES

- ASPECT TECHNOLOGIQUE

" Le S.A.M.B.: un nouveau système d'acquisition de l'image donnée par un microscope pour l'analyse morphométrique et densitométrique "

- APPLICATION À L'ANALYSE DES POPULATIONS CELLULAIRES

" Un nouveau système d'analyse densitométrique et morphologique des préparations microscopiques. Application à la reconnaissance et au comptage automatiques des cellules dans les différentes phases du cycle mitotique "

REVUE "AUTOMATISME" , SOUS PRESSE

Le SAMB*:

Un nouveau système d'acquisition de l'image
donnée par un microscope pour l'analyse morpho-
métrique et densitométrique.

G. BRUGAL
R. BOUTTAZ
J.M. CHASSERY

**Système d'Analyse Microphotométrique à Balayage*

193

RESUME

Le S.A.M.B. est un dispositif d'acquisition de l'image fournie par un microscope et procédant par balayage au moyen d'un disque de Nipkow interposé entre le microscope et un photomultiplicateur. Un dispositif d'échantillonnage du signal photométrique, dépendant du disque, permet d'éviter les erreurs dues à la géométrie du balayage. Le signal photométrique et les impulsions d'échantillonnage sont appliquées à l'entrée d'un convertisseur analogique-numérique. Une unité électronique de commande et de contrôle fondée sur l'utilisation d'un micro-processeur, permet de combiner les déplacements de la préparation microscopique entraînée par des platines motorisées et le balayage des champs successifs par le disque : l'image de la totalité de la préparation peut être ainsi obtenue puis reconstituée et analysée par un ordinateur. Les performances du S.A.M.B. sont les suivantes : pouvoir de résolution (définition) = $0,25 \mu\text{m}$; nombre de niveaux de gris (contraste) = 512 ; vitesse (fréquence d'acquisition) = 4 KHz.

SUMMARY

This paper describes an automated Nipkow-disk scanning microphotometer that was developed for obtaining accurate high-speed densitometric and morphometric information about every kind of image given by a microscope. An opto-electronic sampling device of the photometric signal obtained from the photomultiplier is attached to the mechanical scanner in order to provide against geometrical errors. The sampling impulses and the photometric signal are directed to the input of an analog-digital converter. A programmable electronic control unit built around a microprocessor, allows the combination of the shifting of the microscope moving stage and the scanning of the successive fields in order to get the whole image of the microscopic specimen. The reconstitution and analysis of the digital image may be performed by means of an on-line or off-line computer. The specifications of such an image acquisition system are the following: resolving power (definition) = $0.25\mu\text{m}$; number of grey levels (contrast) = 512 ; speed (acquisition frequency) = 4 kHz.

INTRODUCTION

Le microscope, instrument d'observation qualitative, est de plus en plus utilisé comme appareil de mesure dans le but de:

- doser diverses substances dans des échantillons de quelques dixièmes de μm^3 ,
- quantifier la forme et la texture des échantillons observés.

En devenant quantitative la microscopie trouve sans cesse des applications nouvelles et nombreuses dans le domaine de la recherche et de l'industrie (ZIMMER, 1973).

Un système de microscopie quantitative comporte classiquement: un microscope, un dispositif d'acquisition de l'image donnée par le microscope et un calculateur pour le traitement des données. Le dispositif d'acquisition de l'image est l'interface critique entre le microscope et le calculateur car il doit conserver toute l'information utile portée par l'image ; dans ce but, il doit:

- respecter le pouvoir de résolution du microscope en distinguant deux points distants d'au moins $0,25 \mu\text{m}$;
- discriminer un nombre de niveaux lumineux qui, dans la plupart des applications médicales, doit être supérieur à 100 par unité de densité optique.

Ces performances sont celles des microphotomètres actuellement commercialisés tels que LEITZ MPV ou REICHERT Univar, dans lesquels la préparation microscopique est portée par une platine motorisée qui la déplace par pas de $0.5 \mu\text{m}$ devant l'objectif du microscope. A chaque pas, une mesure est effectuée par un photomultiplicateur sur un élément de l'image correspondant à une surface de $0.5 \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$ dans le plan de la préparation.

La fréquence maximale d'acquisition des valeurs photométriques des éléments de l'image est limitée par la fréquence de déplacement de la platine motorisée et n'excède pas quelques centaines de hertz . Dans ces conditions, le temps nécessaire pour l'exploration de la surface utile d'une préparation microscopique (20mm x 40mm) est de plusieurs centaines d'heures. De tels systèmes ne conviennent donc, compte tenu de leur lenteur, que pour l'analyse densitométrique précise de surfaces très petites.

Des systèmes d'acquisition d'image beaucoup plus rapides, comportant une caméra TV (LEITZ, T.A.S.; CORNING MEDICAL, L.A.R.C.) ou une batterie de photodiodes (EIDOMAT), sont également utilisées ; néanmoins, le nombre de niveaux lumineux discriminés par de tels capteurs dans la gamme d'éclairement du microscope est généralement faible (inférieur à 30 niveaux pour 2 unités de densité optique). Ces systèmes conviennent donc pour des opérations de comptage par tout ou rien sur des surfaces relativement étendues ; en outre, ils nécessitent une électronique figée pour le traitement de l'image en raison de la fréquence élevée d'acquisition des données. Pour ces raisons, les applications de tels systèmes dans le domaine de la microscopie en biologie et en médecine sont peu nombreuses.

Le SAMB a été réalisé pour concilier les avantages respectifs des microphotomètres classiques et des analyseurs d'images à caméra TV et comporte dans ce but un dispositif mécanique de balayage interposé entre la préparation microscopique et un photomultiplicateur.

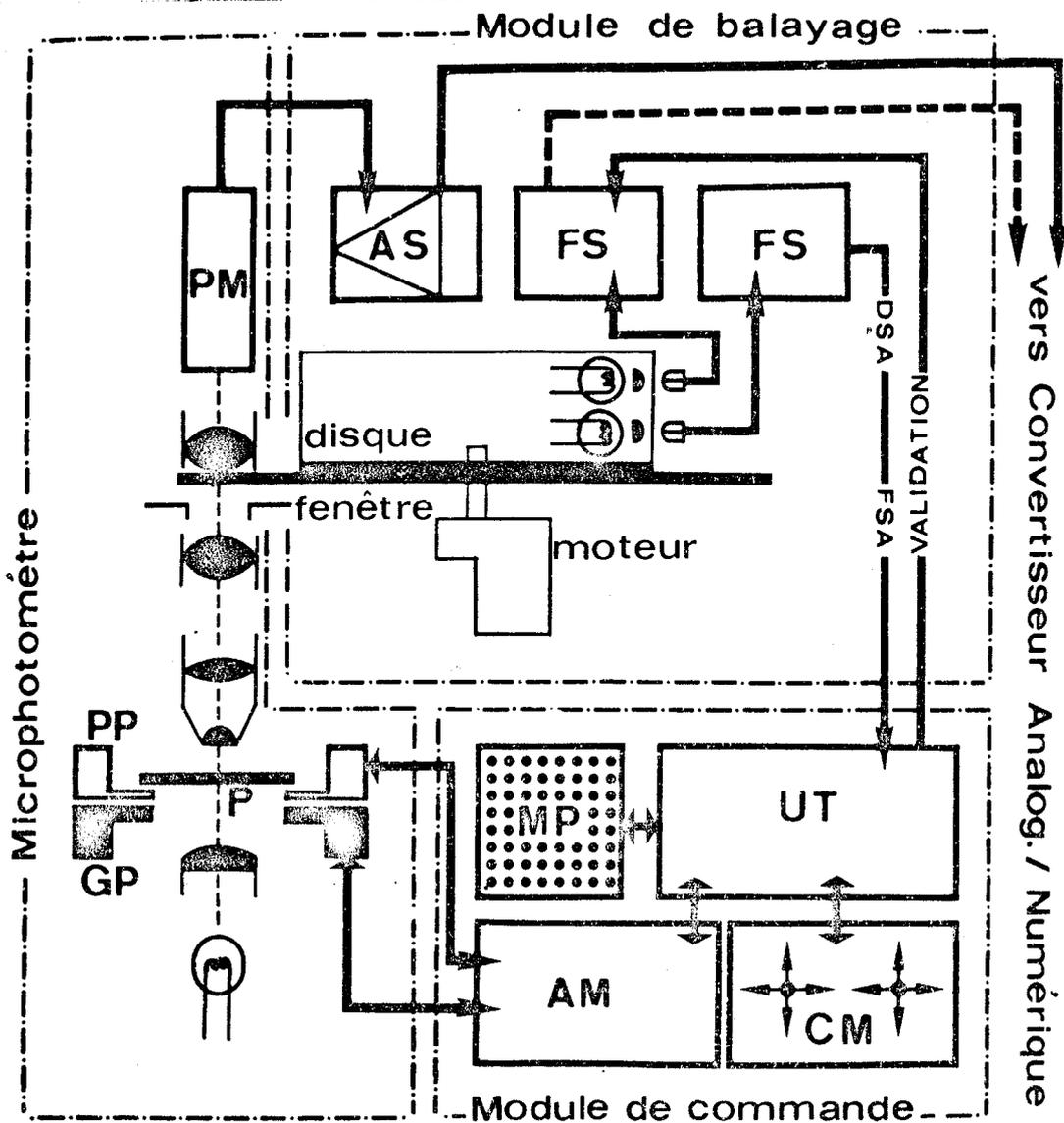
SCHEMA DE PRINCIPE

Le SAMB comprend (figure 1):

- un microphotomètre LEITZ, MPV1, équipé de deux platines motorisées déplaçant la préparation microscopique, l'une par pas de 10 μ m(GP) et l'autre par pas de 0.5 μ m(PP). La platine GP entraîne dans son déplacement la platine PP ;
- un module de balayage de l'image et de commande asynchrone

FIGURE 1 : Schéma d'organisation du SAMB

AS : amplificateur de signal
 FS : conformateur d'impulsions
 MP : matrice de programmation
 CM : commande manuelle
 AM : alimentation des platines motorisées
 PM : photomultiplicateur
 P : préparation microscopique
 GP : platine à grands pas (10 μ m)
 PP : platine à petits pas (0.5 μ m)
 UT : unité de traitement.



de conversion analogique-numérique (CAN) du signal photométrique ;

- un module de commande programmable pilotant les platines motorisées et contrôlant la commande de CAN.

MODULE DE BALAYAGE

Balayage de l'image

Le balayage de l'image est réalisé par la rotation d'un disque, dérivé du disque de NIPKOW (SAWYER et BOSTROM, 1958; JANSEN 1961) et entraîné par un moteur électrique et une boîte de vitesses (vitesse maximale: 2 tours par seconde). La périphérie du disque (figure 2) (diamètre = 240mm) obture une fenêtre fixe carrée (11.25mm x 11.25mm) à travers laquelle est vue l'image donnée par le microscope. La couronne périphérique du disque passant derrière la fenêtre comporte 45 orifices carrés (0.25mm x 0.25mm), ou diaphragmes, séparés par une distance telle qu'un seul de ces diaphragmes n'est présent dans la fenêtre à un instant donné. Chacun de ces diaphragmes décrit une ligne en arc de cercle dans la fenêtre lors de la rotation du disque. La distance de chaque diaphragme au centre du disque est telle que la ligne balayée par un diaphragme est parfaitement comprise entre le passage du diaphragme précédent et celui du diaphragme suivant. La fenêtre est ainsi entièrement balayée par le passage des 45 diaphragmes successifs. Ces derniers sont distribués sur le disque dans un angle de 270° si bien qu'un secteur de 90° est aveugle.

L'intensité de lumière, reçue de l'image donnée par le microscope et traversant les diaphragmes successifs à chaque instant de leur passage dans la fenêtre, donne lieu à un signal photométrique périodique qui s'annule pendant l'obturation complète séparant le passage de deux diaphragmes successifs et s'annule plus longuement pendant le passage du secteur aveugle (figure 3).

Commande de CAN

Le traitement de l'image nécessite un échantillonnage du signal photométrique pendant chaque ligne de balayage de façon à n'en retenir que les valeurs correspondant aux positions adjacentes successives de chaque diaphragme dans la ligne qu'il balaye (figure 3).

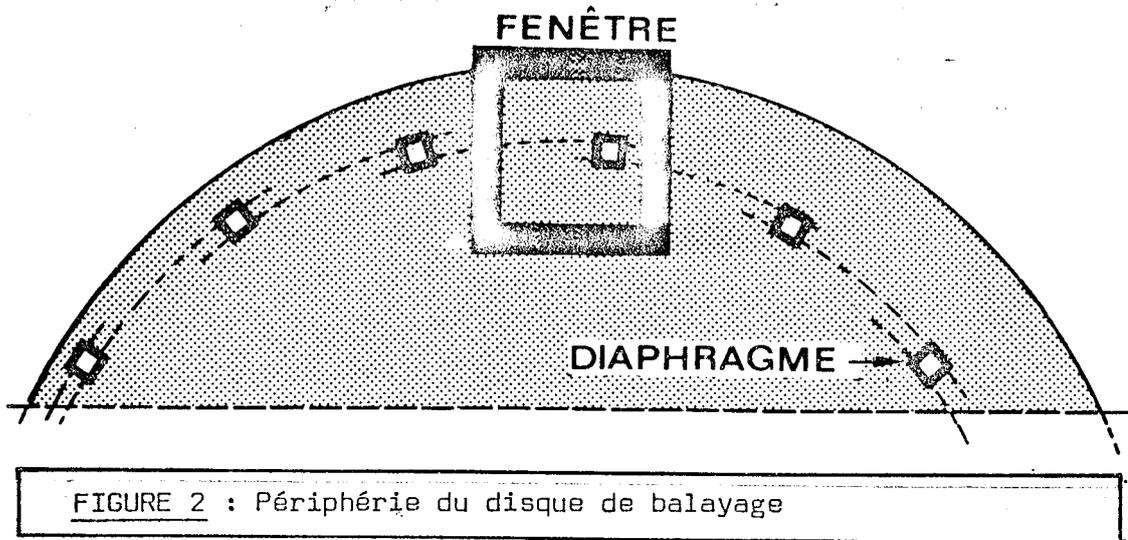


FIGURE 2 : Périphérie du disque de balayage

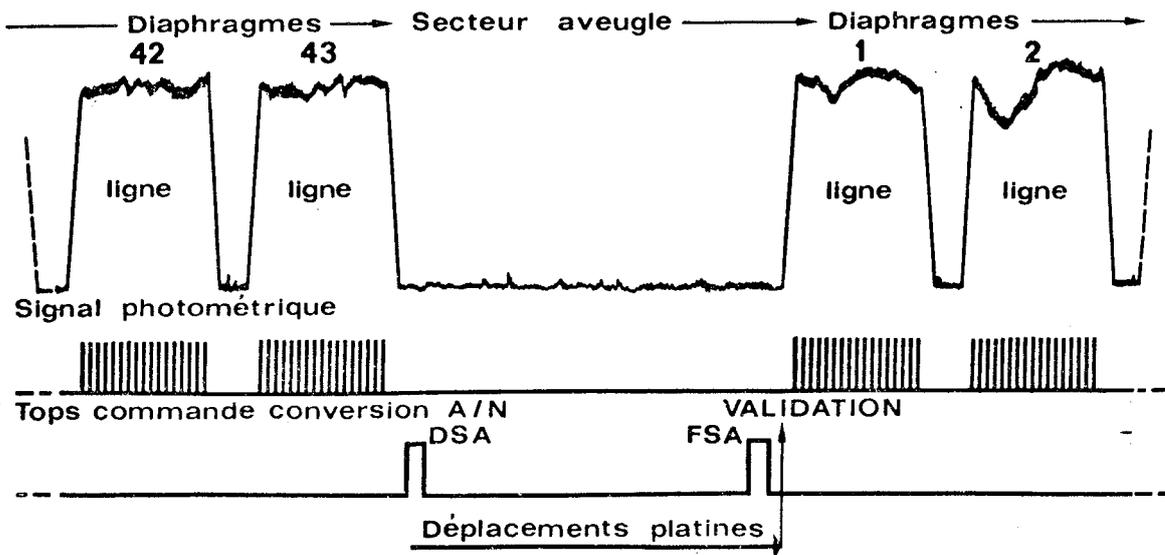


FIGURE 3 : Signal photométrique et tops de commande de conversion analogique/numérique.

DSA: signal de début de secteur aveugle
 FSA: signal de fin de secteur aveugle

Le temps mis par un diaphragme pour se déplacer de sa propre dimension sur la ligne dépend de la position de la ligne dans la fenêtre pour une vitesse donnée du disque. Ce temps est d'autant plus long que le diaphragme est plus près du centre du disque. Il n'est donc pas possible d'échantillonner le signal photométrique à une fréquence fixe.

De façon à échantillonner le signal photométrique de chaque ligne de balayage, à une fréquence qui lui est propre, des signaux de commande de conversion analogique/numérique sont portés par une piste optique circulaire solidaire du disque. Ces signaux sont matérialisés par 45 groupes de 45 barres noires de 0.1mm de largeur sur film transparent. Le film passe entre une source lumineuse et un système optique projetant l'image des barres noires sur une photodiode (figure 1). Pendant la rotation du disque, la succession des barres noires et des intervalles lumineux qui les séparent génère dans la photodiode un signal électrique périodique dont la fréquence dépend de l'écartement entre les barres. Chacun des 45 groupes de barres correspond au passage d'un diaphragme dans la fenêtre et l'écartement des barres dans chaque groupe est directement fonction du temps mis par le diaphragme correspondant pour se déplacer de sa propre dimension sur la ligne balayée.

Les signaux de la photodiode sont mis en forme et calibrés de façon à entrer sur un convertisseur analogique-numérique pour commander, à fréquence variable et adaptée à chaque ligne, le découpage et la conversion du signal photométrique.

Liaison entre le module de balayage et le module de commande

Le disque porte un secteur aveugle dont le passage devant la fenêtre sépare deux balayages successifs. Pendant le passage de ce secteur aveugle devant la fenêtre, le module de commande provoque le déplacement de la préparation microscopique par les platines motorisées de façon à amener dans la fenêtre un nouveau champ à balayer. Ce dernier peut à volonté être ou non adjacent au précédent. Pour cela, une seconde piste optique est portée par le film

solidaire du disque et passe entre une source lumineuse et une seconde photodiode qui génère un signal au début et à la fin du passage du secteur aveugle dans la fenêtre. Un signal de début (DSA) et un signal de fin (FSA) de secteur aveugle sont donc obtenus à chaque tour de disque (figure 3). Ces signaux sont mis en forme et envoyés au module de commande. Par programmation sur la matrice du module de commande, ces signaux peuvent être utilisés pour synchroniser les déplacements des platines motorisées avec le passage du secteur aveugle. Les signaux de commande de CAN fournis par le module de balayage ne sont validés que par le module de commande après réception du signal de fin de secteur aveugle (FSA) de sorte qu'aucune valeur photométrique ne peut être retenue pendant la durée du déplacement des platines même si elle excède le temps de passage du secteur aveugle.

MODULE DE COMMANDE

Le module de commande est une unité programmable:

- par enfichage de diodes aux noeuds d'intersections des 30 lignes et des 30 colonnes d'une matrice ;
- par affichage sur des roues codeuses numériques.

Un mode manuel peut être sélectionné par clavier ; il permet de commander le déplacement des platines GP et PP dans les directions X et Y à l'aide d'un levier à 4 directions pour chacune d'elles.

L'adresse des platines GP et PP est exprimée par le nombre de pas effectués dans les directions X et Y ; elle est actualisée après chaque déplacement et visualisée à l'aide d'afficheurs numériques à diodes lumineuses.

Matrice de programmation

Chaque ligne de la matrice de programmation correspond à une instruction qui est soit:

- une directive de programme (lignes 1 à 5 et 23 à 30),
- une commande (lignes 8 à 15 et 20),
- une attente de signal extérieur (lignes 6, 18, 19).

Instructions portées par les lignes de la matrice de programmation:

- 1 Début de cycle 1
- 2 Début de cycle 2
- 3 Début de cycle 3
- 4 Début de cycle 4
- 5 Début de cycle 5
- 6 Attente signal DSA
- 7
- 8 Avance platine GP en X
- 9 Recul platine GP en X
- 10 Avance platine GP en Y
- 11 Recul platine GP en Y
- 12 Avance platine PP en X
- 13 Recul platine PP en X
- 14 Avance platine PP en Y
- 15 Recul platine PP en Y
- 16
- 17
- 18 Attente temporaire
- 19 Attente signal FSA
- 20 Emission signal validation
- 21
- 22
- 23 Fin de cycle 5
- 24 Fin de cycle 4
- 25 Fin de cycle 3
- 26 Fin de cycle 2
- 27 Fin de cycle 1
- 28 Retour début programme
- 29
- 30 Stop

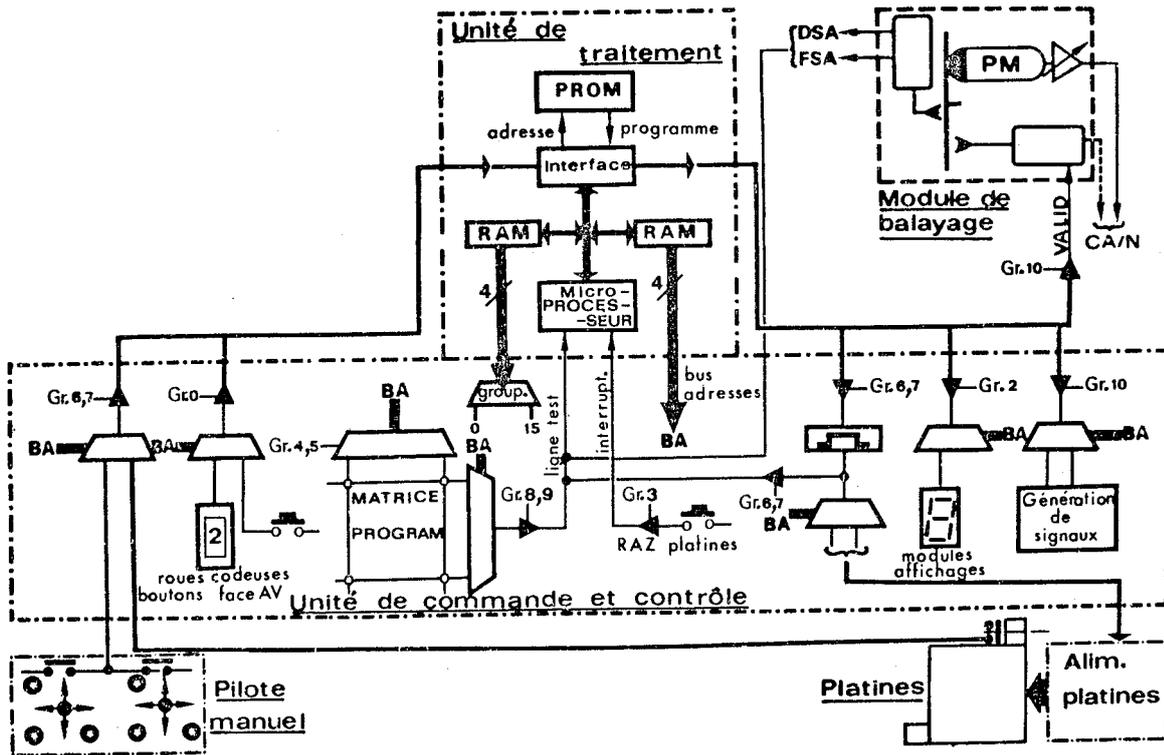


FIGURE 4 : Schéma de principe de l'électronique de commande

Les directives de programme permettent en particulier la répétition de certaines parties du programme comprises entre un début et une fin de cycle ; le nombre de fois dont doit être répétée une partie de programme est indiqué par affichage sur roues codeuses numériques pour chacun des 5 cycles.

Chaque commande de déplacement des platines GP et PP en X et Y peut être exécutée un nombre de fois consécutives déterminé par affichage sur des roues codeuses numériques.

Les attentes des signaux FSA et DSA permettent de synchroniser par programme les déplacements des platines avec le passage du secteur aveugle. L'émission d'un signal de validation permet d'éviter que le signal photométrique ne soit échantillonné pendant le déplacement des platines ou que l'échantillonnage ne débute en cours de balayage.

Unité de traitement (figure 4)

Autour d'un microprocesseur (INTEL 4040) sont disposés divers circuits: mémoires vives (RAM), mémoires mortes (PROM) et circuit d'interface. Cet ensemble permet de sélectionner par adressage divers systèmes extérieurs: un dialogue est alors possible entre l'un des systèmes extérieurs et l'ensemble microprocesseur par l'intermédiaire de bus d'entrée et de sortie.

Afin de suivre l'évolution d'informations extérieures (signaux DSA et FSA par exemple), une ligne de test est également utilisée. Enfin certaines commandes particulières (remise à zéro des platines par exemple) se font à partir d'ordres reçus sur une ligne d'interruption.

Adressage de systèmes extérieurs

On dispose de 2 bus de 4 bits pour les adresses. Le décodage des informations du premier bus fait apparaître 16 adresses de groupe: à chaque système extérieur est associée une adresse de groupe. Le décodage des informations du deuxième bus permet de reconnaître 16 éléments dans chaque système extérieur.

Affectation des adresses de groupe:

Groupe adresse 0 : 11 roues codeuses et boutons face avant

"	"	1 : 15 roues codeuses
"	"	2 : 14 modules d'affichage
"	"	3 : commande d'interruption
"	"	4 : matrice colonnes de 1 à 16
"	"	5 : matrice colonnes de 17 à 30
"	"	6 : commande moteurs de platine GP
"	"	7 : commande moteurs de platine PP
"	"	8 : matrice lignes de 1 à 16
"	"	9 : matrice lignes de 17 à 30
"	"	10 : test des attentes temporaires et signaux extérieurs.

Il reste donc 5 possibilités d'adressage de groupe permettant l'extension éventuelle du module de commande.

Bus d'entrée

Le bus d'entrée est utilisé chaque fois que l'ensemble microprocesseur doit effectuer la lecture d'informations extérieures préalablement adressées.

Les systèmes extérieurs que l'ensemble microprocesseur doit lire sont:

- les roues codeuses affichées manuellement,
- les boutons poussoirs de la face avant de l'appareil,
- des contacts de "fin de course" indiquant que les platines motorisées sont en butée mécanique.

Bus de sortie

Le bus de sortie est utilisé chaque fois que l'ensemble microprocesseur doit communiquer des données vers l'extérieur ou effectuer des commandes.

Les systèmes extérieurs concernés sont:

- les modules d'affichage numériques,
- les commandes des moteurs des platines,
- diverses émissions de signaux vers l'extérieur.

Ligne test

L'ensemble microprocesseur utilise la ligne test pour connaître l'état d'évènements extérieurs préalablement adressés.

Les systèmes extérieurs connectés à la ligne test sont:

- la matrice de programmation. Les divers noeuds de la matrice sont successivement testés afin de déceler la présence ou l'absence de diode,
- la commande des moteurs des platines: un test est ici nécessaire afin de respecter les fréquences maxima de fonctionnement des moteurs,
- un certain nombre de signaux d'attente venant de l'extérieur.

PERFORMANCES ET APPLICATIONS

Le SAMB peut être couplé directement à un enregistreur analogique, ou, par l'intermédiaire d'un convertisseur analogique-numérique, à un enregistreur numérique ou un ordinateur pour le traitement de l'image en temps réel.

L'image acquise est constituée de 1935 points de mesure adjacents et correspondant à 43 lignes de 45 éléments de surface de $0.25\mu\text{m} \times 0.25\mu\text{m}$ au niveau de la préparation microscopique.

La fréquence d'acquisition est de 4kHz avec une résolution photométrique de 512 niveaux lumineux couvrant la gamme de 0 à 2 unités de densité optique.

Le SAMB permet d'acquérir l'image obtenue dans toutes les méthodes de la microscopie telles que: lumière transmise, lumière incidente, lumière polarisée, contraste interférentiel, fluorescence, etc... ; il trouve donc une application immédiate dans toutes les opérations d'analyse morphologique et densitométrique de l'image microscopique dans des domaines aussi variés que la métallurgie, la minéralogie, la biologie et la médecine (histologie, histochimie, cytologie).

BIBLIOGRAPHIE

JANSEN M.T.

- A simple scanning cytophotometer
Histochem, 342/347.

SAWYER H.S. et BOSTROM R.C. (1958)

- A new Nipkow-disk scanner for accurate cytological
measurements.
IRE, Nat. Convention Re, 37/41.

ZIMMER H.G. (1973)

- Microphotometry. In : Micromethods in molecular biology.
NEUHOFF V. ed. Springer-Verlag, BERLIN, 297/328.
-

PHOTO 1: Le SAMB - vue d'ensemble

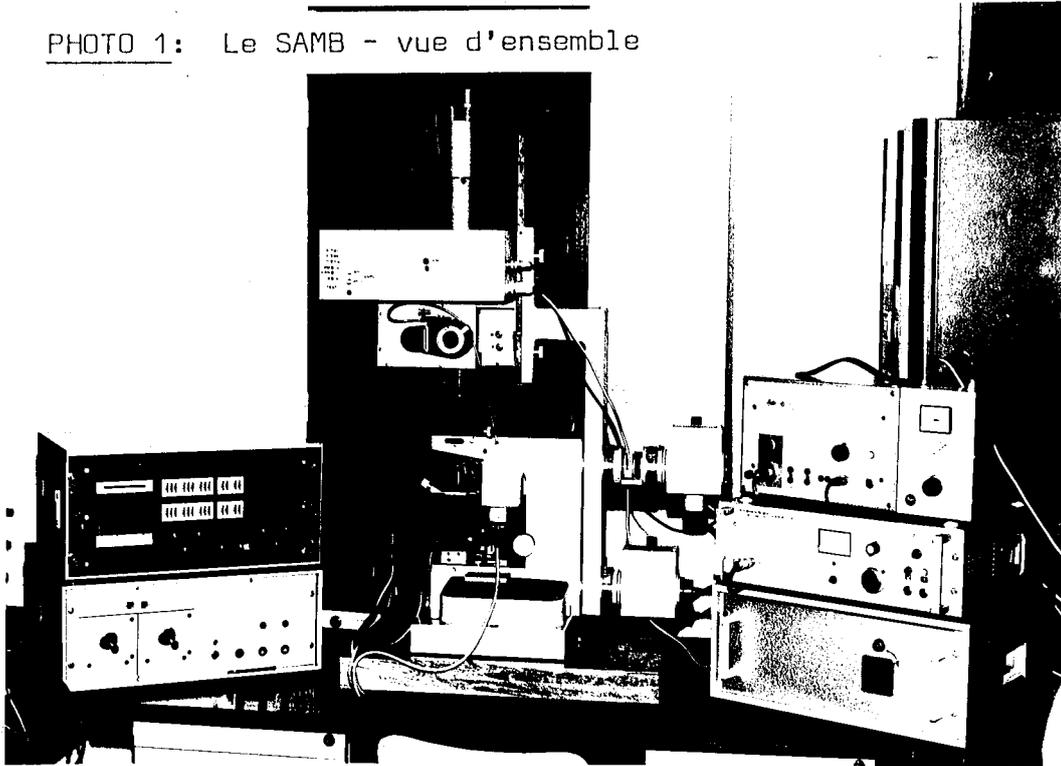
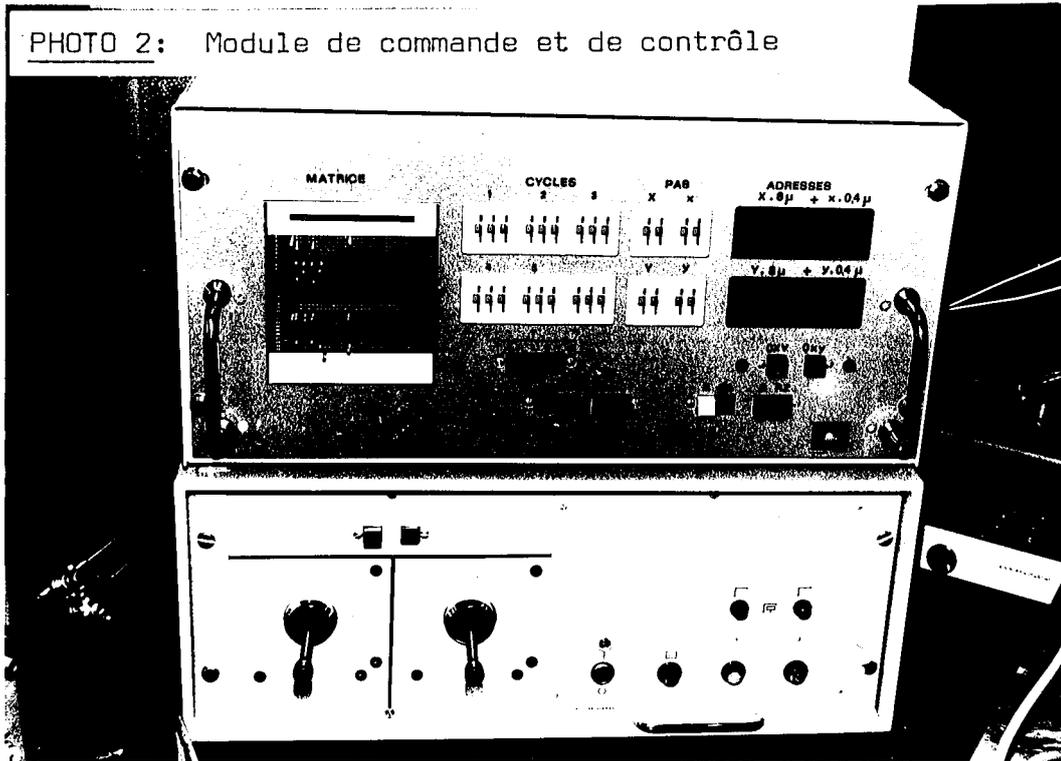


PHOTO 2: Module de commande et de contrôle



Un nouveau système d'analyse densitométrique
et morphologique des préparations microscopiques.
Application à la reconnaissance et au comptage
automatiques des cellules dans les différentes
phases du cycle mitotique. *

A new image-processing system designed for
densitometry and pattern analysis of
microscopic specimen. Application to the
automated recognition and counting of cells
in the various phases of the mitotic cycle.

BRUGAL Gérard et

CHASSERY Jean-Marc

Laboratoire de Zoologie et Biologie Animale, et
Institut de Mathématiques Appliquées
Université Scientifique et Médicale de Grenoble,
B.P. 53 , 38041 GRENOBLE CEDEX FRANCE

SOU MIS POUR PUBLICATION DANS HISTOCHEMISTRY

* Ce travail a bénéficié de l'aide du CNRS
(ATP N° A 655 1799 et ATP N° 1751) et de
l'INSERM (AT N° 74 14 2036).

RESUME

La reconnaissance et le comptage des cellules dans les différentes phases du cycle mitotique ont été réalisés à l'aide d'un nouveau système d'analyse densitométrique et morphologique des préparations microscopiques. Le processus d'analyse est entièrement automatique et consiste à balayer l'image de champs successifs de la préparation avec une définition égale au pouvoir de résolution du microscope. L'alternance entre le balayage de l'image et les déplacements de la préparation est commandée et contrôlée par une unité électronique programmable organisée autour d'un microprocesseur. Le traitement des données est réalisé par un ordinateur sans stockage de l'image en unité centrale ; il n'est donc pas limité par le nombre des données analysées. Les résultats préliminaires de l'analyse densitométrique et morphologique de cellules embryonnaires télencéphaliques montrent que le système utilisé permet de reconnaître et de compter les cellules en mitose, les cellules en phases G_1 , S et G_2 et les cellules qui ne sont pas engagées dans un cycle mitotique (phase G_0 sensu largo). Ces données permettent d'établir les paramètres de la cinétique de prolifération dans la population étudiée, et notamment l'indice mitotique et le coefficient de prolifération, à partir d'une seule préparation histologique.

SUMMARY

A new image analysing system, designed for microphotometric measurement and pattern recognition has been applied in the discrimination of cells from the various phases of the mitotic cycle. The data acquisition procedure is controlled by a programmable electronic unit and involves the combination of the shifting of the microscope moving stages and the scanning of the successive fields by a mechanical device. The data processing is achieved by a computer. The preliminary results we obtained have shown that such a system allows the automatic recognition and counting of the M, G₁, S and G₂ cells as also the G₀ resting cells. The most useful parameters of the cell proliferation kinetics are thus obtained from a single specimen of a cell population.

INTRODUCTION

L'observation microscopique qualitative est complétée, de plus en plus souvent, par des dosages photométriques de substances diverses (acides nucléiques, protéines) ou par la mesure de paramètres morphologiques (dénombrement, surface, périmètre, indice de courbure) au niveau tissulaire, cellulaire ou sub-cellulaire.

Les dosages photométriques réalisés sur des échantillons microscopiques, qui sont en général hétérogènes et de formes irrégulières, relèvent des méthodes particulières de la microphotométrie ou cytophotométrie (SANDRITTER et KIEFER, 1965 ; WIED et BAHR, 1970). La méthode de dosage qui, dans ce domaine, s'est révélée la plus appropriée, consiste à intégrer les valeurs photométriques mesurées sur les différents points de l'échantillon par un photomultiplicateur associé à un système de balayage dont la résolution approche le pouvoir séparateur du microscope. La théorie de la photométrie à balayage, développée par MERTZ et GRAY (1934), a été mise en application notamment par CASPERSSON (1936, 1950) et CASPERSSON et LOMAKKA (1962) et a conduit à la réalisation de divers microphotomètres à balayage.

La mesure des paramètres morphologiques d'une image est fondée sur la transformation par "tout ou rien" dont la théorie mathématique a été développée par MATHERON (1969). Ces travaux fondamentaux, mis en application notamment par SERRA (1971), ont conduit à la réalisation de divers analyseurs d'images utilisant une caméra TV comme dispositif d'acquisition.

L'automatisation des microphotomètres et des analyseurs d'images, et l'utilisation d'ordinateurs pour le traitement des données, ouvrent de nouvelles perspectives à l'histologie et la cytologie tant fondamentales que cliniques. Cependant, un antagonisme persiste entre l'analyse densitométrique et l'analyse morphologique des images et se traduit par la coexistence actuelle d'appareillages n'ayant que l'une ou l'autre vocation. Les microphotomètres -en raison de l'exiguité des champs balayés, de la lenteur du balayage et de la faible capacité des unités logiques de traitement qui leur sont associées- ne conviennent pas à la mesure de paramètres morphologiques. Réciproquement, les analyseurs d'images ne permettent pas des mesures densitométriques précises puisque les caméras TV ne peuvent pas discriminer plus de 5 niveaux lumineux dans la gamme des densités optiques de 0 à 1 unité ; or, la précision requise pour les dosages microphotométriques

implique la discrimination de 100 niveaux lumineux au moins dans ces limites.

Dans le domaine de l'analyse microscopique quantitative d'échantillons biologiques, la nécessité de concilier, dans un seul appareil, les avantages respectifs de la microphotométrie et de l'analyse d'images devient évidente chaque fois que l'histologiste ou le cytologiste est confronté à un problème concret. Ainsi, la reconnaissance des phases du cycle mitotique (G_1 , S, G_2 , M) dans lesquelles se trouvent les cellules d'une population étalées sur une lame histologique et colorées par la réaction de FEULGEN, nécessite à la fois (1) le dosage de l'ADN nucléaire par microphotométrie pour distinguer les cellules en phase de synthèse d'ADN (S) des cellules pré- et post- mitotiques (G_2 et G_1 respectivement), (2) la reconnaissance morphologique des cellules en mitose (M) et (3) le comptage des cellules dans chacune de ces 4 catégories. De la même façon, la reconnaissance et le classement des chromosomes pour l'établissement automatique de caryotypes, la reconnaissance et le comptage de cellules malignes parmi des cellules normales, ou tout autre cytodiagnostics, imposent de prendre en considération des critères densitométriques et morphologiques. En outre, l'automatisation de l'analyse est le moyen le plus efficace d'obtenir un résultat indépendant des qualités de l'observateur.

Dans le but d'acquérir l'image donnée par un microscope en vue de l'analyse simultanée de ses caractères densitométriques et morphologiques, le S.A.M.B. (Système d'Analyse Microphotométrique à Balayage) a été réalisé par l'adaptation d'un module de balayage et d'une unité électronique de commande et de contrôle à un microphotomètre classique équipé de platines motorisées (BRUGAL et al, 1976). Le présent mémoire rapporte une application du S.A.M.B. à la reconnaissance et au comptage des cellules dans les différentes phases du cycle mitotique. Le but d'un tel examen est de déterminer la proportion des cellules d'une population qui sont dans chacune des phases du cycle mitotique, afin d'en déduire les paramètres de la prolifération cellulaire dans cette population. L'utilisation, à cette fin, des méthodes d'analyses microphotométriques et morphologiques évite d'employer les artifices expérimentaux classiquement utilisés tels que l'autoradiographie après marquage des cellules par la thymidine tritiée

ou le blocage des cycles cellulaires par les inhibiteurs mitotiques (colchicine ou colcémide) ; ces méthodes sont en effet d'une mise en oeuvre longue et fastidieuse et introduisent, dans les résultats obtenus, des erreurs difficiles à évaluer en raison des difficultés de contrôle de la durée de disponibilité de la thymidine tritiée dans l'organisme et de la dégénérescence des cellules bloquées en métaphase par les poisons mitotiques.

L'utilisation des méthodes microphotométriques pour l'étude de la prolifération cellulaire (VENDRELY, 1971 ; GRAY, 1974) permet au contraire de déterminer avec précision les paramètres de la cinétique cellulaire à partir d'une seule préparation histologique.

Figure 1 - Le S.A.M.B. (Système d'analyse microphotométrique à balayage). A : alimentation des lampes du microscope ; S : alimentation du photomultiplicateur ; PM : photomultiplicateur ; B : module de balayage de l'image et de commande de la conversion analogique-numérique ; P : platine motorisée au pas de 10 μm ; p : platine motorisée au pas de 0,5 μm ; C : module de commande programmable ; M : module de pilotage manuel des platines motorisées.

MATERIEL ET METHODES

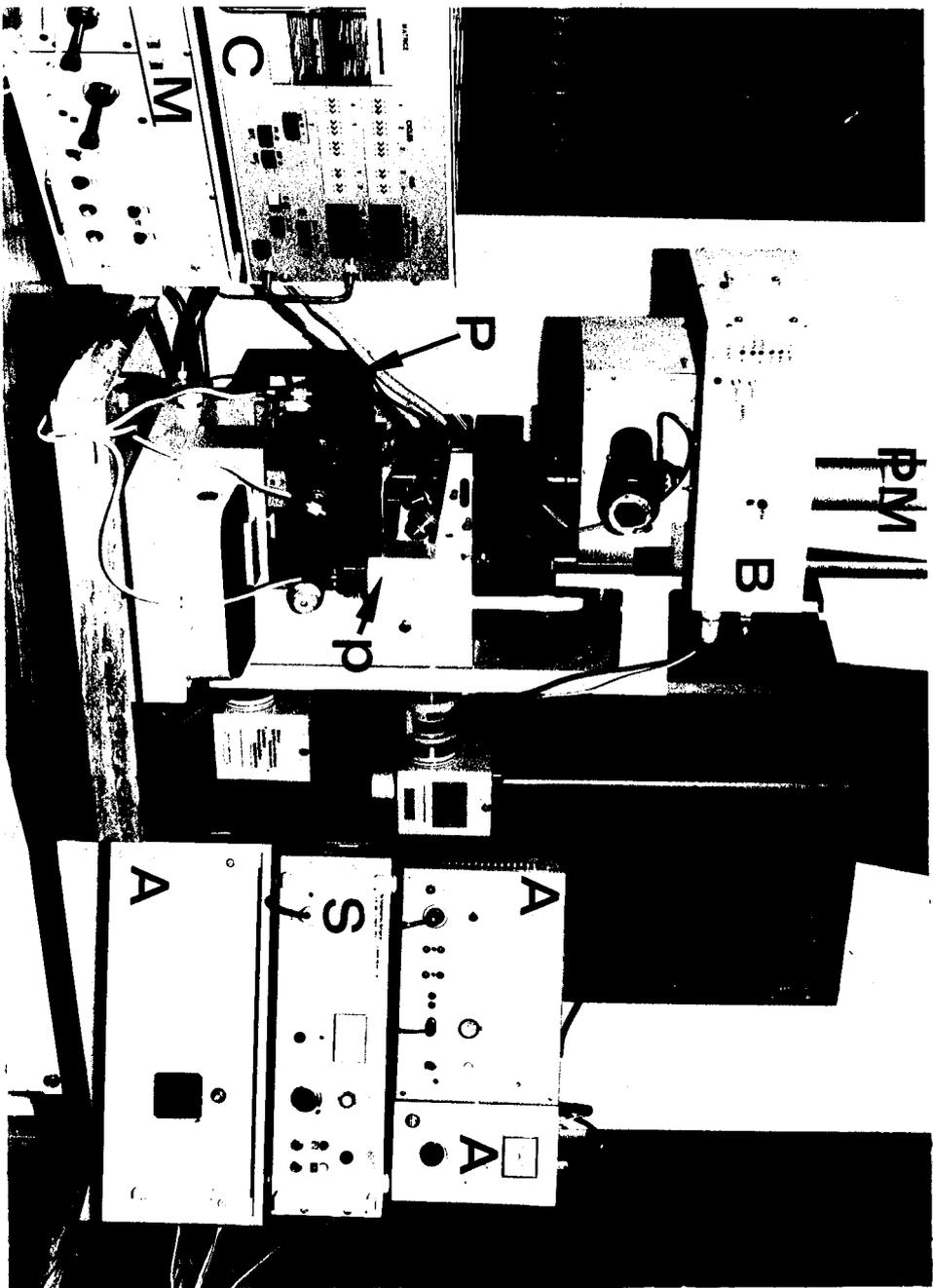
SYSTÈME D'ANALYSE MICROPHOTOMÉTRIQUE À BALAYAGE

Le S.A.M.B. comporte (Figure 1) :

- un microphotomètre LEITZ MPV 1 équipé de deux platines motorisées déplaçant la préparation, l'une par pas de $0,5 \mu\text{m}$, et l'autre par pas de $10 \mu\text{m}$;
- un module de balayage de l'image fournie par le microscope et commandant la conversion analogique-numérique du signal photométrique ;
- un module de commande programmable pilotant les platines motorisées et contrôlant la conversion analogique-numérique.

Module de balayage

Le balayage de l'image intermédiaire, donnée par l'objectif du microscope, est réalisé par la rotation d'un disque de Nipkow à 1 ou 2 tours par seconde. La couronne périphérique de ce disque est perforée de 43 orifices carrés, ou diaphragmes de mesure, de $0,25 \text{ mm}$ de côté, décalés les uns par rapport aux autres de $0,25 \text{ mm}$ radialement et $0,117 \text{ rd}$ angulairement. Pendant la rotation du disque, les diaphragmes de mesure passent tangentiellement les uns aux autres dans une fenêtre de $10,75 \text{ mm} \times 11,25 \text{ mm}$ située dans le plan de l'image intermédiaire du microscope (Figure 2). En raison du décalage angulaire, un seul diaphragme est présent à la fois dans la fenêtre qui est ainsi balayée en 1 s ou $0,5 \text{ s}$ par les 43 diaphragmes. Le diamètre moyen de la spirale selon laquelle sont distribués les diaphragmes est de 230 mm de sorte que la trajectoire de chacun d'eux dans la fenêtre peut être assimilée à une droite avec une distorsion inférieure à 50% de leur dimension. Les diaphragmes sont distribués sur le disque dans un angle de 270° si bien qu'un secteur de 90° est aveugle. Le grossissement de l'image au niveau du disque étant de $380 \times$ ou $950 \times$ selon l'optique utilisée, le pouvoir de résolution du balayage est respectivement de $0,66 \mu\text{m}$ ou $0,26 \mu\text{m}$ pour un champ balayé de $28,3 \mu\text{m} \times 29,6 \mu\text{m}$ ou $11,3 \mu\text{m} \times 11,8 \mu\text{m}$.



L'intensité de lumière reçue par le photomultiplicateur pendant la rotation du disque donne lieu à un signal périodique qui s'annule pendant l'obturation séparant le passage de deux diaphragmes successifs et s'annule plus longuement pendant le passage du secteur aveugle.

Commande de conversion analogique-numérique

Le traitement de l'image nécessite un échantillonnage du signal photométrique pour chaque ligne de façon à ne retenir que les valeurs correspondant aux positions adjacentes successives de chaque diaphragme dans la ligne qu'il balaye. Le temps mis par un diaphragme pour se déplacer de sa propre dimension est d'autant plus long, à vitesse angulaire constante, qu'il est plus près du centre du disque. Il est donc erroné d'échantillonner le signal photométrique à fréquence constante comme cela est pratiqué dans les microphotomètres à balayage par disque de Nipkow déjà décrits (SAWYER et BOSTROM, 1958 ; MAYALL et MENDELSON, 1970). Dans le S.A.M.B., une piste optique, solidaire du disque et lue par un système opto-électronique précis distribue des signaux asynchrones commandant la conversion analogique-numérique à une fréquence adaptée à chaque ligne de balayage. Ainsi, l'erreur systématique liée à la géométrie du disque de Nipkow et l'erreur aléatoire due à d'éventuelles variations de la vitesse du balayage, sont évitées. Par ce procédé, le champ balayé par le disque est découpé en 1935 valeurs photométriques correspondant à autant d'éléments adjacents de l'image de la préparation microscopique.

Module de commande

Le module de commande est une unité électronique programmable organisée autour d'un microprocesseur qui a pour principales fonctions de piloter les platines du microscope et de contrôler l'échantillonnage du signal photométrique.

Pilotage des platines : le disque de Nipkow comporte une piste optique et un système opto-électronique signalant au module de commande le début et la fin du passage du secteur aveugle séparant 2 balayages successifs. Par programme, et à la réception du signal de début de secteur aveugle, le module de commande ordonne le

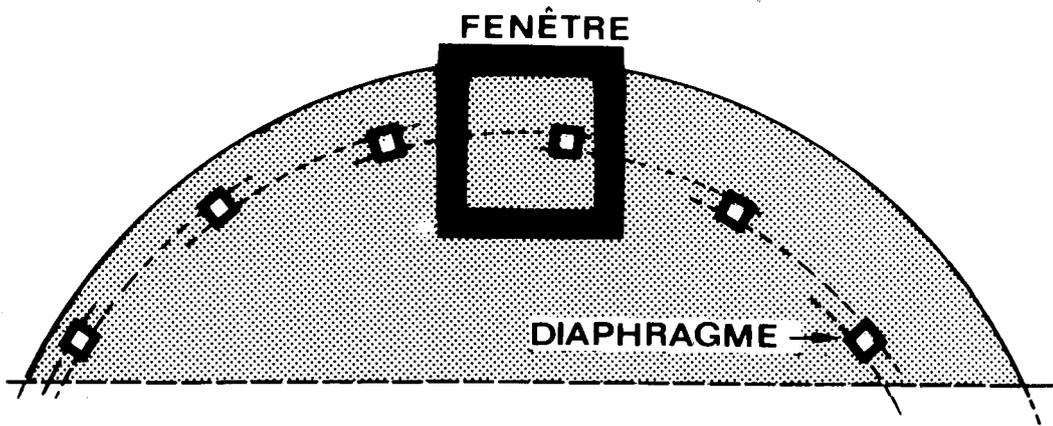


Figure 2 - Système de balayage du S.A.M.B. a : schéma du disque de Nipkow. b : image du balayage de la préparation par le disque de Nipkow ; b : ligne de balayage correspondant au passage d'un diaphragme. N : noyau cellulaire (1 800 x).

déplacement des platines motorisées de façon à amener dans la fenêtre balayée par le disque un nouveau champ de la préparation. Par programme, les champs successifs balayés peuvent être ou non adjacents et chaque champ peut être balayé plusieurs fois consécutives. Par un tel procédé, toute une lame histologique peut être explorée automatiquement en un temps qui varie selon le grossissement de l'objectif utilisé.

Contrôle de l'échantillonnage : cette fonction du module de commande permet de ne valider les signaux de commande de conversion analogique-numérique distribués par le système opto-électronique asservi du disque que lorsque les platines motorisées ont terminé leur déplacement. Pour de grandes distances, celui-ci peut en effet excéder en durée le temps de passage du secteur aveugle devant la fenêtre de balayage.

Le S.A.M.B. peut être couplé directement à un enregistreur analogique, ou par l'intermédiaire d'un convertisseur analogique-numérique, à un enregistreur numérique ou à un ordinateur pour le traitement des données en temps réel.

PRÉPARATION HISTOLOGIQUE

Le S.A.M.B. a été appliqué à la reconnaissance des mitoses et des phases du cycle mitotique dans une population de cellules nerveuses embryonnaires du télencéphale de l'Amphibien Urodèle Pleurodeles waltlii Michah.. Ce tissu a été choisi parce que les paramètres de la prolifération de ses cellules dans diverses conditions expérimentales ont été préalablement étudiés notamment par les méthodes autoradiographiques (CHIBON, 1968 ; BRUGAL, 1971 a ; 1971 b). Afin d'être soumis à l'analyse automatique, le télencéphale d'embryons au stade 34 (GALLIEN et DUROCHER, 1957) a été prélevé, fixé dans le liquide de SMITH puis écrasé entre lame et lamelle. Les préparations obtenues ont été colorées par le réactif de FEULGEN (45 mn, 20° C) après une hydrolyse dans HCl 6N (60 mn, 20° C) puis montées dans l'Euparal (n = 1,535).

TRAITEMENT DES DONNÉES

Les mesures microphotométriques ont été réalisées à 543 ± 10 nm en lumière transmise avec une lampe quartz-iode 60 W, un condenseur 50 x (ouverture 0,80) et un objectif fluorine 95 x à immersion à

huile (ouverture 1,32). Les images ont été balayées à 2 KHz avec une résolution de 0,66 μm . Le signal photométrique a été enregistré sur bande magnétique analogique AMPEX, converti en 512 points pour la gamme 0 à 1 unité de densité optique et traité à l'aide d'un ordinateur IBM 360/67.

Transformations : signal - transmission - densité optique

Selon les lois de LAMBERT et BEER, la transmission (T) est définie par le rapport :

$$T = I/I_0$$

dans lequel I_0 est l'intensité de lumière incidente et I l'intensité de lumière émergeant de l'échantillon. Dans le S.A.M.B., l'intensité de lumière (I_m) mesurée sur l'échantillon est donnée par la relation :

$$(1) \quad I_m = I \cdot B + C$$

dans laquelle B et C sont des constantes introduites par le couplage d'un amplificateur linéaire au photomultiplicateur. De la même façon, l'intensité de lumière incidente (I_b), mesurée hors de l'échantillon est donnée par la relation :

$$(2) \quad I_b = I_0 \cdot B + C$$

Si la lumière incidente est entièrement absorbée par l'objet, l'obscurité qui en résulte donne lieu à une valeur I_n définie par la relation :

$$(3) \quad I_n = 0 \cdot B + C = C$$

pour un gain donné de l'amplificateur.

La résolution des équations (1), (2) et (3) permet de calculer la transmission (T) caractérisant l'échantillon :

$$(4) \quad T = \frac{I_m - I_n}{I_b - I_n}$$

La densité optique étant donnée par la relation :

$$(5) \quad E = \text{Log} \left[\frac{I_b - I_n}{I_m - I_n} \right]$$

La valeur I_b mesurée hors de l'échantillon n'est pas identique en tous points extérieurs à l'échantillon à cause des inhomogénéités inévitables de l'éclairage, du verre de la lame histologique, du couvre objet et du milieu de montage. Pour cette raison, la

valeur I_b a été calculée à tout moment du balayage de façon à ce que les valeurs photométriques obtenues sur les noyaux cellulaires rencontrés soient rapportées aux valeurs du fond topographiquement les plus proches.

Les valeurs successives de T sont comparées à une valeur T_s , ou seuil, de sorte que toute valeur $T \leq T_s$ est définie comme appartenant à un noyau cellulaire et toute valeur $T > T_s$ est définie comme appartenant au fond.

Algorithmes de traitement

Les préparations histologiques ont été explorées par champs successifs selon le schéma de la figure 3. Chaque champ est balayé par NLRL lignes de NCRC points de mesures et, par déplacement de la préparation à l'aide des platines motorisées, les champs successifs sont explorés en NTC bandes de NTL champs. Selon l'ampleur du recouvrement programmé entre deux champs successifs, les paramètres du balayage sont :

$$\text{NCRC} \leq 45$$

$$\text{NLRL} \leq 43$$

NTC et NTL sont des nombres variables selon la surface de préparation explorée dans les limites de déplacement des platines motorisées (20 mm x 20 mm).

Le traitement a consisté à définir, pour chaque noyau cellulaire rencontré au cours du balayage, les paramètres suivants :

- Surface (S) ou nombre de points appartenant au noyau ;
- Périmètre (P) ou nombre de points constituant la frontière entre le fond et le noyau ;
- Densité optique intégrée (D) ou somme des valeurs de E (relation 5) mesurées sur les points appartenant au noyau ;
- Densité optique minimale (Dm) ou plus petite valeur de E rencontrée sur les points du noyau autres que les points de la frontière ;
- Densité optique maximale (DM) ou plus grande valeur de E rencontrée sur les points du noyau.

A partir de ces paramètres deux indices ont été calculés : un indice de courbure ($C = P^2/S$) qui est d'autant plus élevé que les contours d'un noyau sont plus irréguliers ; un indice de contraste ($K = DM/Dm$) qui est d'autant plus élevé que l'hétérogénéité de répartition de la chromatine d'un noyau est plus grande.

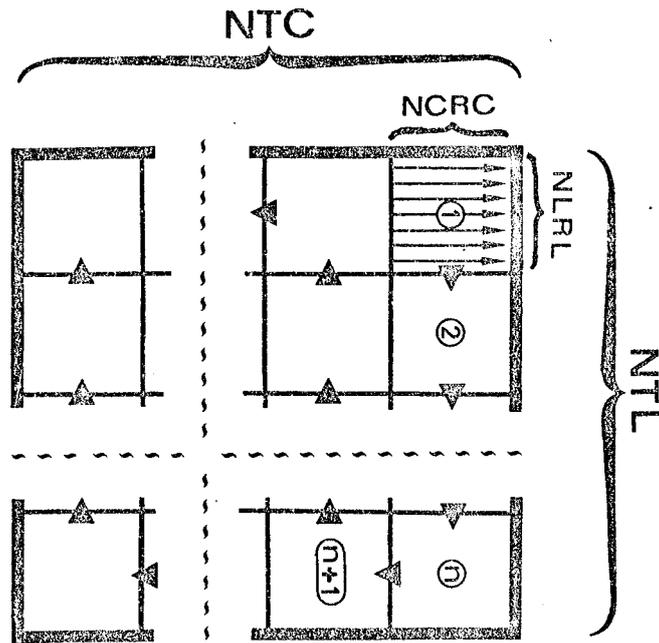


Figure 3 - Mode d'exploration d'une lame histologique par balayage de champs successifs. NTL : nombre de champs par bande ; NTC : nombre de bandes ; NLRL : nombre de lignes par champ ; NCRC : nombre de points de mesure adjacents par ligne de balayage.

Des algorithmes fondés sur l'utilisation d'automates d'états finis (SELKOW, 1972) ont été choisis afin de calculer ces paramètres sans stocker, dans l'unité centrale de l'ordinateur, l'ensemble des données photométriques obtenues sur la portion explorée de la lame. Les NTL champs orthogonaux aux lignes de balayage sont parcourus à l'aide d'un "buffer" composé de NCRC automates d'états finis. Ainsi, une boucle de l'algorithme consiste successivement à lire NCRC valeurs photométriques, actualiser la valeur I_b du fond et modifier l'état de chaque automate selon la valeur de la fonction image en chaque point et selon son état et celui des automates voisins.

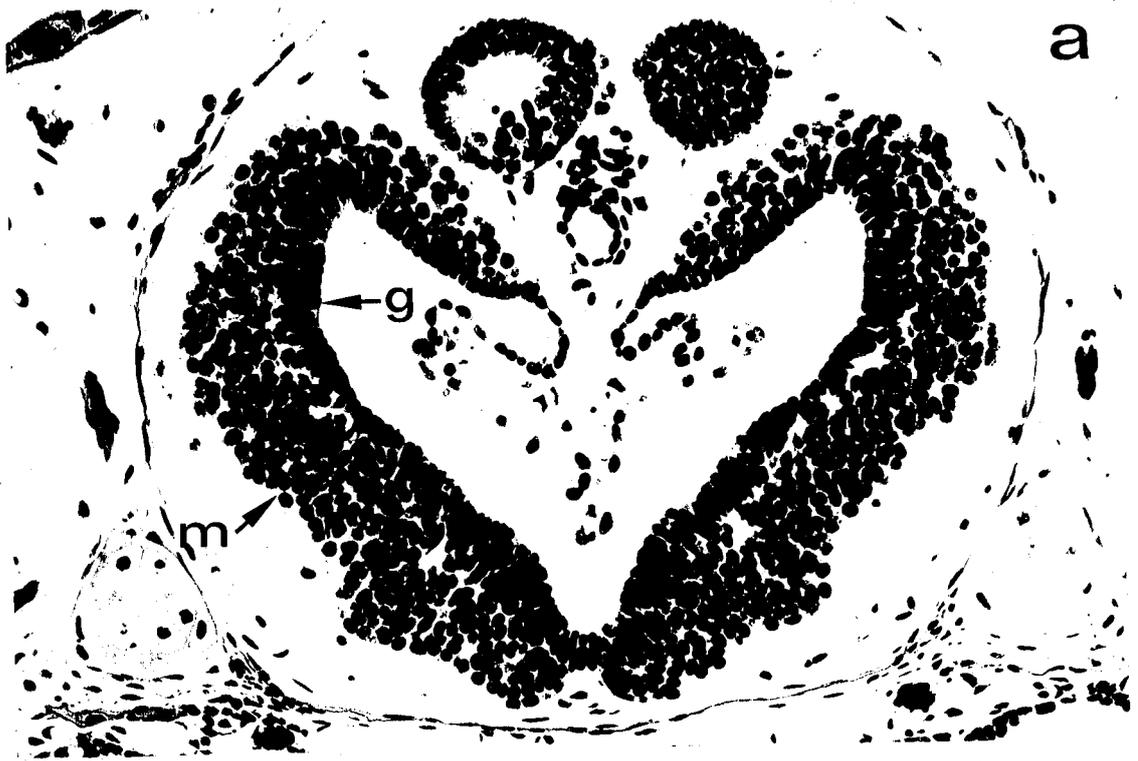
La jonction entre deux séries successives de NTL champs s'effectue également à l'aide d'un "buffer" composé de NTL x NLRL automates d'états finis.

Contrôle des mesures de densité optique

La validité des densités optiques (D) mesurées par la microphotométrie à balayage a été vérifiée par des mesures effectuées manuellement par la méthode des deux longueurs d'onde (PATAU, 1952). Dans ce but, le disque de balayage du S.A.M.B. a été remplacé par un diaphragme variable, toutes les conditions optiques restant par ailleurs inchangées. Les mesures de la densité optique des noyaux cellulaires ont été effectuées à 560 nm et 510 nm. Ces longueurs d'onde ont été choisies graphiquement à partir du spectre d'absorption de l'ADN coloré par la réaction de FEULGEN. La quantité d'ADN par noyau, exprimée en unités arbitraires, a été déterminée par les tables de MENDELSON (1958) et représente la moyenne de 3 mesures par noyau.

Figure 4 - a- coupe histologique dans le télencéphale d'embryon de pleurodèle ; m : manteau ; g : couche germinative ou épendymaire. Coloration par l'hémalun, la phloxine et le bleu alcian (120 x).

b- écrasement de télencéphale d'embryon de pleurodèle. Coloration par la réaction de FEULGEN (350 x).



RESULTATS

CYCLE MITOTIQUE DES CELLULES NERVEUSES EMBRYONNAIRES

Dans le télencéphale de l'embryon de pleurodèle, comme dans l'encéphale de tous les Vertébrés embryonnaires, les cellules nerveuses constituent un épithélium pseudo-stratifié présentant une couche externe, ou manteau, pauvre en noyaux cellulaires et une couche interne, dite épendymaire ou germinative, qui présente une forte densité en noyaux et borde la lumière du système nerveux (Figure 4 a). Le cycle cellulaire dans cet organe s'accompagne, chez le pleurodèle (BRUGAL, 1971 b), comme chez tous les Vertébrés (SAUER et WALKER, 1959 ; KAUFFMAN, 1966 ; SMART, 1972), d'une migration des noyaux dans l'épaisseur de l'épithélium. Les noyaux des cellules en phase G_1 ou G_0 sont sphériques et disposés dans le manteau ; par contre, dès le début de la phase S la contraction des cellules amène les noyaux vers la base de l'épithélium. Au cours de cette migration, les noyaux sont tassés les uns contre les autres et s'allongent à mesure qu'ils augmentent de taille. Lorsque la synthèse d'ADN est achevée, les noyaux en phase G_2 occupent la base des cellules nerveuses où ils redeviennent sphériques avant de se diviser pour donner naissance à deux noyaux en phase G_1 qui migrent à nouveau vers le manteau. L'excision du télencéphale des embryons de pleurodèle permet de confectionner des écrasements de cet organe (Figure 4 b). Ces préparations facilitent les mesures microphotométriques et l'analyse morphologique des noyaux cellulaires.

RECONSTITUTION DE L'IMAGE EXPLORÉE

La figure 5 présente la sortie graphique d'un traceur BENSON 411 couplé à l'ordinateur de traitement. Le tracé obtenu représente la reconstitution de l'image correspondant à 20 champs balayés successivement par le disque selon le schéma de la figure 3. La figure 5 montre que les éléments de l'image balayée sont correctement connectés. Ce résultat garantit la validité de l'algorithme de reconstitution d'image en particulier dans le cas des noyaux cellulaires qui chevauchent plusieurs champs adjacents.

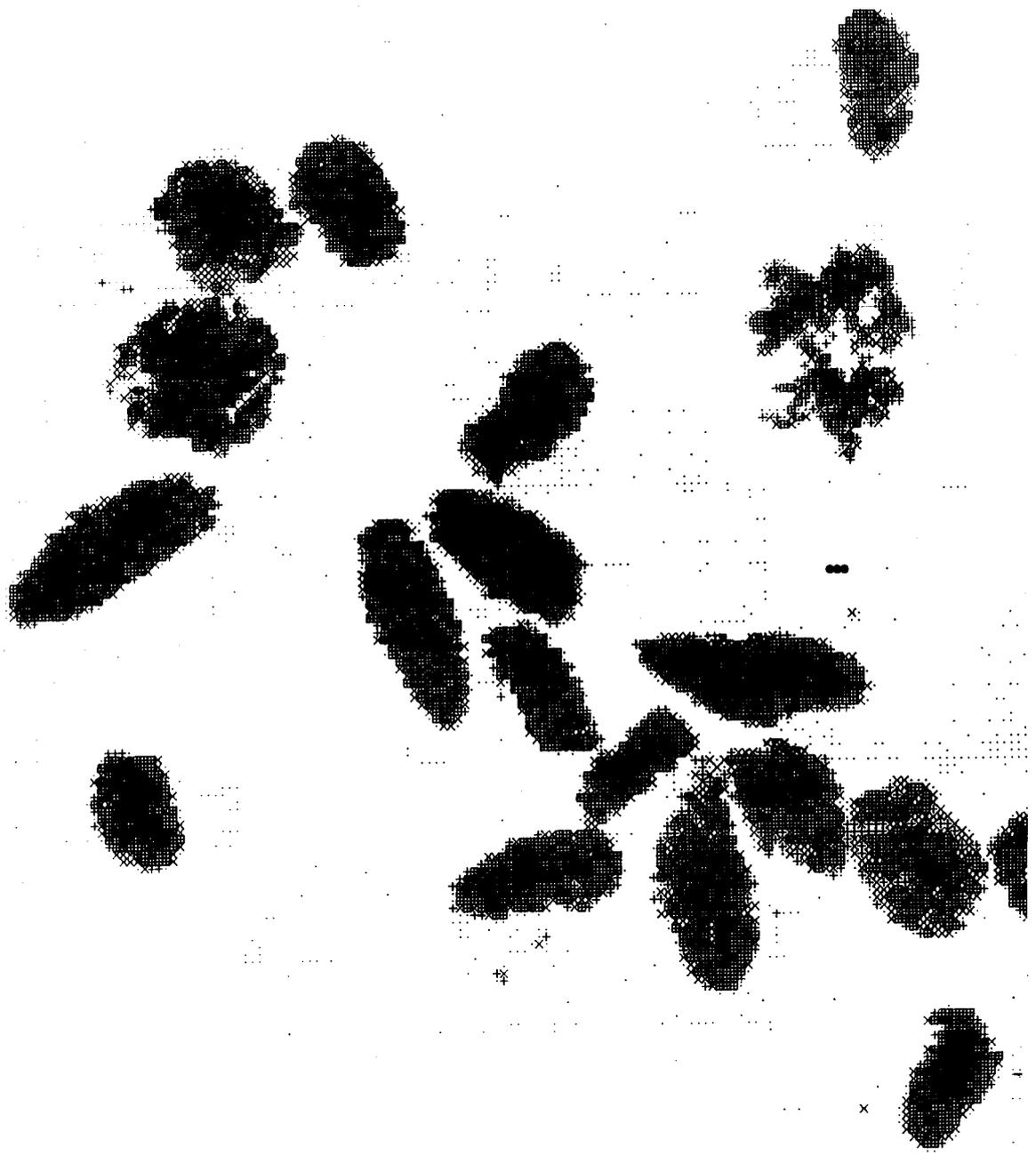


Figure 5 - Sortie graphique d'un traceur BENSON 411 couplé à l'ordinateur de traitement et représentant la reconstitution de 20 champs balayés successivement par le disque. La valeur de densité optique de chaque point de mesure est traduite par des signes (• + × ■ ●) formant des ensembles d'autant plus sombres que la densité optique est plus forte.

TABLEAU I - Comparaison entre les mesures de la quantité d'ADN (unités arbitraires) de noyaux cellulaires, effectuées par la méthode des deux longueurs d'onde (A) et la méthode du balayage (B). Les valeurs soulignées concernent des noyaux cellulaires qui chevauchaient deux champs de balayage.

A	B	A/B	$\Delta\%$:	A	B	A/B	$\Delta\%$
137	48,6	2,818	- 1,63	:	221	77,8	2,841	- 0,80
151	53,5	2,822	- 1,47	:	226	<u>70,5</u>	3,206	+ 11,94*
138	<u>48,8</u>	2,828	- 1,26	:	251	<u>88,8</u>	2,827	- 1,29
152	<u>53,7</u>	2,831	- 1,15	:	170	60,3	2,819	- 1,57
126	44,4	2,838	- 0,90	:	174	<u>61,6</u>	2,825	- 1,36
157	<u>54,2</u>	2,897	+ 1,15	:	136	48	2,833	- 1,08
124	43,9	2,825	- 1,36	:	112	38,9	2,879	+ 0,52
126	44,6	2,825	- 1,36	:	147	<u>52,4</u>	2,805	- 2,06
267	<u>92,1</u>	2,899	+ 1,22	:	153	<u>52,9</u>	2,892	+ 0,98
133	<u>45,4</u>	2,930	+ 2,30	:	214	<u>75,5</u>	2,834	- 1,06

moyenne A/B = 2,864 ; $\sigma = 0,088$

*résultat exclu.

TABLEAU II - Conditions relatives aux paramètres D (densité optique intégrée), K (indice de contraste), C (indice de courbure) et Dm (Densité optique minimale) d'un noyau cellulaire pour permettre d'identifier la phase du cycle mitotique dans laquelle il se trouve.

<u>CONDITIONS</u>		<u>DIAGNOSTIC</u>
D \leq 35	-----	noyau incomplet
35 < D \leq 55	K \geq 3 -----	phase G ₁
	K < 3 -----	phase G ₀
55 < D \leq 90	K \leq 3 -----	phase S
	K > 3 -- C \geq 30 -- Dm \leq 0,120 -	phase M
90 < D \leq 120	K > 3 -- C \geq 30 -- Dm \leq 0,120 -	phase M
	2 \leq K \leq 4 C < 30 -----	phase G ₂
120 > D	-----	noyaux accolés

DOSAGE DE L'ADN

Les résultats des dosages de l'ADN de noyaux cellulaires par la méthode des deux longueurs d'onde et par la méthode du balayage, sont portés dans le tableau I. Les quantités d'ADN évaluées par ces deux méthodes et exprimées en unités arbitraires sont dans un rapport de 2,864 ($\sigma = 0,088$). La déviation des mesures par rapport à la moyenne (Δ %) est comprise, selon les noyaux, entre -2,06 % et +2,30 % et ne paraît pas dépendre de la quantité d'ADN par noyau ; cette déviation n'est en outre pas plus élevée pour les noyaux qui chevauchent deux champs balayés successivement par le disque que pour les noyaux entièrement compris dans un champ. La déviation par rapport à la moyenne ne semble donc dépendre que d'erreurs stochastiques introduites par les deux méthodes de mesures. Le bon accord entre les mesures obtenues par la méthode du balayage par champs successifs et par celle des deux longueurs d'onde confirme la validité du processus de reconstitution des images.

CARACTÉRISATION DES MITOSES

Comme le montre les figures 4 b et 5, la mitose se caractérise par des contours plus irréguliers que ceux des noyaux interphasiques et par la condensation de la chromatine en chromosomes qui laissent apparaître des vides non absorbants à l'intérieur de la figure qu'ils constituent. Pour ces raisons, la mitose présente à la fois un indice de courbure (C) élevé et des valeurs minimales de densité optique (D_m) sur des points intérieurs. La figure 6 présente la distribution de 80 noyaux cellulaires télencéphaliques en fonction de leurs paramètres C et D_m . Dans cette population 4 noyaux cellulaires se distinguent de tous les autres par un indice de courbure $C > 30$ et une densité optique minimale $D_m < 0,15$. L'observation de ces noyaux a confirmé qu'ils sont en métaphase de la mitose et qu'ils sont les seuls dans cet état parmi la population étudiée.

RECONNAISSANCE DES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE

Les noyaux d'une population cellulaire télencéphalique ont été classés, par un observateur, en 7 catégories qui sont : les

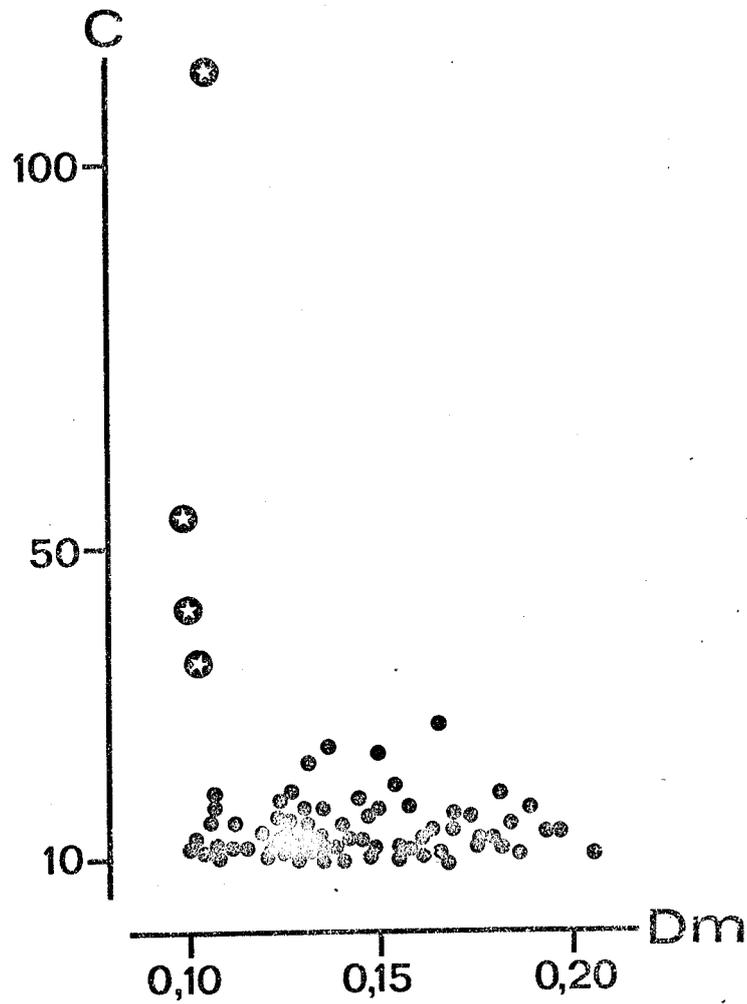


Figure 6 - Distribution des cellules télencéphaliques embryonnaires en fonction de leur indice de courbure (C) et de leur valeur minimale de densité optique (Dm). Les mitoses (⊛) se distinguent très nettement des cellules quiescentes (•) par leur position dans le graphique.

noyaux allongés, les grands noyaux ronds (diamètre $>10 \mu\text{m}$), les petits noyaux ronds (diamètre $\leq 10 \mu\text{m}$), les noyaux en prophase (chromatine condensée en filaments), les noyaux en métaphase et début d'anaphase, les noyaux en télophase et les noyaux divers qui ne se classent pas clairement dans l'une des catégories précédentes. La même population de noyaux cellulaires préalablement repérés individuellement, a été analysée à l'aide du S.A.M.B. et les noyaux ont été caractérisés par leur densité optique totale (D) et leur indice de contraste (K). Les résultats obtenus par l'observateur et par l'analyse microphotométrique sont superposés dans la figure 7 et permettent de comprendre l'évolution caryologique des cellules télencéphaliques au cours du cycle mitotique. Parmi les noyaux cellulaires les plus contrastés ($3,4 \leq K \leq 4$), deux groupes de noyaux sont très distinctement séparés : l'un comporte 3 noyaux cellulaires dont la densité optique est $80 \leq D \leq 90$ et qui sont reconnus comme des métaphases par l'observateur ; l'autre comporte 4 noyaux dont la densité optique est $40 \leq D \leq 55$ et qui sont reconnus comme des téléphases par l'observateur. Aucune autre métaphase, ou télophase, n'a été reconnue par l'observateur parmi les autres cellules de la population étudiée. La distinction particulièrement nette entre les métaphases et les téléphases, tant par l'observateur que par la distribution en fonction des paramètres D et K, est due à ce que l'anaphase qui sépare ces deux états réduit très rapidement la quantité d'ADN du noyau de la valeur tétraploïde à la valeur diploïde. Cette dernière correspond donc à une densité optique $D \leq 55$. Le lot des noyaux en télophase ne se distingue pas nettement du groupe des petits noyaux ronds reconnus par l'observateur et présentant la même densité optique mais un indice de contraste plus faible ($3 \leq K < 3,4$). Ces derniers ont donc, comme les téléphases, une quantité d'ADN correspondant au taux diploïde mais une chromatine un peu moins condensée.

Les coordonnées $D = 55$ et $K = 3$ définissent un point remarquable de la figure 7 au niveau duquel confluent 3 groupes de noyaux qui sont :

- le groupe des noyaux diploïdes (téléphases et petits noyaux ronds caractérisés par $K \gg 3$) ;

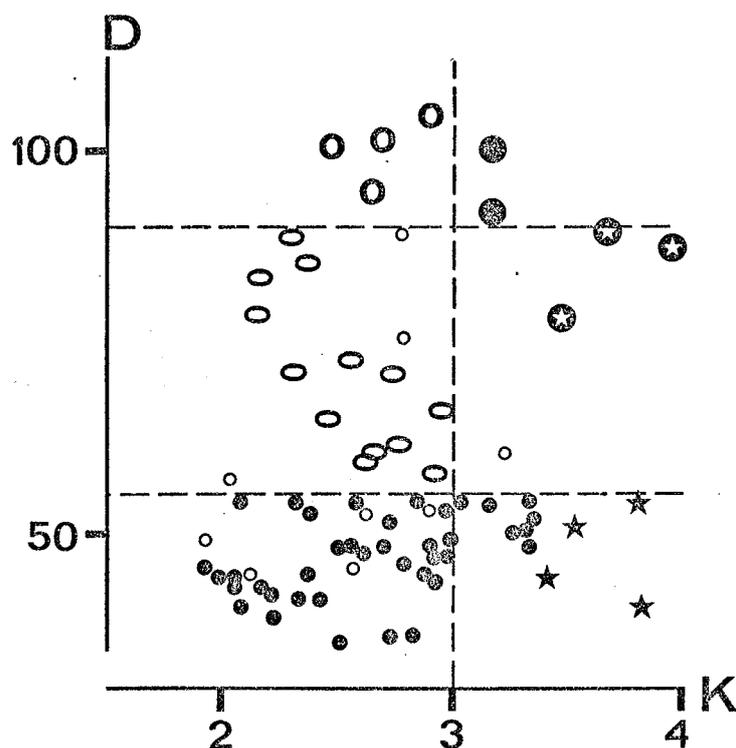


Figure 7 - Distribution des cellules télencéphaliques embryonnaires en fonction de leur densité optique (D) et de leur indice de contraste (K). Les noyaux cellulaires analysés par le S.A.M.B. ont été classés par un observateur en 7 catégories qui sont : les noyaux en télophase (★) ; les petits noyaux ronds (•) ; les noyaux allongés (○) ; les grands noyaux ronds (⊙) ; les noyaux en prophase (⊗) ; les noyaux en métaphase (⊕) et les noyaux divers (◦).

- le groupe des petits noyaux ronds et de certains noyaux divers caractérisés par un indice de contraste $K < 3$ et une densité optique faible caractérisant l'état diploïde ;

- le groupe des noyaux allongés dont la densité optique est supérieure à celle des noyaux précédents pour un indice de contraste $K < 3$. La densité optique la plus élevée rencontrée parmi les noyaux allongés ($D = 90$) est double de la valeur moyenne ($D = 45$) rencontrée parmi les petits noyaux ronds. Il semble donc que les noyaux allongés soient en phase de synthèse d'ADN.

Parmi les noyaux dont la densité optique est $D \geq 90$ l'observateur distingue les grands noyaux ronds tous caractérisés par un indice de contraste $K < 3$, et les noyaux en prophase tous caractérisés par un indice de contraste $K > 3$. L'augmentation de l'indice de contraste parmi ces noyaux qui ont une densité optique $90 \leq D \leq 110$ correspondant au taux tétraploïde d'ADN, traduit évidemment la condensation de la chromatine préalable à la mitose. Tous ces noyaux sont donc en phase G_2 du cycle cellulaire.

A la lumière du classement de l'observateur et de la distribution particulière des noyaux en fonction des paramètres D et K , l'évolution caryologique des cellules télencéphaliques au cours du cycle mitotique apparaît clairement et a été résumée dans la figure 8. Dès la séparation des lots chromosomiques à l'anaphase, les noyaux deviennent diploïdes et entrent en phase G_1 . Au cours de cette phase, la chromatine se décondense progressivement jusqu'au moment où deux possibilités se manifestent :

- soit la synthèse de l'ADN commence : le noyau entre en phase S et s'engage vers une nouvelle division ;

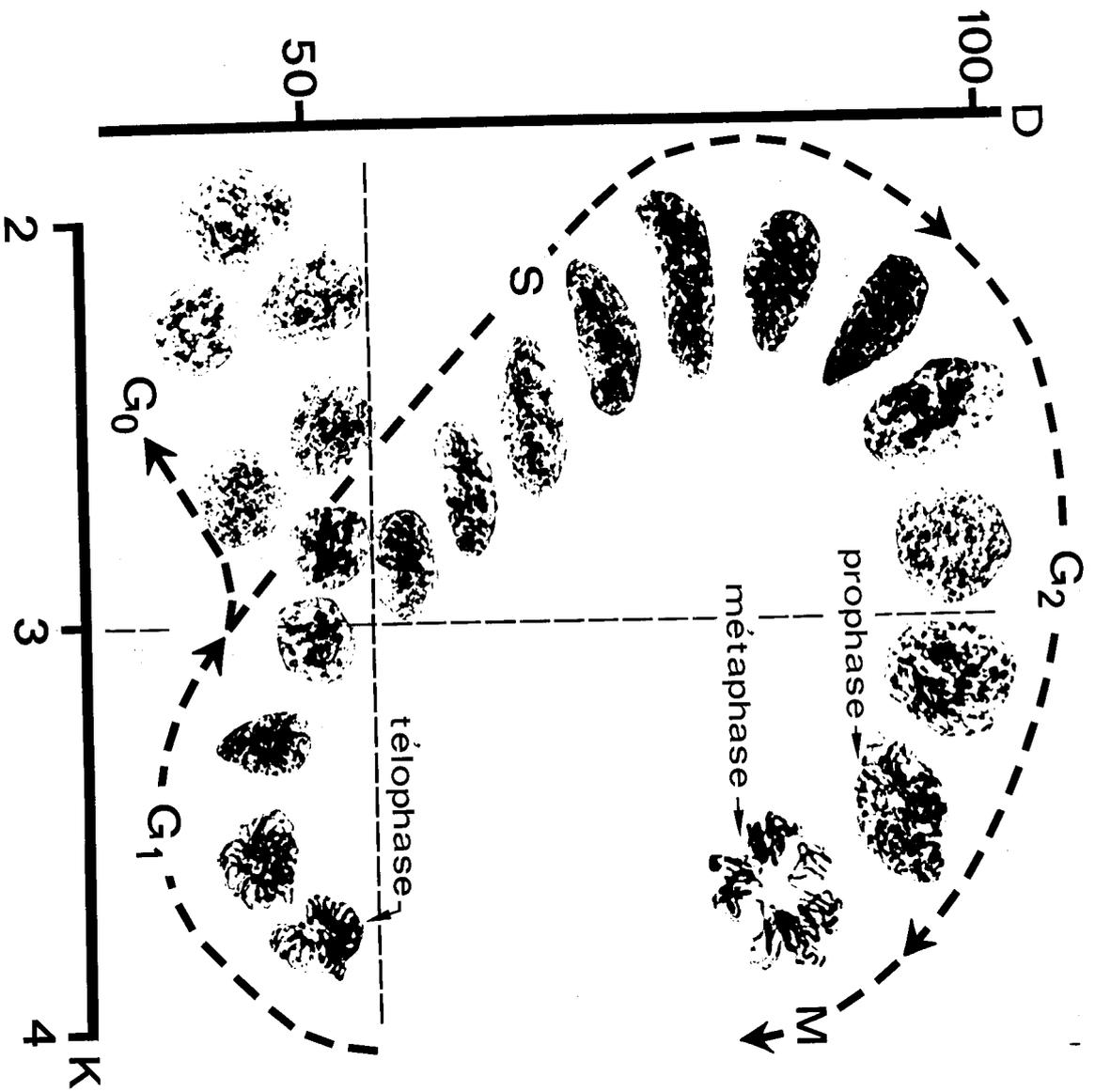
- soit la chromatine continue à se décondenser et aucune synthèse d'ADN ne se produit : le noyau sort du cycle mitotique et entre dans une phase dite G_0 (sensu largo) dont la durée est indéfinie.

C'est au cours de cette phase que la différenciation cellulaire se manifeste et transforme la cellule embryonnaire télencéphalique en neurone. Les noyaux cellulaires en phase S ont une chromatine dont l'hétérogénéité diminue au cours de la synthèse d'ADN jusqu'au moment où, l'état tétraploïde étant atteint, la chromatine se condense à nouveau. Les noyaux entrent alors en phase G_2 qui s'achève par la prophase et l'individualisation des chromosomes. La condensation alors extrême de la chromatine est responsable

d'une erreur photométrique négative et systématique qui explique que la densité optique mesurée sur les métaphases est de 15 % environ plus faible que la densité optique mesurée sur les noyaux en phase G_2 . Une telle erreur, déjà signalée (BRUGAL et PELMONT, 1975), s'explique par le fait que la linéarité postulée par les lois de LAMBERT et BEER n'est plus respectée pour des densités optiques ponctuelles élevées et que l'erreur de mesure photométrique liée à la distribution hétérogène du matériel absorbant (PATAU, 1952) est alors maximale. Le cycle cellulaire s'achève par une anaphase certainement très rapide puisque cette phase de la mitose ne se rencontre que très rarement parmi la population cellulaire étudiée.

Les figures 6 et 7 permettent de calculer graphiquement les paramètres suffisant à la construction d'un algorithme de reconnaissance des phases du cycle cellulaire. Les valeurs de ces paramètres et le diagnostic correspondant sont donnés dans le tableau II. Une analyse automatique fondée sur l'utilisation de ces paramètres a été réalisée sur 74 noyaux cellulaires télencéphaliques ; elle a permis de reconnaître parmi ceux-ci : 11 noyaux en phase G_1 , 15 en phase S, 6 en phase G_2 , 3 en phase M et 37 en phase G_0 ; 2 noyaux n'ont pas été classés dans les catégories ci-dessus. Ces résultats sont en accord avec les paramètres de la prolifération cellulaire télencéphalique de l'embryon de pleurodèle étudiés par les méthodes autoradiographiques (BRUGAL, 1971 a ; 1971 b) ; néanmoins une étude portant sur un plus grand nombre de cellules doit être réalisée pour confirmer ces conclusions.

Figure 8 - Evolution de la morphologie et de la texture des noyaux cellulaires télencéphaliques au cours du cycle mitotique. Les noyaux cellulaires représentés (1 500 x) ont été placés dans les coordonnées D (densité optique) et K (indice de contraste) en fonction des valeurs de ces paramètres mesurés sur eux par le S.A.M.B.



DISCUSSION

Le disque de Nipkow utilisé dans le S.A.M.B. est certainement le dispositif de balayage le plus simple qu'il est possible d'associer à un photomultiplicateur. Ce disque peut être interposé entre la source lumineuse et la préparation microscopique comme dans l'appareil de JANSEN (1961) ou entre la préparation et le photomultiplicateur comme dans le cytoanalyseur de SAWYER et BOSTROM (1958), le système CYDAC de MAYALL et MENDELSON (1970) ou le S.A.M.B.. Dans la première configuration, la nécessité de focaliser parfaitement l'image de très petits diaphragmes de champ impose l'utilisation d'un condenseur à grande ouverture numérique ($N.A \gg 1,2$) ; dans ces conditions les mesures sont affectées de multiples erreurs dues aux faisceaux lumineux à grand angle d'incidence qui, déviés du trajet optique principal, sont une source de lumière parasite (BRUGAL, 1976). La configuration adoptée dans le S.A.M.B. permet d'éviter ces erreurs puisque la grande taille du diaphragme de champ autorise l'utilisation d'un condenseur d'ouverture numérique moyenne ($N.A = 0,8$) grâce auquel les conditions d'éclairage de KOLHER sont maintenues dans des limites correctes au cours du déplacement de la lame histologique par les platines motorisées. Le disque de Nipkow placé au niveau de l'image intermédiaire donnée par l'objectif permet, en outre, d'effectuer des mesures photométriques par balayage dans toutes les méthodes de la microscopie (fond clair et fond noir en lumière transmise ; fluorométrie et autoradiographie en lumière incidente polarisée ou non). Le balayage réalisé par le disque est parfaitement reproductible dans sa géométrie et simplifie les problèmes de connexion ligne à ligne entre deux balayages successifs réalisés sur des champs adjacents ou se recouvrant partiellement. Ainsi toute une préparation histologique peut être explorée par champs successifs avec un pouvoir de résolution et un grossissement maxima sans perte d'information. Le pouvoir de résolution du balayage effectué par le disque de Nipkow est parfaitement défini et variable selon l'optique intermédiaire interposée entre l'objectif du microscope et les diaphragmes de mesure.

Malgré ses avantages considérables, le disque de Nipkow n'a pas supplanté le procédé du "flying spot" à cause de l'erreur que

sa géométrie introduit dans les mesures et en raison, également, des difficultés de fabrication. La mise au point, dans le S.A.M.B. d'un dispositif de commande asynchrone de la conversion analogique-numérique évite l'erreur due à la géométrie du disque et supprime l'erreur qui serait introduite dans les mesures par des variations, même très petites, de la vitesse du balayage (BRUGAL et al, 1976). En outre, les progrès récents de la photogravure et les nouveaux développements de la technologie des couches minces permettent actuellement la fabrication de disques de Nipkow précis, reproductibles et peu onéreux. Dans ces conditions, le disque de Nipkow associé à un photomultiplicateur ouvre des perspectives nouvelles pour la conception d'appareillages automatiques de cytodiagnostics.

Lorsqu'il est placé entre l'objectif et le photomultiplicateur, le disque de Nipkow impose une ouverture du diaphragme de champ au moins égale aux dimensions du champ balayé et par conséquent beaucoup plus grande que l'ouverture des diaphragmes de mesure. L'effet SCHWARZSCHILD-VILLIGER qui pourrait se manifester dans une telle situation conduirait à une sous-estimation de la densité optique d'autant plus grande que la densité optique est forte (BRUGAL, 1976). La comparaison entre les mesures effectuées par la méthode des deux longueurs d'ondes et les mesures réalisées par balayage (Tableau I) montre que la différence entre les résultats obtenus est indépendante de la densité optique ; en outre, la densité optique des noyaux cellulaires en phase G_2 et celle des noyaux en phase G_1 sont dans un rapport 2 : 1 conforme à la réalité. Ces résultats permettent de considérer comme négligeable l'effet SCHWARZSCHILD-VILLIGER sur les mesures effectuées par balayage. Cette observation s'explique certainement par le fait que la très petite ouverture des diaphragmes de mesure portés par le disque diminue considérablement la probabilité que des faisceaux lumineux déviés ("stray light" de ZIMMER, 1973) atteignent le photomultiplicateur.

L'étude de la fréquence des cellules d'une population en fonction de leur quantité d'ADN nucléaire a été préconisée par de nombreux auteurs pour établir la proportion de cellules dans les différentes phases du cycle mitotique et en déduire les paramètres de la cinétique de prolifération dans la population considérée. Les dosages microphotométriques de l'ADN sont de plus en plus pratiqués dans ce but et l'histogramme des fréquences obtenu a fait l'objet d'analyses récentes (GRAY, 1974). Les mesures densi-

tométriques ne permettent cependant pas, à elles seules, de caractériser les cellules en phase M et les cellules ayant cessé de parcourir le cycle mitotique (phase G_0 sensu largo).

La reconnaissance et le comptage des cellules en mitose sont encore actuellement réalisés par un observateur ; or, la proportion de cellules en phase M, ou indice mitotique, est l'un des paramètres les plus utilisés pour juger de l'activité mitotique d'une population. Les divers appareillages de reconnaissance automatique des mitoses décrits par LEDLEY (1972), GREEN et NEURATH (1974), LE GO et FAVIER (1976), sont spécialisés dans la détection des plaques métaphasiques préparées en vue de l'établissement du caryotype humain. De tels appareils sont en général reliés à des unités électroniques de traitement comportant des logiques figées qui ne peuvent pas être programmées pour reconnaître les métaphases telles qu'elles se présentent dans les tissus sans traitement préalable par la colchicine. En outre, le système d'acquisition de l'image de ces appareils comporte un capteur (caméra TV ou matrice de photodiodes) dont le petit nombre de niveaux ne permet pas d'obtenir des mesures densitométriques significatives sur les noyaux cellulaires interphasiques.

La reconnaissance et le comptage des cellules ayant cessé de parcourir le cycle mitotique (phase G_0 sensu largo) est également impossible par les méthodes microphotométriques puisque les noyaux cellulaires en phase G_0 contiennent, comme les noyaux en phase G_1 , un taux diploïde d'ADN. Seule la proportion $(1-P)$ des cellules en phase G_0 dans une population, déduite du coefficient de prolifération (P) , peut être calculée par des méthodes indirectes, longues et fastidieuses, fondées sur l'utilisation des précurseurs radioactifs de l'ADN. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus semblent montrer que les cellules télencéphaliques embryonnaires en phase G_0 peuvent être identifiées par leur densité optique et leur indice de contraste (K) . Cet indice est d'autant plus élevé que la chromatine des noyaux est plus hétérogène et présente des plages plus condensées ; inversement, il est d'autant plus faible que la chromatine est plus homogène et décondensée (Figures 7 et 8).

Depuis les travaux de FRENSTER (1969), la chromatine condensée est considérée comme du matériel génétique réprimé et inactif alors que la chromatine décondensée est interprétée comme du matériel génétique actif. Ainsi, le degré de condensation de la

chromatine traduirait l'intensité des activités nucléaires. Selon cette hypothèse, les petits noyaux circulaires, qui sont caractérisés par un taux diploïde d'ADN ainsi qu'un faible indice de contraste et sont interprétés comme des noyaux en phase G_0 , manifesteraient une activité génétique plus intense que les noyaux engagés dans le cycle mitotique (Figure 8). Cette conclusion s'accorde parfaitement avec le fait que les cellules qui quittent le cycle cellulaire au cours du développement embryonnaire expriment leurs potentialités génétiques en se différenciant. Des travaux sont en cours afin de confirmer ces conclusions sur un plus grand nombre de cellules et de contrôler le déroulement de la différenciation de chaque cellule par la mise en évidence cytochimique des synthèses spécifiques de l'état différencié.

BIBLIOGRAPHIE

- BRUGAL, G. : Etude autoradiographique de l'influence de la température sur la prolifération cellulaire chez les embryons âgés de Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibien, Urodèle). Wilhelm Roux'Archiv. 168, 205-225 (1971 a)
- BRUGAL, G. : Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires : étude autoradiographique chez les embryons et les jeunes larves de Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibien, Urodèle). Develop. Biol. 24, 301-321 (1971 b)
- BRUGAL, G. : Introduction à la microphotométrie. C. Reichert ed. (1976) (sous presse)
- BRUGAL, G., BOUTTAZ, R., CHASSERY, J.M. : Le S.A.M.B. : un nouveau système d'acquisition de l'image donnée par un microscope pour l'analyse morphométrique et densitométrique. Automatisme (1976) (sous presse)
- BRUGAL, G. , PELMONT, J. : Existence of two chalone-like substances in intestinal extract from the adult newt, inhibiting embryonic intestinal cell proliferation. Cell Tissue Kinet. 8, 171-187 (1975)
- CASPERSSON, T. : Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkernes. Scand. Arch. Physiol. 73, suppl. 8, 1-151 (1936)
- CASPERSSON, T. : A universal ultramicrospectrograph for the the optical range. Exptl. Cell Res. 1, 595 (1950)
- CASPERSSON, T., LOMAKKA, G. : Scanning microscopy techniques for high resolution quantitative cytochemistry. Ann. N. Y. Acad. Sci. 97, 449-457 (1962)

- CHIBON, P. : Etude au moyen de la thymidine tritiée de la durée des cycles mitotiques dans la jeune larve de Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibien, Urodèle). C. R. Acad. Sci. Paris, 267, 203-205 (1968)
- FRENSTER, J. H. : Biochemistry and molecular biophysics of heterochromatin and euchromatin. In : Handbook of molecular cytology. (A. LIMA DE FARIA ed.), p. 251-276. North Holland Publishing Co. Amsterdam. 1969
- GALLIEN, L., DUROCHER, M. : Table chronologique du développement de Pleurodeles waltlii. Bull. Biol. Fr. et Belg. 91, 97-114 (1957)
- GRAY, J. W. : Cell cycle analysis from computer synthesis of deoxyribonucleic acid histograms. J. Histochem. Cytochem. 22, 642-650 (1974)
- GRENN, D. K., NEURATH, P. W. : The design, operation and evaluation of high speed automatic metaphase finder. J. Histochem. Cytochem. 22, 531-535 (1974)
- JANSEN, M. T. : A simple scanning cytophotometer. Histochemie, 2, 342-347 (1961)
- KAUFFMAN, S. L. : An autoradiographic study of the generation cycle in the ten-days mouse embryo neural tube. Exp. Cell Res. 42, 67-69 (1966)
- LEDLEY, R. S. : Analysis of cells. I.E.E.E. Transaction on computers, 740-753 (1972)
- LE GO, R., FAVIER, C. : Présentation de l'Eidomat. C. R. table ronde : reconnaissance automatique des formes. Fontenay aux roses. 1976
- MATHERON, G. : Théorie des ensembles aléatoires. Cahiers Centre Morphologie Mathématique. Ecole des Mines. Paris, 4 (1969)

- MAYALL, B. H., MENDELSON, M. L. : Deoxyribonucleic acid cytophotometry of stained human leucocytes. II : The mechanical scanner of CYDAC, the theory of scanning photometry and the magnitude of residual errors. *J. Histochem. Cytochem.* 18, 383-407 (1970)
- MERTZ, P., GRAY, F. : A theory of scanning and its relation to the characteristics of the transmitted signal in telephotography and television. *Bell System Tech. J.* 13, 464-473 (1934)
- PATAU, K. : Absorption microphotometry of irregular-shaped objects. *Chromosoma*, 5, 341-362 (1952)
- SANDRITTER, W., KIEFER, G. : Methoden und Ergebnisse der Zytphotometrie und Interferenzmikroskopie. *Acta Histochem. Jena*, suppl. 6, 459 p (1965)
- SAUER, M. E., WALKER, B. E. : Radioautographic study of interkinetic nuclear migration in the neural tube. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 101, 557-560 (1959)
- SAWYER, H. S., BOSTROM, R. C. : A new Nipkow-disk scanner for accurate cytological measurements. I. R. E. Nat. Convention Re. 37-41 (1958)
- SELKOW, S. M. : One pass complexity of digital picture properties *J. Ass. Com. Math.* 19, 283-295 (1972)
- SERRA, J. : L'Analyseur de Texture. *Sciences de la Terre*, 16, 275-289 (1971)
- SMART, I. H. M. : Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the spinal cord in the mouse. *J. Anat.* 3, 365-380 (1972)
- VENDRELY, C. : cytophotométrie. In : La cinétique de prolifération cellulaire. Séminaire I.N.S.E.R.M. 67-78 (1971)

WIED, G., BAHR, G. editors : Introduction to quantitative cytochemistry. 623 p. Academic Press, New York and London. 1970

ZIMMER, H. G. : Microphotometry. In : Micromethods in Molecular Biology. (V. NEUHOFF, ed.). p. 297-328. Springer-Verlag, Berlin. 1973

CONCLUSIONS GENERALES

ET

RESUME

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nos recherches concernant la prolifération cellulaire embryonnaire et sa régulation ont été conduites parallèlement à la conception et à la réalisation d'un système automatique permettant l'analyse microphotométrique et morphologique des populations cellulaires.

I SYSTÈME D'ANALYSE MICROPHOTOMÉTRIQUE À BALAYAGE

Le système d'analyse microphotométrique à balayage (S.A.M.B.) qui a été réalisé dans le cadre de ce travail, comporte un microscope équipé de platines motorisées déplaçant la préparation histologique, un dispositif de balayage de l'image donnée par le microscope et un photomultiplicateur. Un module électronique programmable commande et contrôle le processus de mesure qui consiste à relever point par point toutes les valeurs photométriques de l'image et à itérer champ après champ jusqu'à l'exploration complète d'une préparation microscopique. Les données photométriques sont traitées en ordinateur par un programme permettant de calculer, pour chaque cellule rencontrée au cours du balayage, divers paramètres densitométriques et morphologiques. La possibilité d'obtenir simultanément ces deux types d'information est la condition nécessaire à l'analyse d'images histologiques et représente l'avantage le plus important du S.A.M.B. sur les appareils d'analyse automatique des images déjà existants.

Le S.A.M.B. a été appliqué à l'étude de la prolifération cellulaire. Il permet, à cette fin, de reconnaître et de compter automatiquement les cellules dans les différentes phases du cycle mitotique. La discrimination des cellules en mitose, en phase G_1 , S ou G_2 ainsi que la caractérisation des cellules en phase G_0 (cellules qui ne sont pas engagées dans un cycle mitotique), sont fondées sur la quantité d'ADN nucléaire après coloration de FEULGEN, sur un indice de courbure traduisant le degré de régularité des contours des noyaux et sur un indice de contraste relatif à l'état de condensation de la chromatine. Les analyses réalisées à l'aide du S.A.M.B. permettent d'obtenir rapidement la proportion des cellules d'une population dans

chaque phase du cycle mitotique et le coefficient de prolifération à partir d'un seul échantillon de cette population cellulaire.

Le S.A.M.B. a été conçu pour effectuer des analyses photométriques et morphologiques dans toutes les méthodes de la microscopie ; il est donc applicable, non seulement aux dosages de substances diverses en lumière transmise, mais aussi à l'autoradiographie quantitative et à la fluorométrie. Ainsi, la réalisation de programmes adéquats pour le traitement des données permettrait d'utiliser cet instrument pour caractériser, reconnaître et compter les cellules appartenant à des types les plus divers aussi bien dans le domaine de l'hématologie ou de l'anatomo-pathologie que dans celui de l'histologie fondamentale.

Le S.A.M.B. a fait l'objet d'un brevet français n° 76-13.687 déposé par l'Agence Nationale pour la Valorisation de la Recherche (ANVAR) et l'Office pour la Protection de la Recherche Scientifique (OPRS).

Nos recherches concernant le déroulement des cycles mitotiques au cours de l'organogenèse de l'embryon âgé et de la larve de pleurodèle, nous ont permis de préciser nos connaissances concernant les relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires et l'effet de la température sur l'activité mitotique des embryons d'une espèce animale poïkilotherme. Des substances inhibant la prolifération des cellules de l'épithélium intestinal embryonnaire et favorisant leur différenciation ont été isolées de l'intestin de pleurodèle adulte.

L'ensemble des résultats acquis nous a conduit à formuler une hypothèse concernant le mécanisme par lequel la différenciation des cellules s'accompagne d'une perte de leur activité mitotique.

II RELATIONS ENTRE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE ET LA DIFFÉRENCIATION

L'étude de la prolifération cellulaire dans le

téleencéphale, la moelle épinière, le mésenchyme de l'ébauche du membre antérieur, l'épithélium gastrique et l'épithélium intestinal de l'embryon de pleurodèle, révèle que l'organogenèse s'accompagne, dans tous les cas, d'une forte diminution de l'activité mitotique. Cette diminution est la conséquence d'un allongement de la durée des cycles cellulaires (diminution de la vitesse de division) et d'une augmentation de la proportion de cellules qui cessent de se diviser (diminution du coefficient de prolifération).

Le ralentissement de la vitesse de division des cellules au cours de l'organogenèse est dû à un allongement de la phase G_1 , et, à un moindre degré, de la phase G_2 , dans tous les tissus étudiés à cet égard. Ainsi, entre les stades 34 et 37 voisins de l'éclosion, la durée de la phase G_1 passe de 4h à 7h dans le téleencéphale, de 2h à 8h dans l'épithélium intestinal, de 1h à 4h dans l'épithélium gastrique et de 1h à 6h dans la moelle épinière. Les phases S et M ne présentent, par contre, qu'un faible allongement au cours de la même période. L'allongement différentiel des phases du cycle cellulaire au cours de l'organogenèse se traduit par une modification de la qualité des cycles ; ainsi, l'accroissement de la durée relative des phases G_1 et G_2 (ou fraction du cycle mitotique occupée par ces phases) aux dépens de la durée relative de la phase S est interprété comme la manifestation des activités de différenciation au niveau de la cinétique cellulaire.

La diminution du coefficient de prolifération au cours de l'organogenèse traduit l'arrêt des divisions dans un nombre croissant de cellules embryonnaires. L'étude autoradiographique de divers tissus révèle que les cellules qui cessent de se diviser sont bloquées dans une phase G_0 qui peut être interprétée comme une phase G_1 indéfiniment prolongée et durant laquelle s'achève la différenciation structurale et fonctionnelle.

La durée relative de la phase G_1 et le coefficient de prolifération sont des paramètres représentatifs de l'état de différenciation d'un tissu embryonnaire : la durée relative de la phase G_1 augmente alors que le coefficient de prolifération diminue à mesure que la différenciation s'accroît. Ainsi, le téleencéphale qui, peu avant l'éclosion (stade 34), est caractérisé par un coefficient de prolifération de 35 % et une durée relative de la phase G_1 de 8,3 %, apparaît plus différencié

que l'épithélium gastrique qui, au même stade, présente un coefficient de prolifération de 50 % et une durée relative de la phase G_1 de 6,8 %. D'ailleurs, la larve au stade 34 est capable de nager (ce qui dénote un certain degré de fonctionnement de son système nerveux central) alors qu'elle est encore incapable de se nourrir.

III EFFETS DE LA TEMPÉRATURE SUR LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

La durée des cycles cellulaires est très sensible aux conditions de température : elle s'allonge, dans tous les tissus étudiés à cet égard, selon une courbe d'allure exponentielle en fonction de l'abaissement de température. Le temps de génération qui dure environ 90h à 12° C dans les différents tissus considérés est réduit à 20-30h à 26° C. Il est remarquable de constater que l'extrapolation vers 37° C des courbes de variation du temps de génération en fonction de la température conduirait à des durées de 10h environ qui sont précisément celles observées chez les embryons des Mammifères ou des Oiseaux aux stades de l'organogenèse. Ainsi, la durée relativement longue des cycles cellulaires de l'embryon de pleurodèle par rapport à celle des cycles mitotiques des embryons des Vertébrés homéothermes serait due essentiellement à la différence de température corporelle.

L'allongement du temps de génération dans les cellules embryonnaires du pleurodèle en fonction de l'abaissement de température traduit principalement l'allongement de la phase S et à un moindre degré celui des phases G_2 et M. La phase G_1 présente paradoxalement, dans tous les tissus considérés, un raccourcissement de sa durée avec l'abaissement de température. Un résultat comparable a été trouvé dans certains tissus de la larve de Bufo bufo (DOURNON et CHIBON, 1974) mais il est contraire aux résultats précédemment observés in vitro dans les cellules d'organes adultes (RAO et ENGELBERG, 1968) et in vivo chez les végétaux (WIMBER, 1966). Ces auteurs avaient montré, en effet, que la durée de la phase G_1 du cycle cellulaire s'allonge avec l'abaissement de température comme

les 3 autres phases du cycle mitotique. Chez l'embryon de pleurodèle, l'allongement de la durée de la phase G_1 avec l'élévation de température n'a pas reçu d'interprétation solidement fondée. Il pourrait représenter un mécanisme de régulation par lequel les cellules des embryons des Vertébrés poïkilothermes s'opposent aux variations de la durée du cycle cellulaire en fonction de la température. Il pourrait plus vraisemblablement traduire l'activation, avec l'élévation de température, d'un inhibiteur de la phase G_1 .

Si l'on admet que la phase G_1 représente la période du cycle mitotique pendant laquelle la cellule exerce son activité de différenciation, le raccourcissement de cette phase avec l'abaissement de température devrait se traduire par un ralentissement dans le déroulement de la différenciation par rapport à la prolifération des cellules. Une telle situation a été effectivement constatée chez les têtards de Rana pipiens (DECKER et KOLLROS, 1969). Ceux-ci présentent, en effet, une taille et un nombre de cellules d'autant plus grands, à un stade donné de leur développement, qu'ils ont été élevés à une température plus basse.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que le coefficient de prolifération, contrairement à la durée des cycles cellulaires, est indépendant de la température. Des résultats comparables ont été obtenus chez la larve de Bufo bufo par DOURNON et CHIBON (1974). Ainsi, l'arrêt de division d'une cellule embryonnaire paraît déterminé par le nombre de divisions qu'elle a subi.

La vitesse de développement de l'embryon de pleurodèle varie, en fonction de la température, selon une courbe très semblable à celle qui représente la variation de la durée du cycle cellulaire dans divers tissus en fonction de ce même facteur. Nous avons pu vérifier qu'à un stade donné du développement, le temps de génération des cellules et le temps mis par un embryon pour atteindre ce stade sont dans un rapport indépendant de la température mais variable selon les tissus. Nous avons conclu de ces observations que chaque stade du développement, et par conséquent chaque étape de la différenciation, est atteint après un nombre de cycles mitotiques déterminé et indépendant de la température mais particulier à

chaque ébauche. Cette conception généralise à l'ensemble du développement embryonnaire l'hypothèse de DETTLAFF (1964) selon laquelle les fonctions nucléaires spécifiques des diverses lignées cellulaires apparaîtraient au cours de la segmentation après un nombre défini de divisions cellulaires. Ainsi, la détermination et la différenciation d'une cellule seraient conditionnées par le nombre des divisions qu'elle a subi et interviendraient au moment où sont atteints certains degrés de dilution et de ségrégation des répresseurs cytoplasmiques de ses gènes.

IV RÉGULATION DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

Les résultats de l'étude de la prolifération cellulaire en fonction de l'âge des embryons et de la température d'élevage nous avaient conduit à penser que le développement normal de l'embryon de pleurodèle dépend d'une succession rigoureuse de cycles cellulaires, suggérant que l'arrêt de division d'une cellule est un événement programmé résultant de son histoire mitotique et notamment du nombre de cycles mitotiques qui se sont déroulés dans la lignée qui lui a donné naissance. Cette conception ne permettait pas de comprendre les capacités de cicatrisation et de régulation bien connues dans les tissus embryonnaires ; c'est pourquoi nous avons recherché d'éventuels facteurs extracellulaires intervenant dans la régulation de l'activité mitotique embryonnaire. Les travaux préliminaires entrepris dans ce domaine ont révélé que les extraits non purifiés de muqueuse intestinale et les extraits de foie de pleurodèle adulte inhibent respectivement l'activité mitotique dans l'épithélium intestinal et le parenchyme hépatique de l'embryon au stade voisin de l'éclosion (stade 34). La purification partielle des facteurs responsables de cette inhibition a été entreprise pour les extraits de muqueuse intestinale et a permis de caractériser deux substances antimitotiques. L'étude cytophotométrique de la prolifération cellulaire intestinale d'embryons traités par ces substances démontre que l'une, appelée chalone 1, provoque l'accumulation des cellules en phase G_1 du cycle mitotique alors

que l'autre, appelée chalone 2, provoque l'accumulation des cellules dans la phase G_2 .

La chalone 1 est thermolabile à $80^\circ C$ et n'est pas dialysable ; son poids moléculaire, estimé par chromatographie sur gel de "Sephadex", est de 120 000-150 000 et son pH_i déterminé par électrofocalisation préparative est de 6,7-7,0.

La chalone 2 est thermostable à $100^\circ C$ et dialysable ; son poids moléculaire, estimé par chromatographie sur gel de "Sephadex", est d'environ 2 000.

Des résultats récents (BRUGAL, non publié) révèlent que l'activité inhibitrice de la chalone 1 et de la chalone 2 disparaît après incubation de ces substances avec de la trypsine. La chalone 1 est donc de nature protéique et la chalone 2 de nature polypeptidique. Des substances ayant le même poids moléculaire et les mêmes effets inhibiteurs que les chalone 1 et 2 sur l'activité mitotique de l'épithélium intestinal embryonnaire ont été obtenues par chromatographie sur gel de "Sephadex" d'extraits de muqueuse intestinale de caille et de souris. Ces résultats suggèrent que les facteurs antimitotiques intestinaux sont -comme les chalone mises en évidence dans divers tissus par d'autres auteurs (Nat. Cancer Inst. Monogr., 38, 1973)- dépourvus de spécificité zoologique parmi les Vertébrés.

Les chalone 1 et 2 ont été utilisées comme outil expérimental afin de perturber in vivo la prolifération cellulaire de l'épithélium intestinal embryonnaire.

Nous avons constaté que, chez le pleurodèle, comme chez les autres Vertébrés, la différenciation histologique de l'intestin commence à la fin du développement embryonnaire et s'achève au moment où l'animal commence à se nourrir. Cette différenciation s'accompagne de la ségrégation topographique entre la population des cellules à mucus et des cellules absorbantes, qui constitue l'épithélium fonctionnel, et la population des cellules génératrices qui constitue des nids sous-épithéliaux représentant l'équivalent fonctionnel des cryptes de LIEBERKÜHN des Vertébrés supérieurs.

La sensibilité des cellules de l'épithélium intestinal aux chalone 1 et 2 se manifeste précisément au moment où, dans

le développement non perturbé, apparaissent les premières cellules qui cessent de se diviser. A partir de ce stade, la chalone 2 exerce une action inhibitrice proportionnelle à la dose injectée ; cependant, le quart environ des cellules intestinales en activité mitotique est réfractaire à l'inhibition même après des injections répétées de chalone 2. Cette substance ne provoque d'ailleurs qu'un blocage temporaire du cycle mitotique en phase G_2 car un traitement de longue durée n'empêche pas toutes les cellules engagées dans un cycle mitotique de passer en mitose bien qu'un retard de 20h environ dans le déroulement de leur phase G_2 soit provoqué par l'inhibiteur.

La population des cellules intestinales en activité mitotique semble hétérogène à l'égard de l'activité inhibitrice exercée par la chalone 1 et comprend un quart de cellules réfractaires à l'activité antimitotique de la chalone 1 : ces cellules sont probablement les mêmes que celles qui sont insensibles à la chalone 2. Parmi les cellules sensibles à la chalone 1, la moitié environ n'est que retardée dans le déroulement de la phase G_1 alors que l'autre moitié représente des cellules qui sont définitivement bloquées dans cette phase et se différencient. Il est remarquable que la moitié environ des cellules sensibles à la chalone 1 est inhibée par des doses faibles alors que l'autre moitié représente des cellules qui ne sont inhibées que par des doses cent fois plus élevées d'inhibiteur. Nous avons émis l'hypothèse que les cellules qui sont bloquées définitivement dans leur cycle mitotique par la chalone 1 et se différencient sont précisément celles qui, déjà très engagées dans la voie de la différenciation, ne nécessitent qu'une faible dose d'inhibiteur pour cesser de se diviser. Réciproquement, les cellules qui ne sont que retardées en phase G_1 par la chalone 1 seraient précisément celles qui, moins engagées que les précédentes dans la voie de la différenciation, nécessiteraient une dose élevée d'inhibiteur au plus capable de ralentir leur division. La sensibilité des cellules embryonnaires aux chalones dépendrait donc de leur état de maturation : une fois atteint un certain degré de maturation (différenciation discrète), la sensibilité des cellules aux chalones se manifesterait tout d'abord par un

allongement des phases G_1 ou G_2 sous l'effet de la chalone correspondante, puis, pour les cellules encore plus différenciées, par un blocage du cycle mitotique rendu définitif par l'achèvement de la différenciation. La chalone 2, qui chez l'embryon âgé de pleurodèle ne provoque pas de blocage définitif des cellules en phase G_2 , ne serait pas impliquée dans l'arrêt de division des cellules qui précède l'achèvement de leur différenciation. Par contre, elle pourrait jouer un rôle essentiel dans la régulation du renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal de la larve et de l'adulte. Cette opinion est en accord avec les observations de PEDERSON et GELFANT (1970) selon lesquelles l'épithélium intestinal de souris adulte comporte une sous-population de cellules bloquées en phase G_2 .

Les résultats que nous avons obtenus révèlent que des injections répétées de chalone 2 ne perturbent pas de façon décelable le déroulement de la différenciation dans l'épithélium intestinal embryonnaire. Les injections répétées de chalone 1, par contre, rendent plus précoce la consommation du vitellus dans ce tissu. Etant donné que le catabolisme du vitellus fournit notamment l'énergie nécessaire aux synthèses de protéines structurales et que ces synthèses se déroulent principalement pendant la phase G_1 , l'accélération de la consommation du vitellus sous l'effet des injections répétées de chalone 1 est certainement consécutif au ralentissement ou au blocage des cycles cellulaires dans cette phase à la suite du traitement. Nous avons d'ailleurs remarqué que, chez les embryons élevés à basse température (12°C), et chez lesquels la phase G_1 du cycle mitotique n'est pas décelable, la consommation du vitellus était retardée par rapport à celle des embryons élevés à une température plus élevée (26°C) et chez lesquels la phase G_1 dure plusieurs heures. Il est raisonnable de penser que l'allongement de la phase G_1 et l'accélération corrélative de la consommation du vitellus avec l'élévation de température, sont attribuables à une activation de la synthèse de chalone 1 dans les tissus embryonnaires sous l'effet de ce même facteur. Cette activation serait responsable de l'allongement de la phase G_1 avec l'élévation de température.

Bien qu'un traitement prolongé par la chalone 1 rende plus précoce la consommation du vitellus, il ne semble pas rendre

corrélativement plus précoce la différenciation de l'épithélium intestinal. Cependant, au stade où apparaissent les cellules à mucus au cours du développement normal (stade 36), le nombre de ces cellules qui se différencient après un traitement prolongé par la chalone 1 est plus élevé que chez les témoins et le nombre des cellules en activité mitotique dans les nids sous-épithéliaux est plus faible. Il semble donc que les cellules aptes à cesser de se diviser sous l'effet de la chalone 1 achèvent leur différenciation mais que l'aptitude d'une cellule à cesser de se diviser dépend de son âge, c'est-à-dire du nombre de cycles mitotiques qu'elle a subi.

Les résultats que nous avons obtenus ne nous permettent pas d'envisager par quel mécanisme les chalones provoquent l'allongement ou le blocage des phases G_1 et G_2 du cycle cellulaire ; néanmoins, l'absence de spécificité zoologique de ces substances permet de soupçonner que leur mode d'action s'apparente à celui des enzymes ou des hormones dont la constitution biochimique présente aussi une stabilité remarquable au cours de l'évolution. Si la structure des enzymes et des hormones n'a pas été altérée par des mutations successives, cela tient évidemment au fait que ces substances ont un mode d'action impliquant leur combinaison avec un site récepteur qui leur est spécifique ; ainsi, toute mutation aléatoire qui affecterait indépendamment le site spécifique ou la substance elle-même rendrait impossible la coaptation substance-site et provoquerait chez le mutant la perte de la fonction assurée par cette substance. De telles mutations, lorsqu'elles se produisent, sont léthales ce qui explique l'apparente stabilité évolutive des mécanismes hormonaux ou enzymatiques. Il est raisonnable de penser que la stabilité évolutive des chalones implique que ces facteurs antimitotiques agissent eux aussi par combinaison avec un site récepteur. En raison de la nature extracellulaire des chalones, et par analogie avec les mécanismes hormonaux, le site récepteur des facteurs antimitotiques serait probablement membranaire et pourrait s'apparenter aux récepteurs adrénérgiques. Selon cette hypothèse, les chalones provoqueraient une activation de l'adényl-cyclase des membranes

et par conséquent une augmentation intracellulaire du taux d'AMP cyclique. Ce messenger aurait pour fonction de neutraliser l'activité des nucléoside-kinases provoquant ainsi une inhibition de la synthèse des ARN et de l'ADN.

V CONCLUSION ET HYPOTHÈSE

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus nous ont conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle le déroulement des cycles cellulaires pendant la période de l'organogenèse embryonnaire dépendrait à la fois du nombre de divisions subies par les cellules et du taux de chalone dans les tissus auxquels elles appartiennent. En particulier, deux signaux, l'un intracellulaire et l'autre extracellulaire, seraient nécessaires pour qu'une cellule cesse de se diviser et achève sa différenciation structurale et fonctionnelle. Le signal intracellulaire conférerait à la cellule l'aptitude à cesser de se diviser ; il apparaîtrait au moment où est atteint un certain degré de dilution des répresseurs cytoplasmiques du génôme de l'oeuf fécondé, c'est-à-dire après un nombre déterminé de divisions cellulaires. Ainsi, le mécanisme par lequel une cellule deviendrait apte à cesser de se diviser serait semblable, sinon identique, à celui qui préside à l'apparition de la compétence des cellules embryonnaires. L'aptitude à cesser de se diviser, comme la compétence, impliquerait un certain degré de différenciation discrète qui se manifesterait, entre autre, par la sécrétion de chalones dont le taux croissant au cours de l'organogenèse pourrait être en partie responsable de l'allongement de la phase G_2 et principalement de la phase G_1 pendant cette période. Le signal extracellulaire apparaîtrait au moment où est atteint un taux tissulaire de chalone suffisant pour arrêter en phase G_1 le déroulement du cycle mitotique des cellules rendues aptes à cesser de se diviser par le précédent signal. Si, au cours de l'organogenèse, l'un de ces deux signaux ne se produit pas (insuffisance du nombre de cycles mitotiques dans une lignée cellulaire et par conséquent insuffisance du nombre de cellules dans une ébauche) ou disparaît (perte cellulaire accidentelle ou expérimentale) les divisions se pour-

suivent jusqu'à ce que les conditions nécessaires au blocage mitotique soit instaurées ou restaurées. Une certaine proportion de cellules génératrices, insensible aux chalones pendant la vie embryonnaire, représenterait dans chaque tissu, la lignée des cellules souches destinées à assurer son renouvellement éventuel chez la larve et chez l'adulte.

DECKER, R. S. et KOLLROS, J. J. - The effect of cold on hind-limb growth and lateral motor column development in Rana pipiens. J. Embryol. exp. Morphol., 21 : 219-233 (1969).

DETLAFF, T. A. - Cell division, duration of interkinetic states and differentiation in early stages of embryonic development. In : Advances in morphogenesis (ABERCROMBIE, M. et BRACHET, J. eds.), 3 : 323-362. Academic Press, New York et Londres. (1964).

DOURNON, C. et CHIBON, P. - Influence de la température, de l'âge et des conditions hormonales (thyroxine) sur la prolifération cellulaire chez la jeune larve et pendant la métamorphose du crapaud Bufo bufo L. (Amphibien, Anoure). Wilhelm Roux'Archiv, 175 : 27-47 (1974).

PEDERSON, T. et GELFANT, S. - G₂-population cells in mouse kidney and duodenum and their behavior during the cell division cycle. Exp. Cell Res., 59 : 32-36 (1970).

RAO, P. N. et ENGELBERG, J. - Mitotic duration and its variability in relation to temperature in HeLa cells. Exp. Cell Res., 52 : 198-208 (1968).

WIMBER, D. E. - Duration of the nuclear cycle in Tradescantia root tips at three temperatures as measured with ³H-Th. Amer. J. Bot., 53:21-24 (1966).

RESUME

I - ETUDE DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE EMBRYONNAIRE : ASPECTS MÉTHODOLOGIQUES

L'étude de la prolifération dans les populations cellulaires embryonnaires revêt diverses particularités concernant l'indice de marquage, le coefficient de prolifération et les erreurs éventuelles introduites par la durée de disponibilité de la thymidine tritiée

Indice de marquage

Les courbes de variation de l'indice de marquage, en fonction du temps écoulé après une injection de thymidine tritiée à des embryons de pleurodèle, sont périodiques et diffèrent notablement des courbes homologues obtenues dans les populations cellulaires stables. Elles sont caractéristiques des populations cellulaires en croissance de type exponentiel et permettent de calculer graphiquement la durée du cycle cellulaire et de ses phases.

Coefficient de prolifération

Un modèle mathématique, représentant la cinétique de prolifération des populations cellulaires embryonnaires, a été établi afin de permettre le calcul du coefficient de prolifération. Ce modèle montre que, dans les populations cellulaires en croissance de type exponentiel, le coefficient de prolifération peut être évalué à l'aide de relations simples si l'on connaît, outre l'indice de marquage ou l'indice mitotique, le temps de génération et la durée des phases du cycle cellulaire.

Durée de disponibilité de la thymidine tritiée

La durée de disponibilité de la thymidine tritiée, injectée par voie intrapéritonéale à de jeunes pleurodèles métamorphosés et à des larves au stade 36, a été étudiée par histo-autoradiographie et scintillation en phase liquide. Chez les animaux métamorphosés, la thymidine exogène est disponible pendant 4 heures environ ; en outre, un marquage différé de l'ADN, probablement à partir des catalites tritiés initiaux de la thymidine injectée, s'observe 7 heures après l'administration du précurseur. Chez les larves, la durée de

disponibilité du précurseur est de 60 minutes, pendant lesquelles 23 % environ de la thymidine est incorporé dans l'ADN des cellules alors engagées dans la phase S d'un cycle mitotique.

Le fait que la durée de disponibilité de la thymidine exogène est environ 4 fois plus longue chez les animaux adultes que chez les larves, bien qu'ils aient reçu une dose de précurseur 20 fois moins élevée, est à mettre en relation non seulement avec des différences de la vitesse du catabolisme et de l'élimination urinaire de la thymidine entre ces deux stades, mais aussi avec de grandes différences du coefficient de prolifération des tissus en fonction de l'âge et de leur état de différenciation. En effet, selon les organes 30 à 56 % des cellules sont engagées dans un cycle mitotique chez les jeunes larves alors que, chez les animaux métamorphosés, 5,5 % seulement d'entre elles se divisent dans l'épithélium intestinal qui est certainement le tissu proliférant le plus rapidement. La durée de disponibilité de la thymidine tritiée doit être enlevée à la durée de la phase S calculée graphiquement sur les courbes de variation du pourcentage de mitoses marquées et doit être ajoutée, par contre, à la durée de la phase G_1 .

II - EVOLUTION DE LA CINÉTIQUE DE PROLIFÉRATION CELLULAIRE AU COURS DE L'ORGANOGENÈSE

L'étude autoradiographique de l'activité mitotique chez les embryons et les jeunes larves de pleurodèle aux stades voisins de l'éclosion, révèle d'importantes modifications qualitatives et quantitatives de la prolifération cellulaire au cours du développement. Les modifications qualitatives consistent principalement en un allongement important de la durée de la phase G_1 , et à un moindre degré de la phase G_2 . La phase G_1 qui occupe une place grandissante dans le cycle cellulaire à mesure que la différenciation s'accroît, semble représenter la période du cycle mitotique durant laquelle sont synthétisées les protéines structurales et fonctionnelles particulières à chaque tissu. Les modifications quantitatives consistent en une diminution rapide du coefficient de prolifération et de la vitesse de multiplication des cellules au cours du développement. Il est donc probable que les cellules en cours de différenciation se divisent de plus en plus lentement, puis cessent toute activité mitotique pour entrer dans une phase

de maturité, dite G_0 , qui pourrait être comprise comme une phase G_1 indéfiniment prolongée.

III - EFFETS DE LA TEMPÉRATURE SUR LA CINÉTIQUE DE PROLIFÉRATION CELLULAIRE CHEZ L'EMBRYON

Chez l'embryon de Pleurodèle au stade 34, la durée du cycle cellulaire et de ses phases varie peu selon les tissus mais dépend étroitement de la température. Le temps de génération et la durée de la phase S sont environ 3 ou 4 fois plus longs à 12°C qu'à 26°C. Lorsque la température s'élève, la phase G_2 est abrégée dans les mêmes proportions que la phase M ; par contre, la durée de la phase G_1 qui est nulle à 12°C s'allonge considérablement pour représenter environ 1/4 de la durée totale du cycle cellulaire à 26°C. La durée de cette phase est d'autant plus longue, à une température donnée, que les cellules sont plus différenciées. Les tissus étudiés représentent des populations cellulaires en croissance exponentielle. Le coefficient de prolifération, duquel dépend la base de la fonction exponentielle de croissance, est indépendant de la température mais particulier à chaque tissu. Il est d'autant plus faible que le tissu est plus différencié. En revanche, la vitesse de multiplication des cellules, qui est inversement proportionnelle au temps de génération, varie largement en fonction de la température ; en outre, elle semble déterminer à elle seule la vitesse du développement des embryons aux températures choisies.

IV - MISE EN ÉVIDENCE DE FACTEURS ANTIMITOTIQUES (CHALONES) DANS LES TISSUS DIFFÉRENCIÉS

Les extraits non purifiés de muqueuse intestinale et de foie de pleurodèle adulte inhibent respectivement l'activité mitotique dans l'épithélium intestinal et le parenchyme hépatique de l'embryon au stade voisin de l'éclosion (stade 34). La purification partielle et la caractérisation des facteurs responsables de cette inhibition ont été entreprises pour les extraits de muqueuse intestinale. Ceux-ci ont été fractionnés par chromatographie sur gel de Sephadex G-200 et l'effet des fractions sur la prolifération cellulaire de l'épithélium intestinal embryonnaire a été étudié in vivo

par le comptage de l'indice mitotique et la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée. L'effet des fractions qui se sont révélées inhibitrices a été contrôlé par une étude cytophotométrique de la prolifération cellulaire fondée sur le dosage de l'ADN nucléaire et permettant de dénombrer les cellules intestinales dans les différentes phases du cycle mitotique. Les résultats obtenus montrent que l'intestin de pleurodèle adulte contient deux facteurs antimitotiques inhibant le déroulement des cycles cellulaires de l'épithélium intestinal embryonnaire. L'un de ces facteurs, caractérisé par un poids moléculaire de 120 000 - 150 000, inhibe les cellules en phase G_1 ; l'autre, caractérisé par un poids moléculaire de 2 000 environ, inhibe les cellules en phase G_2 . Des facteurs antimitotiques ayant les mêmes caractéristiques ont été isolés de l'intestin de caille et de souris adultes. Ces facteurs ne semblent donc pas présenter de spécificité zoologique parmi les Vertébrés et méritent de ce fait le nom de chalones intestinales. La chalone 1, inhibant les cycles mitotiques en phase G_1 , est thermolabile à 80 °C et n'est pas dialysable. Il s'agirait d'une protéine de pH_i estimé par électrofocalisation préparative à 6,7-7,0. La chalone 2, inhibant les cycles mitotiques en phase G_2 , est dialysable et thermostable à 100 °C. Il s'agirait d'un polypeptide.

Les chalones 1 et 2 ont été utilisées comme outils expérimentaux afin de perturber in vivo la prolifération cellulaire de l'épithélium intestinal embryonnaire et larvaire.

V - RELATIONS ENTRE LA PROLIFÉRATION ET LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRES DANS L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL EMBRYONNAIRE ET LARVAIRE

Entre la fin du développement embryonnaire (stade 34) et le début de la vie larvaire (stade 37), l'épithélium intestinal du pleurodèle passe en 4 jours de l'état de cordon endodermique indifférencié à celui d'épithélium fonctionnel constitué de cellules absorbantes à plateau strié et de cellules à mucus. Au cours de cette différenciation, le nombre de cellules augmente de 2,6 fois environ bien que l'activité mitotique diminue régulièrement par abaissement du coefficient de prolifération de 52% à 22%. Les mitoses qui, dans le cordon endodermique au stade 34 sont uniformément distribuées, apparaissent brusquement localisées, au stade 36, dans les nids cellulaires sous-épithéliaux qui représentent dès lors la totalité du compartiment générateur intestinal. Avant même d'être localisé, ce compartiment

produit autant de cellules qui, bloquées en phase G_1 du cycle mitotique, cessent de se diviser et se différencient, que de cellules qui parcourent le cycle mitotique et se divisent à nouveau. Un tel processus laisse persister dans l'épithélium intestinal un nombre constant de cellules douées d'activité mitotique et capables d'assurer ainsi le renouvellement de ce tissu.

L'évolution de la prolifération et de la différenciation cellulaires dans l'intestin de pleurodèle est très comparable à celle observée chez les Mammifères et confirme, en particulier, l'analogie longtemps contestée entre les cryptes de LIEBERKÜHN de ces derniers et les nids cellulaires sous-épithéliaux des Urodèles.

VI - EFFETS DES CHALONES SUR LA PROLIFÉRATION ET LA DIFFÉRENCIA- TION CELLULAIRES DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL EMBRYONNAIRE

Les chalones 1 et 2, extraites de l'intestin de pleurodèle adulte, inhibent en phase G_1 et G_2 respectivement les cycles mitotiques de l'épithélium intestinal embryonnaire. Les effets de ces chalones sur la prolifération et la différenciation cellulaires dans ce tissu ont été étudiés en fonction de la dose, injectée, du stade de développement et de la durée du traitement. L'inhibition provoquée par la chalone 2 est proportionnelle à la dose injectée entre deux seuils de concentration. Le quart environ des cellules intestinales en activité mitotique est insensible à la chalone 2 même à la suite d'injections répétées de l'inhibiteur. Seules les cellules intestinales des embryons âgés (stade 34) sont sensibles à cette chalone et répondent par un allongement de la phase G_2 qui, malgré des injections répétées de l'inhibiteur, n'excède pas une vingtaine d'heures. La sensibilité des cellules de l'épithélium intestinal à la chalone 1 se manifeste à la fin du développement (stade 33), comme dans le cas de la chalone 2. A l'égard de la chalone 1, la population cellulaire en activité mitotique dans l'intestin embryonnaire apparaît hétérogène et comprend : 50 % de cellules aptes à être inhibées par des doses faibles de chalone 1 ; 25 % de cellules aptes à n'être inhibées que par des doses de chalone 1 cent fois plus élevées et 25% environ de cellules insensibles à cet inhibiteur. Les injections répétées de chalone 1 bloquent définitivement en phase G_1 la moitié environ des cellules en activité

mitotique dans l'épithélium intestinal indifférencié au stade 34 ; en outre, elles accélèrent la consommation du vitellus, favorisent la différenciation des cellules à mucus et diminuent le nombre des cellules constituant les nids sous-épithéliaux qui apparaissent au stade 36 et représentent le compartiment générateur de l'épithélium intestinal. Les résultats obtenus permettent de proposer un modèle de cinétique de la prolifération cellulaire au cours de la différenciation de l'épithélium intestinal du pleurodèle ; de plus, ils conduisent à l'hypothèse que le nombre de divisions subies par une cellule embryonnaire et le taux de chalone dans le tissu auquel elle appartient, sont les deux signaux complémentaires qui déclenchent le blocage du cycle mitotique et l'achèvement de la différenciation dans cette cellule.

VII - CONCEPTION ET RÉALISATION D'UN SYSTÈME AUTOMATIQUE D'ANALYSE MICROPHOTOMÉTRIQUE DES POPULATIONS CELLULAIRES

Un système d'analyse microphotométrique à balayage (S.A.M.B.) a été conçu et réalisé pour acquérir et traiter l'image donnée par un microscope. Le système procède par balayage de l'image au moyen d'un disque de Nipkow interposé entre le microscope et un photomultiplicateur. Un dispositif d'échantillonnage du signal photométrique, dépendant du disque, permet d'éviter les erreurs dues à la géométrie du balayage. Le signal photométrique et les impulsions d'échantillonnage de ce signal sont appliquées à l'entrée d'un convertisseur analogique-numérique. Une unité de commande et de contrôle, organisée autour d'un microprocesseur, permet d'alternar les déplacements de la préparation microscopique entraînée par des platines motorisées, et le balayage des champs successifs. L'image de la totalité de la préparation histologique peut donc être ainsi explorée puis reconstituée et analysée par un ordinateur. Les performances du S.A.M.B. sont les suivantes : pouvoir de résolution = $0,25 \mu\text{m}$; nombre de niveaux = 512 ; vitesse = 4 KHz.

Les résultats préliminaires de l'analyse densitométrique et morphologique de cellules télencéphaliques embryonnaires colorées par le réactif de FEULGEN, montrent que le S.A.M.B. permet de reconnaître et compter sélectivement les cellules en mitose, les cellules en phase G_1 , S et G_2 ainsi que les cellules qui ne sont

pas engagées dans un cycle mitotique (phase G_0 au sens large). Ces données permettent d'établir les paramètres de la prolifération dans une population cellulaire, et notamment l'indice mitotique et le coefficient de prolifération, à partir d'un seul échantillon de la population. En raison de ses performances, le S.A.M.B. peut être appliqué à des analyses très diverses dans tous les domaines de l'histologie et de la cytologie.
