

LA RÉGÉNÉRATION DES BRAS DE LA SEICHE *SEPIA OFFICINALIS* L (CEPHALOPODA, SEPIOIDEA) (1). II. ÉTUDE HISTOLOGIQUE ET CYTOLOGIQUE.

par

Jean-Pierre Féral

Laboratoire de Biologie des Invertébrés marins et Malacologie,
Muséum national d'Histoire naturelle, 55, rue de Buffon, 75005 Paris.

et

Station biologique, place G.-Teissier, 29211 Roscoff.

Résumé

Les principales étapes de la régénération post-traumatique des bras de *Sepia officinalis* L. sont décrites. En nous basant sur les modifications histologiques et cytologiques, nous avons déterminé trois phases : I. cicatrisation (migration de cellules amoeboïdes sanguines et synthèse importante de collagène), étalement des cellules épithéliales sur la blessure, dégénérescence des cellules trop endommagées et dédifférenciation des cellules voisines de la plaie ; II. formation d'un blastème de régénération avec les cellules dédifférenciées, activation et division des cellules du blastème et de l'épiderme (phase de croissance) ; III. redifférenciation et morphogenèse.

Ces différentes phases sont en rapport dans le temps avec l'évolution des systèmes nerveux et sanguin.

Chromatophores et iridophores n'ont pas pour origine d'anciennes cellules dédifférenciées du même type.

Morphogenèse normale et régénération sont parallèles.

La régénération des bras de Céphalopodes Octopodes est connue depuis Steenstrup (1856) et a fait l'objet de quelques études (Lange, 1920 ; May, 1933 ; Gallan, 1940).

Dans un travail antérieur, nous avons montré que la régénération post-traumatique des bras de *Sepia officinalis* Linné et de *Sepioloatlantica* d'Orbigny était possible. En nous basant sur les variations de la morphologie externe, nous avons déterminé six stades dans le processus régénératif des bras de ces Céphalopodes Décapodes (Féral, 1977 et 1978, 1).

Les Céphalopodes peuvent être considérés comme les Invertébrés les plus évolués. Par certains de leurs caractères, ils se rapprochent des Vertébrés inférieurs. L'anatomie de leurs systèmes circulatoire et nerveux les rend intéressants pour l'étude des mécanismes de la régénération. Ces deux systèmes, bien différenciés, sont accessibles à l'expérimentation.

Le système circulatoire diffère de celui des autres Mollusques bien qu'il en présente l'organisation fondamentale. Il est formé d'un réseau

(1). Les résultats présentés font partie d'une thèse de spécialité soutenue à l'Université P.-et-M.-Curie, Paris 6, le 1^{er} avril 1977.

important d'artères et de veines ; un système capillaire remplace les lacunes. Des cœurs branchiaux complètent l'action du cœur central formé de deux oreillettes et d'un ventricule. Le système circulatoire des Céphalopodes est clos.

Chez *Sepia officinalis*, chaque bras est parcouru sur toute sa longueur par une artère située près du cordon nerveux axial et est drainé par quatre veines : une veine brachiale principale encadrée de deux autres veines moins importantes du côté interne (oral) du bras et une veine brachiale aborale.

L'encéphale, enfermé dans une capsule cartilagineuse, a une structure médullaire (couche cellulaire périphérique et neuropile central). Ventouses et bras sont subordonnés à un centre moteur inférieur, situé dans la masse sous-œsophagienne, réglant les activités de l'animal. Il existe, d'autre part, dans la masse sus-œsophagienne, des centres moteurs supérieurs, qui coordonnent les différents mouvements. Les Céphalopodes ont un contrôle moteur hiérarchisé. Ils sont également capables d'intégrations sensorielles et mémorielles. Le cerveau des Céphalopodes les plus récents est le résultat d'une concentration de plusieurs anneaux péri-œsophagiens dont on trouve la disposition primitive chez le Nautilé.

Chez *Sepia officinalis*, le système nerveux brachial comprend un axe principal et six cordons latéraux moins importants dont la disposition des éléments cellulaires est analogue à celle des centres cérébraux.

Le système nerveux est très bien irrigué. Il existe un réseau d'espaces extracellulaires autour des vaisseaux dans le neuropile et des canaux entre les neurones et les cellules gliales. Ce réseau « glio-vasculaire » (Bogoraze et Cazal, 1944) est présent aussi bien dans le cerveau que dans la couche cellulaire et le neuropile des cordons nerveux des bras.

La névroglie a un rôle mécanique de soutien et de remplissage, un rôle possible d'isolation pour la conduction nerveuse et un rôle trophique (Gray, 1969).

Signalons enfin qu'il existe des centres neuro-sécréteurs qui pourraient avoir une action régulatrice pendant la régénération, au niveau du sinus buccal, de la veine cave antérieure et de la veine pharyngo-ophthalmique.

La structure du bras de *Sepia officinalis* est complexe (Fig. 1). Nous en avons fait une étude détaillée (Féral, 1977) complétant celle de Guérin (1908). Nous remarquerons seulement ici que les principaux systèmes sont concentriques avec, du centre à la périphérie : l'axe nerveux principal, une musculature très puissante séparée de l'axe nerveux et des téguments par deux gaines de tissu conjonctif riche en collagène, les téguments comprenant, un derme très bien irrigué contenant les chromatophores, les iridophores et les leucophores responsables de la coloration de l'animal et un épiderme unistratifié à bordure en brosse.

Dans cette note, nous présentons une vue d'ensemble des principales étapes histologiques et cytologiques de la régénération des bras de *Sepia officinalis*.

Matériel et méthodes

Pour cette étude, nous avons utilisé de jeunes *Sepia* (longueur dorsale du manteau = 2 à 5 cm), leur régénération étant plus rapide que celle d'adultes. L'influence de différents facteurs externes a été envisagée dans un travail précédent (Féral, 1978, 1).

Les juvéniles sont capturés au chalut ou à la senne, ou bien proviennent d'œufs éclos au laboratoire. Ils sont maintenus à une température de 16° C. L'amputation est pratiquée aux ciseaux fins entre le tiers et la moitié de la longueur du bras, après que les jeunes seiches aient été anesthésiées à l'éthanol à 2 p. 100 dans l'eau de mer.

Microscopie optique : Les bras sont fixés au liquide de Bouin et inclus en paraffine. Les blocs sont débités à 5 μ m d'épaisseur et les coupes sont colorées au trichrome de Masson ou de Ramon y Cajal, à l'azocarmin — aniline, au bleu alcian (pH 2,6) et au P.A.S.

Microscopie électronique : Les échantillons subissent la double fixation glutaraldéhyde 3 p. 100 — tétroxyde d'osmium 2 p. 100 dans du tampon cacodylate de sodium 0,4 M (pH 7,4) et du NaCl 0,3 M. Les coupes ultra-fines sont contrastées à l'acétate d'uranyle, puis au citrate de plomb (Reynolds, 1963). Les coupes semi-fines sont colorées au bleu de toluidine (pH 11).

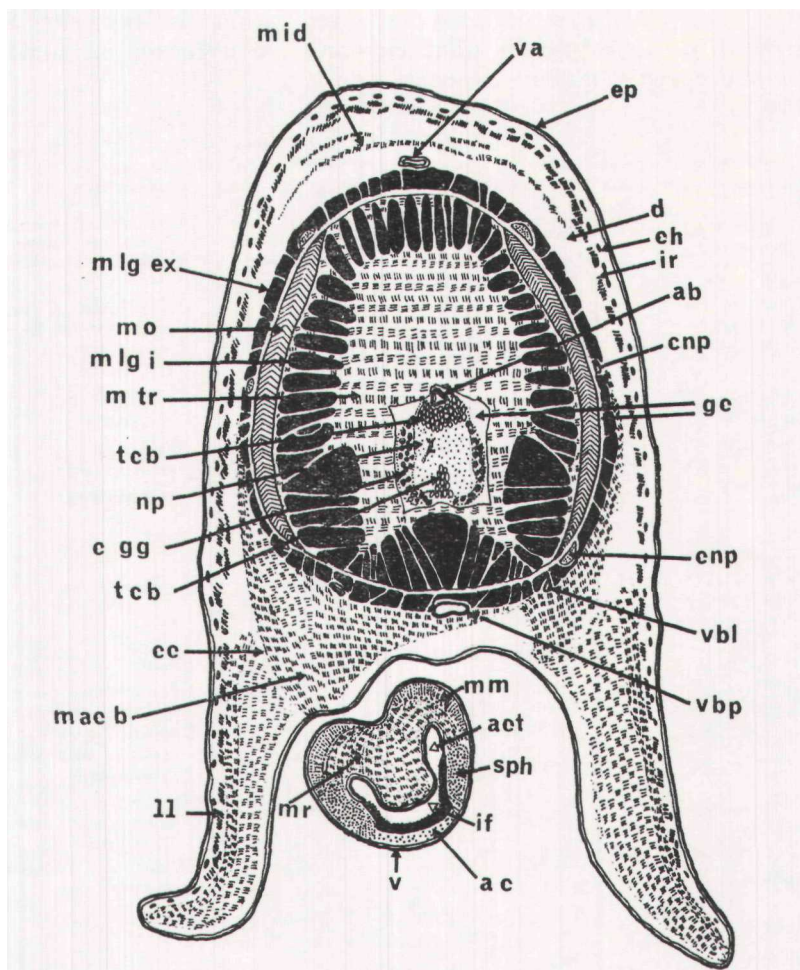


FIG. 1

Schéma d'une coupe transversale d'un bras de *Sepia officinalis*.

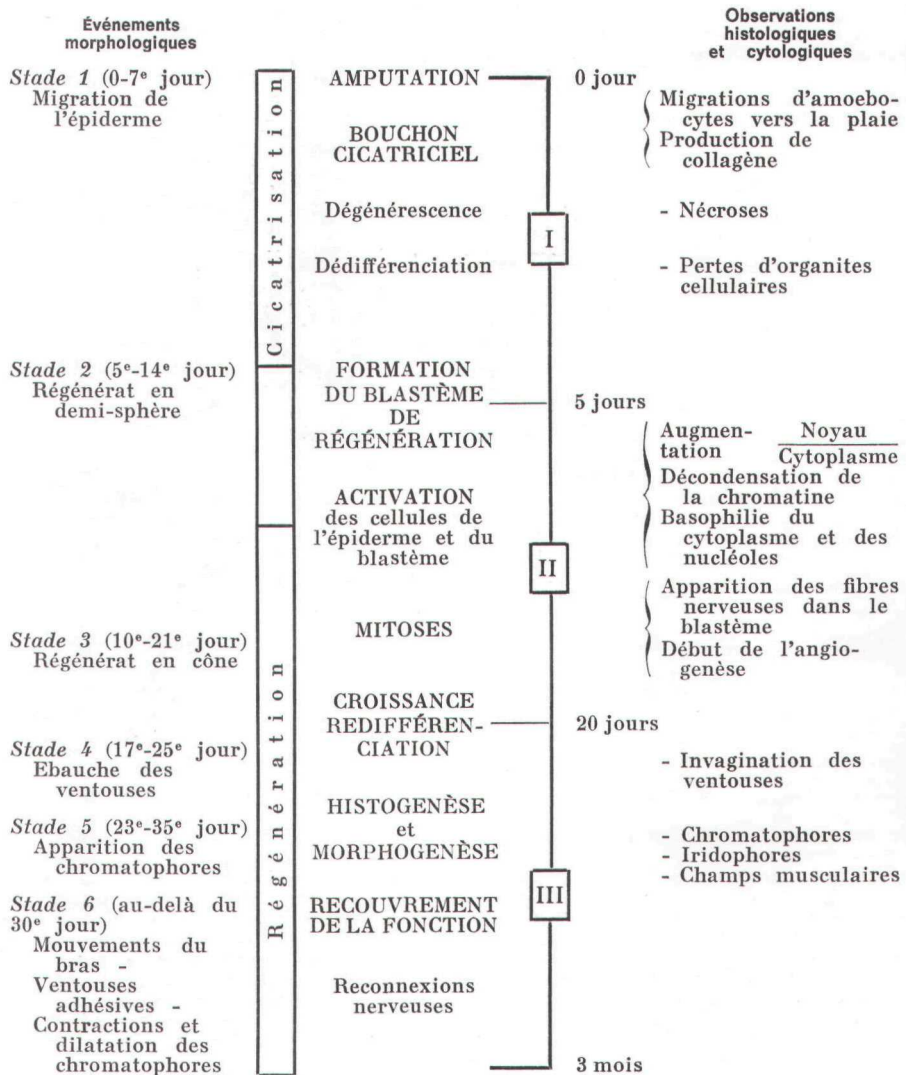
ab : artère brachiale ; *ac* : anneau corné ; *act* : acetabulum ; *ch* : couche à chromatophores ; *cnp* : cordon nerveux périphérique ; *egg* : couche ganglionnaire du cordon nerveux principal ; *ce* : couche conjonctive ; *d* : derme ; *ep* : épiderme ; *gc* : gaines conjonctives ; *if* : infundibulum ; *ir* : couche à iridophores et à leucophores ; *ll* : lame latérale ; *macb* : musculature acétabulo-brachiale ; *mid* : musculature intradermique ; *mlgex* : musculature longitudinale extrinsèque ; *mlgi* : musculature longitudinale intrinsèque ; *mm* : musculature méridienne ; *mo* : musculature oblique ; *mr* : musculature radiaire ; *mtr* : musculature transversale ; *np* : neuropile du cordon nerveux principal ; *sph* : sphincter ; *tcb* : prolongements des tractus cérébro-brachiaux ; *v* : ventouse ; *va* : veine brachiale aborale ; *vbl* : veine brachiale latérale ; *vbp* : veine brachiale principale.

RÉSULTATS

L'examen microscopique ne permet pas de délimiter avec précision les mêmes étapes que l'observation directe (Tableau 1 et Feraï, 1978, 1). Nous divisons la régénération du bras de *Sepia officinalis* en trois phases dont chacune recouvre un ou plusieurs des stades précédemment décrits.

TABLEAU 1

Rapports entre stades morphologiques et phases cytologiques au cours de la régénération des bras de jeunes *Sepia officinalis* à la température de 16° C.



Phase I :

Elle comprend les phénomènes de cicatrisation, de dégénérescence et de dédifférenciation (1). Elle correspond au stade 1' (0 au 7^e jour).

Après l'amputation, les muscles longitudinaux se contractent et l'axe nerveux principal est protubérant (Planche I, 2). La cicatrisation débute par la migration d'amœbocytes (2) (Planche I, 3) vers la blessure. Plusieurs voies d'accès sont utilisées : les vaisseaux, les cordons nerveux, les champs musculaires, le derme (Planche II, 6). Bien que le sang de Seiche ne contienne pas de fibrine et par conséquent ne puisse coaguler, au niveau de la lésion, les amœbocytes s'agglutinent et forment une masse plasmodiale qui isole les tissus du bras amputé du milieu extérieur et empêche le saignement (pseudo-caillot).

Au voisinage du derme essentiellement, une synthèse accrue de collagène est détectable (Planche I, 3). Un bouchon fibreux se forme au cours des premières 24 heures. Ces observations sont confirmées par la microscopie électronique (Planche II, 7 et 8) et l'analyse biochimique (Féral, 1978, 2).

Pendant les 5 à 7 premiers jours, les cellules de l'épiderme s'étalent et recouvrent totalement la blessure.

La dégénérescence des tissus qui ont été en contact avec le milieu extérieur commence immédiatement après la section, au niveau des cordons nerveux, des muscles et des vaisseaux sanguins. Elle reste localisée au voisinage de la blessure.

Les neurones du cordon axial dégèrent les premiers. Les péricaryons les plus proches de la plaie se nécrosent dans les heures qui suivent l'amputation. Ils disparaissent avant la formation du tissu cicatriciel. Au niveau du neuropile, ces faits se traduisent par l'apparition de lacunes nécrotiques (5 à 7 jours). On observe également une réaction des cellules de névroglie dont l'affinité pour les colorants diffère de celle du tissu glio-nerveux en bon état.

La dégénérescence du système musculaire est assez réduite. Le phénomène est surtout visible au niveau de la musculature longitudinale (3). Les cellules gonflent ou se scindent en masses sphériques ou ovalaires (Planche I, 5). Les fragments anucléés ne prennent plus les colorants ; ils finissent par disparaître.

Les vaisseaux sanguins s'altèrent aussi (Planche II, 7). Les organites des péricytes disparaissent, puis ces cellules et l'endothélium, quand il existe, se dilacèrent. Les tissus de l'extrémité du bras opéré ne sont plus irrigués correctement.

Au niveau du bouchon cicatriciel, le nettoyage des déchets cellulaires est effectué par des amœbocytes qui phagocytent des éléments de cellules nerveuses et musculaires (Planche II, 8).

D'autres cellules sanguines, ayant participé à la constitution du bouchon, se lysent. Elles perdent d'abord leurs granulations typiques ; d'énormes vacuoles apparaissent dans un cytoplasme en complète dislocation. Ce phénomène se déroule conjointement à l'arrivée des premières fibres nerveuses qui, ayant régénéré, prolongent les fibres coupées lors de l'amputation.

(1) Nous entendons par dédifférenciation le processus selon lequel une cellule spécialisée perd ses caractères morphologiques (et physiologiques) pour reprendre un aspect embryonnaire.

(2) Ces cellules sont les seuls éléments figurés du sang. Elles n'ont pas de rôle respiratoire. Elles existent sous forme circulante, sphérique, ou sous forme immobile, fusiforme, collées à la paroi des vaisseaux et des capillaires.

(3) Dans le bras de *Sepia officinalis*, on distingue la musculature intrinsèque de la musculature extrinsèque. La première est formée de muscles longitudinaux, transversaux et obliques ; elle est limitée par une gaine de tissu conjonctif. La seconde, à l'extérieur de la couche conjonctive, forme un anneau musculaire longitudinal que Guérin (1908) homologue à la musculature inter-brachiale. La dégénérescence concerne aussi bien la musculature intrinsèque que la musculature extrinsèque.

La dédifférenciation survient rapidement dans le bras amputé de *Sepia officinalis* et semble concerner toutes les catégories cellulaires proches de la plaie, hormis l'épiderme. Nous l'avons observé essentiellement dans le tissu musculaire, en-deçà de la zone de dégénérescence. Les cellules perdent leur structure striée oblique caractéristique. Cette sarcolyse est concomitante de la dégénérescence nerveuse et de celle des vaisseaux et des capillaires. Les fibrocytes du tissu conjonctif présentent des figures de type myélinique que nous interprétons comme un dernier stade de dégénérescence des organites cellulaires. Neurones et cellules gliales proches de la plaie retrouvent un aspect de cellules embryonnaires.

A la fin de la phase I, à l'extrémité du moignon, on note une morphologie identique de tous ces types cellulaires et des amœbocytes ayant participé à la formation du bouchon cicatriciel et qui auraient persisté. Ils ne sont plus clairement distinguables entre eux.

Les seules cellules à émigrer de régions plus ou moins éloignées de l'organisme sont les cellules amœboïdes sanguines. Les autres éléments du blastème proviennent de cellules dédifférenciées des tissus voisins de la plaie.

Les cellules épidermiques conservent la plupart de leurs caractères. Elles demeurent identifiables tout au long de la cicatrisation. Durant l'étalement, les liaisons cellulaires sont altérées. La membrane basale ne réapparaissant pas immédiatement, elles sont en contact avec le blastème.

Au cours de cette première phase, nous n'avons observé aucune mitose, ni dans l'épiderme, ni dans le blastème de régénération qui commence à s'édifier.

Phase II :

Elle comprend la formation du blastème, l'activation cellulaire, la croissance du régénérat. Les limites avec les phases I et III ne sont pas franches au niveau de la dédifférenciation et de l'activation, d'une part, et au niveau de la redifférenciation, d'autre part. Toutes les cellules ne sont pas synchrones. La deuxième phase marque le début de la régénération proprement dite. Elle correspond à la fin du stade 1, au stade 2 et à une partie du stade 3 (du 5^e au 20^e jour).

Le blastème de régénération se forme par accumulation de cellules dédifférenciées. Au cours des dix premiers jours, leur nombre augmente

PLANCHE I

Sepia officinalis

2. Coupe longitudinale médiane, légèrement oblique. Aspect du bras juste après l'amputation. Le nerf est protubérant (flèche). Il n'y a que très peu de noyaux d'amœbocytes visibles dans le neuropile.

nv : nerf d'une ventouse.

Bouin, Bleu alcian, X 300.

3. Coupe longitudinale médiane. 24 heures après l'amputation, les amœbocytes (am) émigrent vers la blessure et forment un bouchon cicatriciel (b). Au niveau du derme, on détecte un collagène (coll) abondant. Des signes de dégénérescence (étoiles) sont visibles dans le système musculaire.

gv : système glio-vasculaire.

Bouin, Azocarmin-aniline, X 300.

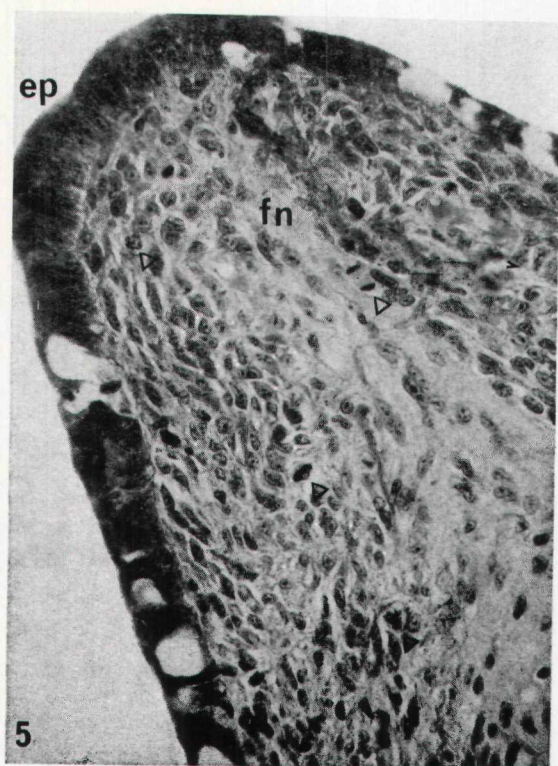
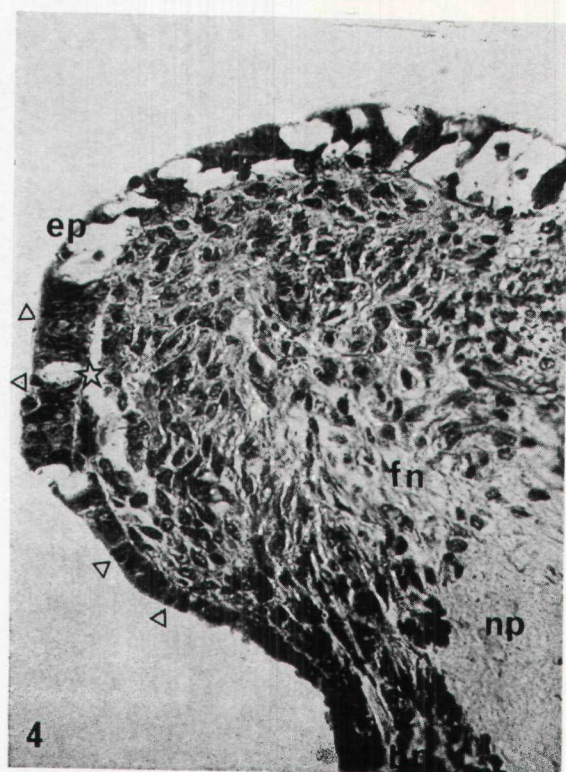
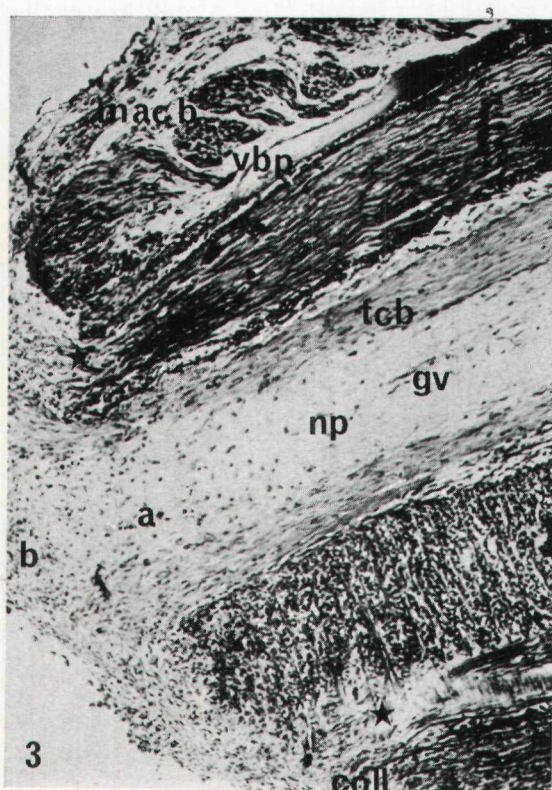
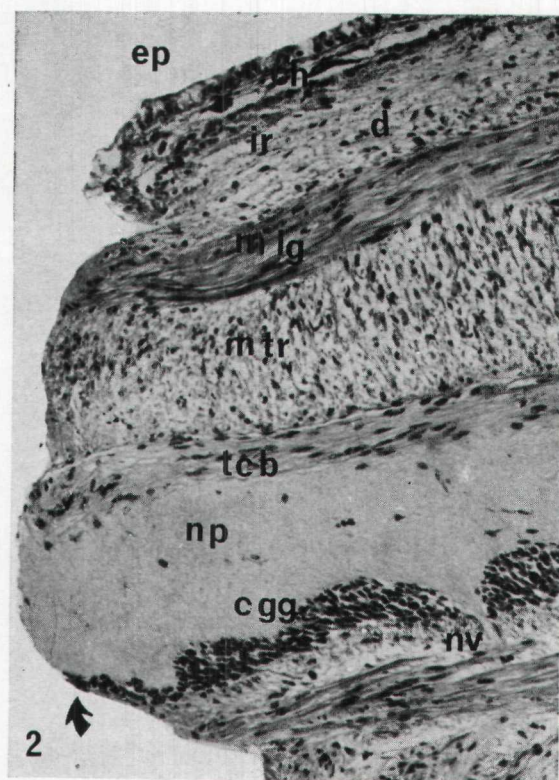
4. Coupe longitudinale médiane. Régénérat de 14 jours. Les fibres nerveuses (fn) régénérées ont envahi le blastème ; la veine brachiale (vbp) est visible sur ce cliché ; il est possible de voir plusieurs figures de mitose dans l'épiderme (flèches). L'étoile signale une cellule à mucus.

Bouin, Trichrome de Masson, X 1200.

5. Coupe longitudinale médiane. Régénérat de 20 jours. Les cellules du régénérat se divisent activement (flèches) et s'organisent concentriquement aux fibres nerveuses (fn). L'épiderme (ep) a retrouvé une allure normale.

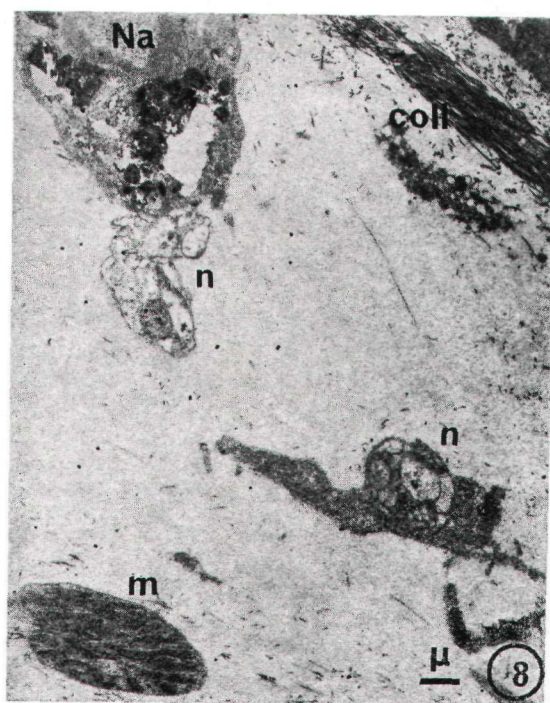
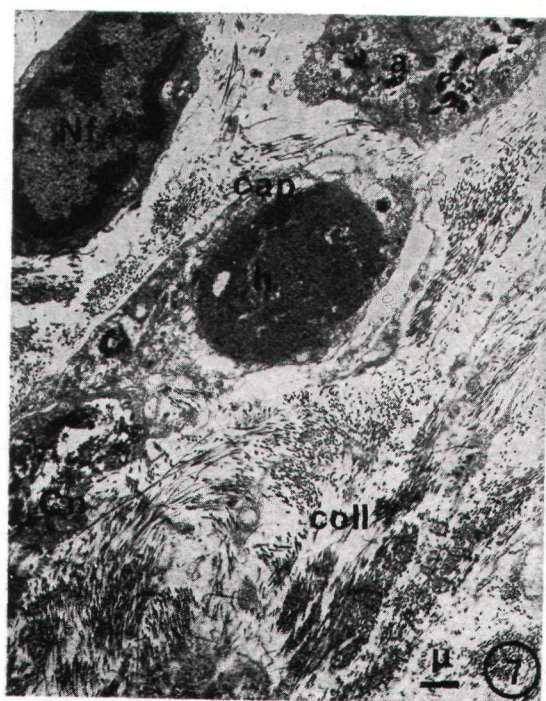
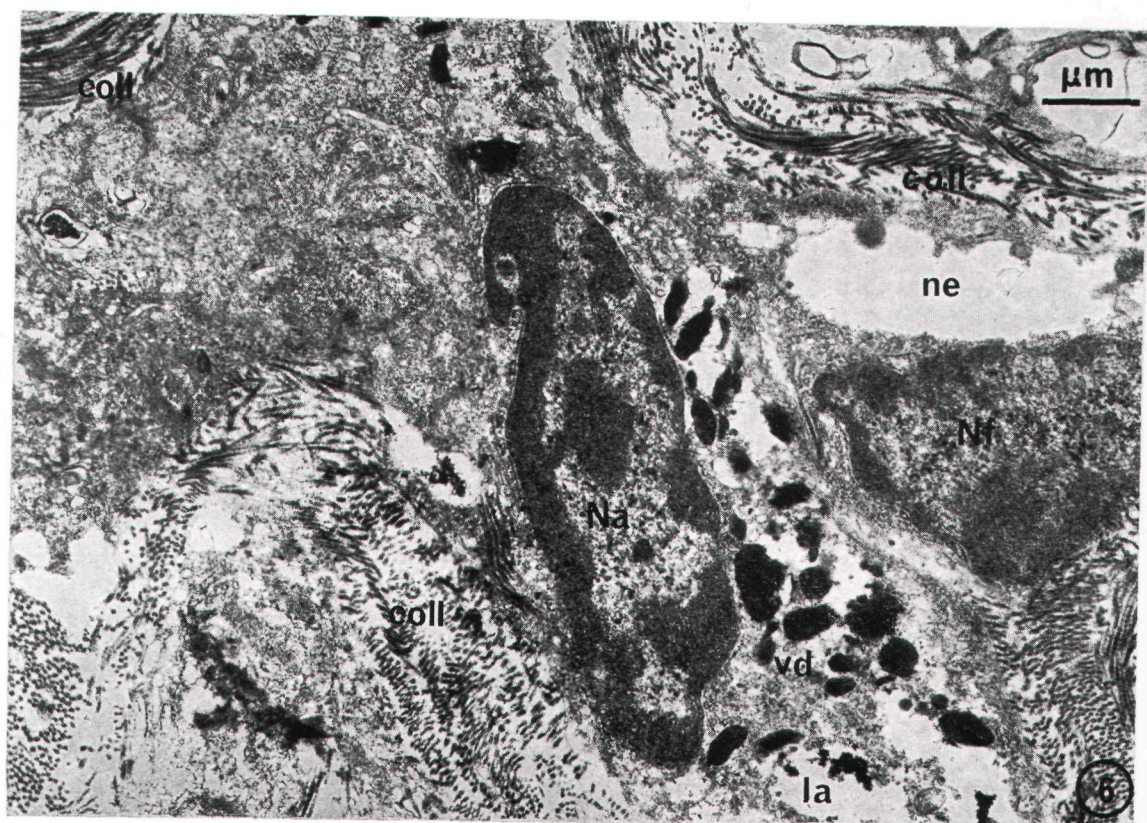
Bouin, Trichrome de Ramon y Cajal, X 1200.

Les abréviations sont les mêmes que pour la figure 1.



JEAN-PIERRE FÉRAL

PLANCHE I



JEAN-PIERRE FÉRAL

sans aucune mitose visible. Les améboocytes entrent, selon nos observations, pour une part dans la formation du blastème ainsi que les cellules musculaires, nerveuses, gliales, conjonctives, toutes dédifférenciées. La limite avec les tissus environnants est toujours nette.

Puis, les cellules sont activées. Elles changent d'aspect. Les noyaux des cellules du blastème et des cellules épidermiques s'arrondissent. Le rapport nucléoplasmique augmente. On observe une décondensation de la chromatine. Le cytoplasme devient de plus en plus basophile, de même que les nucléoles (coloration rouge au trichrome de Ramon y Cajal), indice de synthèse d'acides nucléiques, prémices nécessaires à la division cellulaire.

La croissance du régénérat commence. Les mitoses apparaissent à la fin de la deuxième semaine (Planche I, 4), quand les fibres nerveuses envahissent le blastème et que l'irrigation de celui-ci est rétablie. Des lacunes sanguines y sont d'abord visibles, puis les veines s'individualisent. L'artère brachiale progresse en même temps que le cordon nerveux axial, à travers le blastème (Planche III).

L'épiderme devient plus épais et apparaît pluristratifié ; mais, à la fin de la troisième semaine, il est à nouveau simple. Les cellules d'abord étalées deviennent cubiques, puis palissadiques (Planche I, 5).

Phase III :

Elle correspond à la croissance du bras et à la différenciation histologique. Après la troisième semaine, les mitoses se poursuivent mais deviennent de moins en moins fréquentes. Les cellules qui se sont divisées se différencient. Les premiers organes apparaissent. Cette phase regroupe la fin du stade 3, les stades 4 et 5 et le stade de reprise du fonctionnement (20^e jour au 3^e mois).

Pour certaines cellules, la différenciation commence au cours de la troisième semaine. Les cellules se spécialisent en rapport avec leur situation dans le blastème et leur place les unes par rapport aux autres.

La différenciation se fait par champs concentriques autour du cordon nerveux principal.

Le système nerveux est le premier à se différencier. Ce sont d'abord les fibres prolongeant les tractus cérébro-brachiaux qui pénètrent dans le blastème (Planche III) ; la couche ganglionnaire, formée par des neuroblastes qui se divisent, apparaît ensuite. Le neuropile est édifié peu à peu par les fibres émises par les neurones. Il est pratiquement

PLANCHE II *Sepia officinalis*

6. Améboocyte infiltré dans le tissu conjonctif proche de la plaie (20 heures après l'amputation). Son noyau (Na) possède une encoche. Son cytoplasme est plein de vésicules denses (vd) caractéristiques qui ont déjà plus ou moins fusionné. On y note aussi des lacunes (la). Le fibrocyte, dont on voit le noyau (Nf), est en très mauvais état (ne : nécrose). Le collagène (coll) est très abondant.

Glutaraldéhyde/OsO₄, X 12700.

7. Aspect de la cicatrice, proche du derme, 20 heures après l'amputation. Le collagène (coll) est très abondant. Les péricytes du capillaire sanguin (cap) sont complètement nécrosés, cependant il est plein de sang (h : hémocyanine). Le noyau d'un fibrocyte (Nf), encore en bon état, est visible. Un améboocyte (a) et une autre cellule (Cn) se nécrosent.

Glutaraldéhyde/OsO₄, X 5200.

8. Aspect de la cicatrice au niveau de l'axe nerveux principal, 20 heures après l'amputation. Le collagène (coll) est beaucoup moins abondant qu'au niveau du derme. Des éléments musculaires (m) et nerveux (n) vont être phagocytés par les améboocytes.

Glutaraldéhyde/OsO₄, X 5200.

inexistant à l'extrémité du cordon nerveux en régénération. Le neuropile gagne en épaisseur au fur et à mesure de la croissance.

Des cellules gliales soutiennent les fibres nerveuses en train de régénérer. Dès le vingtième jour, elles commencent à se diviser et à suivre la progression des axones. Durant ce processus, elles contiennent de très grosses mitochondries qui semblent se diviser.

Le système nerveux axial, l'artère brachiale et des muscles épineux se différencient conjointement (Planche III).

Au niveau du système musculaire, c'est la musculature longitudinale qui se développe d'abord. Les muscles résultent de l'alignement en rubans parallèles à l'axe nerveux de myoblastes fusiformes. Les cellules musculaires se différencient dans le prolongement des champs musculaires du moignon. Les myofilaments apparaissent très tôt. C'est vers le vingtième jour qu'il est possible de reconnaître les premières fibres de la musculature longitudinale intrinsèque. La gaine de collagène qui la limite à l'extérieur progresse en même temps qu'elle. La musculature longitudinale extrinsèque apparaît peu après, suivie de la musculature transversale. Celle-ci s'établit lentement entre la musculature longitudinale et l'axe nerveux. Elle n'occupe d'abord qu'une faible épaisseur. La musculature transversale est encore formée de myoblastes, alors que les cellules de la musculature longitudinale possèdent des myofilaments. Pendant le deuxième mois après l'opération, la musculature transversale s'épaissit, des mitoses y sont encore observables.

La musculature des ventouses (acétabulaire) se forme, la troisième semaine, par prolifération des faisceaux centraux. Au cours de l'invagination des chambres de la ventouse, les cellules musculaires forment d'abord une, puis plusieurs couches parallèles. Ces cellules constitueront les muscles radiaires et les sphincters.

La musculature acétabulo-brachiale se différencie à peu près en même temps que la ventouse. On observe, sous l'axe nerveux, du côté interne du bras, un îlot de myoblastes correspondant à chaque bourgeon des ventouses. De là, ils s'ordonnent en faisceaux et colonisent le pédoncule en formation.

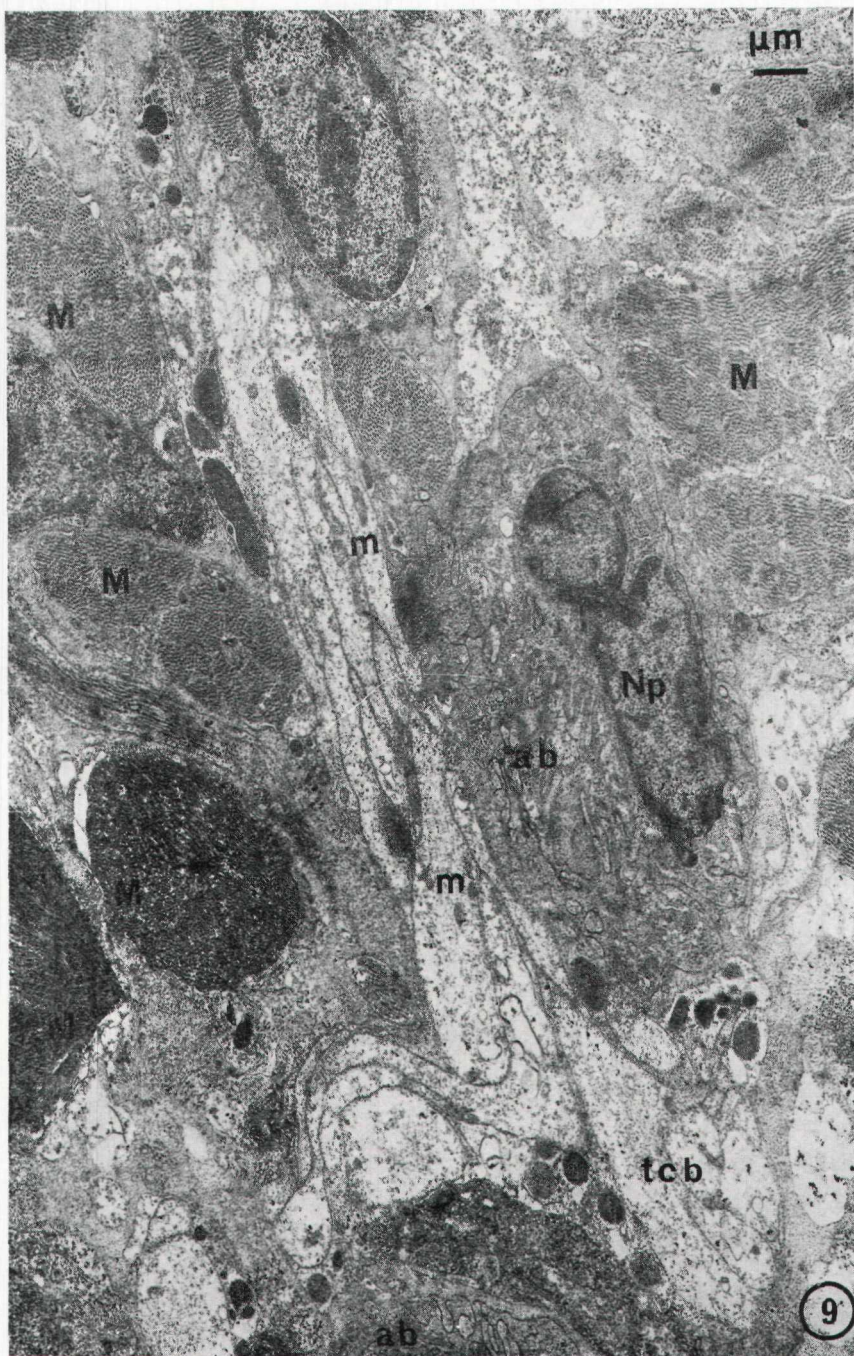
Les ventouses ne sont innervées que tardivement, après être complètement formées. Les premières apparues sur le moignon commencent à recevoir des fibres nerveuses vers le quarantième jour ; elles deviennent fonctionnelles à partir du troisième mois après l'opération.

Le derme est formé par les cellules les plus éloignées de l'axe longitudinal. Celles-ci nous semblent avoir pour origine des amœbocytes.

Parmi les fibroblastes, les chromatophores sont décelés sur coupes histologiques, avant d'être visibles de l'extérieur, grâce à la présence de quelques grains de pigment. C'est vers le vingtième jour que des cellules du derme en formation se différencient près de l'épiderme. Leur cytoplasme se scinde en plasmés externe et interne. Les grains de pigment apparaissent dans le plasmé interne.

Les iridophores sont reconnaissables quelques jours plus tard (25-27^e jour). Ils sont discernables dès que les plaquettes formant les iridosomes se sont différenciées. Elles se présentent d'abord sans orientation précise, puis elles se disposent parallèlement entre elles dans le cytoplasme de la cellule. Les fibres musculaires radiaires de ces deux organes se différencient au moment de la formation des muscles. L'innervation est plus tardive. Les nerfs qui vont aux chromatophores et aux iridophores sont émis par l'axe nerveux médian dès la fin de la troisième semaine mais la connexion ne se fait qu'à la fin du deuxième ou pendant le troisième mois après l'opération.

L'épiderme reste indépendant des autres tissus. La membrane basale des cellules épithéliales apparaît au moment de la différenciation. Au cours de la morphogenèse, il se plisse pour former les ébauches de ventouses, puis chacune d'elles s'individualise, s'invagine en donnant les chambres aspirante et adhérente. Ce phénomène est simultané à l'apparition de la veine brachiale principale dans le régénérat (3^e semaine).



JEAN-PIERRE FÉRAL

PLANCHE III
Sepia officinalis

9. Aspect du régénérat 27 jours après l'amputation. La coupe est sagittale. Elle est tangente à l'artère brachiale (ab) et aux fibres qui prolongent le tractus cérébrobrachial (tcb). On note la présence de mitochondries (m) dans le cytoplasme des axones. Tout autour de l'axe nerveux, la musculature (M) se différencie.
 Glutaraldéhyde/OsO₄, X 7200.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La régénération des bras de *Sepia officinalis* est complète. Elle va jusqu'au recouvrement de la fonction en deux mois et demi à trois mois chez les juvéniles à 16° C (Féral, 1978, 1). Elle est comparable à celle de Céphalopodes Octopodes comme *Octopus vulgaris* (Lange, 1920) et à celle d'autres Mollusques, mais aussi, jusqu'à un certain point, avec ce qui se passe chez les Amphibiens Urodèles. La queue de *Notophthalmus viridescens* régénère dans des laps de temps et avec une chronologie des événements (Iten et Bryant, 1976) équivalents à ceux observés chez la Seiche. Plusieurs auteurs, dont Revardel et Chapron (1975) et Donaldson et Wilson (1975), ont observé les rapports dans le temps qui existent entre l'évolution des systèmes nerveux et sanguin et les étapes de la régénération de membres d'Urodèles.

Phase I

La cicatrisation se fait grâce à l'agglutination de cellules et à la production de matériel fibreux chez *Sepia* comme chez *Octopus* (Lange, 1920). La migration de cellules sanguines au niveau de la blessure semble provoquée par le traumatisme. Plusieurs couches d'amoebocytes recouvrent totalement la plaie. Cette formation est ensuite renforcée par du collagène (Planche I, 3).

Le rôle des amoebocytes est similaire à celui qu'ils ont dans les réactions inflammatoires, naturelles ou expérimentales, décrites par Jullien et coll. (1951/2 et 1956) chez *Sepia* et *Octopus*. De même que chez le Poulpe (Lange, 1920) ou chez la Limace *Arion rufus* (Chétail, 1963) mais aussi chez le Triton (Iten et Bryant, 1976), les cellules épithéliales se déforment et s'étalent sur toute la surface du bouchon cicatriciel. L'épiderme est en contact direct avec les tissus sous-jacents, la membrane basale ne se reforme pas immédiatement. L'importance de ce fait a été soulignée en terme de régulation par Chapron (1974) pour les Amphibiens et par Fitzharris (1976) pour les Annélides.

Les cellules, lésées par la coupure, dégénèrent ainsi que, chez les Céphalopodes, les amoebocytes qui ont colmaté la plaie. Plus tard, quand les fibres nerveuses prolongeant les tractas cérébro-brachiaux arrivent au niveau du bouchon cicatriciel, certains amoebocytes dégénèrent. Cette action nécrotique du système nerveux sur le bouchon cicatriciel a déjà été signalé chez les Annélides. *Eisenia foetida*, en absence de chaîne nerveuse (Chapron, 1969) ou si la croissance de celle-ci est inhibée (Lechenault et Gontcharoff, 1973) ne régénère pas ; le bouchon cicatriciel reste en place.

La croissance des fibres nerveuses en régénération chez les Céphalopodes est comparable à celle des fibres nerveuses des Ver-

tébrés. Chez *Octopus vulgaris*, Sereni et Young (1932) ont évalué la vitesse de croissance de telles fibres à 7 à 18 $\mu\text{m/h}$ en été. La vitesse de régénération du bras est conditionnée par celle des fibres nerveuses.

Chez les Céphalopodes, la régénération nerveuse peut aller jusqu'à des reconnexiones spécifiques très fines. May (1933) l'a montré pour les ventouses d'*Octopus vulgaris*. Sanders et Young (1974) ont observé chez le Poulpe que deux mois et demi après la section unilatérale du nerf palléal qui commande les chromatophores (les animaux n'ont plus que la moitié du corps colorée), la peau du côté atteint recommence à changer de couleur en phase avec celle du côté intact et présente à nouveau les dessins caractéristiques de l'espèce, se modifiant en fonction de l'état psychologique.

Le nettoyage des débris cellulaires se fait par phagocytose (Fig. 8). Cette propriété des amœbocytes, répandue chez les Mollusques, a été démontrée chez les Céphalopodes par Martin et Barlow (1975).

La dédifférenciation est obligatoire pour que la régénération ait lieu. Elle est la source unique de cellules régénératrices, si on ne fait pas intervenir de cellules spécialisées, omnipotentes qui seraient en réserve. Seuls les amœbocytes émigrent vers la blessure et ce phénomène s'arrête avant la formation du blastème.

La dédifférenciation des tissus du bras de *Sepia officinalis* est en rapport, au moins dans le temps, avec l'arrêt de l'irrigation normale. Nous la considérons comme le résultat de la déficience transitoire de la vascularisation. Les autres Mollusques dont la circulation est lacunaire, n'offrent pas de points de comparaison. Par contre, les Amphibiens ont fait l'objet d'expériences mettant en évidence le rôle de la vascularisation. Smith et Wolpert (1975) et Revardel et Chapron (1975) ont montré, chez différents Urodèles, que, pendant la régénération de leurs membres, la dédifférenciation, la mise en place du blastème et sa multiplication dépendent de la vascularisation. Elle est un facteur du maintien de l'état différencié.

Phase II

Le blastème se forme par accumulation de cellules dédifférenciées, voisines de la plaie. L'origine de ces cellules, d'aspect embryonnaire, est difficile à définir. On ne peut donner les proportions respectives de cellules nerveuses, gliales, musculaires, conjonctives ou sanguines présentes dans ce blastème.

Comme dans tous les cas de régénération, avant de se diviser, les cellules du blastème sont activées. L'activation est une phase de préparation biochimique (synthèse d'acides nucléiques — ARN et ADN — et de protéines) nécessaire à la division cellulaire.

La multiplication des cellules du blastème est également en rapport dans le temps avec les systèmes nerveux et sanguin (Fig. 4). Chez les Amphibiens, Revardel et Chapron (1975) ont montré que

l'énervation, faite en respectant l'irrigation, ralentit la mise en place du blastème et que celui-ci ne peut pas grandir, mais il n'y a ni dédifférenciation, ni régression du membre de *Salamandra salamandra*. Chez *Triturus*, Donaldson et Wilson (1975) considèrent le système nerveux comme un activateur de mitoses. Il serait donc responsable de la croissance du blastème. Fitzharris (1976) a montré l'action directe, neurotrophique, du nerf sur la régénération de *Sabella*. Il a désorganisé réversiblement l'arrangement des microtubules des neurones par action de la colchicine. Cet alcaloïde n'arrête pas les neurosécrétions mais elles ne peuvent plus être transportées jusqu'au blastème. La régénération est perturbée et elle est plus lente.

Phase III

De même qu'il est difficile de préciser l'origine des cellules du blastème, il n'est guère possible d'affirmer quelles sont celles des cellules qui se redifférencient, après s'être divisées, au cours de cette phase de la régénération. Nous n'avons pour le moment que des indices topographiques. En pénétrant le blastème, l'axe nerveux repousse les cellules vers la périphérie de sorte que ce qui reste des amœbocytes se retrouve dans la position la plus externe. Cette observation a également été faite sur *Octopus* par Lange (1920). Cela implique la possibilité de la redifférenciation d'un type cellulaire (amœbocyte) en un autre (fibrocyte) après dédifférenciation. Jullien, Cardot, Ripplinger et Claudey (1956), en se basant sur des critères morphologiques, ont déjà émis cette hypothèse pour les cellules sanguines de *Sepia* et d'*Octopus*. Rifkin, Cheng et Rohl (1969) notèrent la similitude ultrastructurale entre fibroblastes et leucocytes de *Crassostrea virginica*. Pour eux, les différences de structures s'expliqueraient par les différences de fonction. Deux hypothèses ont été avancées : les deux types cellulaires dérivent d'un précurseur commun, ou bien, le leucocyte évolue en fibrocyte. Cette seconde hypothèse a pour origine le fait que des leucocytes d'Huître, cultivés *in vitro*, ont évolué en fibrocytes (Tripp, Bisignani et Kenny, 1966) et, qu'ainsi que Rifkin et Cheng (1968) l'ont montré, la capsule de fibrocytes n'apparaît qu'après infiltration de leucocytes chez *Crassostrea gigas* parasité par *Tylocephalum* sp. (Métacestode).

Chromatophores et iridophores se redifférencient obligatoirement à partir de cellules dédifférenciées d'un autre type. Il n'y a pas de migration de l'une ou l'autre catégorie cellulaire du moignon vers le régénérat. Un chromatophore a pour origine probable un amœbocyte ou un fibrocyte qui a pu exprimer une autre potentialité en fonction de sa place dans le blastème (près de l'épiderme) et par rapport aux autres cellules.

Nous avons constaté un parallèle entre la régénération et le développement embryonnaire des bras de *Sepia officinalis*. Les travaux sur l'embryogenèse de la Seiche sont peu nombreux. Les tables établies par Lemaire (1970) indiquent que l'épaississement ventral à l'origine des bras apparaît pendant la gastrulation. Leurs ébauches

s'individualisent puis se dédoublent ; celles des tentacules, plus longs, se développent le plus rapidement ; puis les ébauches des ventouses et enfin les chromatophores apparaissent. Fioroni (1963) a observé que les iridophores sont de formation encore plus tardive. Guérin (1908) a suivi l'histogenèse normale du bras de *Sepia*. Il signale que l'axe nerveux apparaît précocement. Cet auteur s'attache surtout à la description de la formation des différentes parties du système musculaire brachial. La succession des événements est équivalente à celle que nous avons observée lors de la morphogenèse expérimentale.

La régénération des bras de *Sepia officinalis* est un phénomène complexe qui se fait par épimorphose pour l'épiderme (à partir de cellules voisines et sans dédifférenciation) et par morphallaxie pour les autres tissus.

La régénération nécessite un apport de matériel cellulaire. Seuls les amœbocytes émigrent durant les premiers jours (cicatrisation). Mais, quand cette migration s'arrête, le nombre des cellules qui vont former le blastème ne cesse d'augmenter sans que des mitoses soient observables. Il y a une réorganisation cellulaire locale. Au voisinage de la plaie, les cellules qui sont trop endommagées dégèrent et sont éliminées. Les autres se dédifférencient, elles perdent leurs caractères propres et deviennent une source de cellules régénératives.

Nous n'avons pas encore pu préciser l'origine et l'évolution des cellules dédifférenciées. Il nous semble que cellules nerveuses et musculaires, après s'être dédifférenciées, se redifférencient en donnant les mêmes types. Nous n'avons pour cela que des arguments topographiques. Neuroblastes et myoblastes apparaissent dans le prolongement et sur les anciens champs nerveux et musculaires. Les cellules du tissu conjonctif (fibrocytes) peuvent avoir pour origine d'anciens fibrocytes ou des amœbocytes. Dans ce dernier cas, il y aurait dédifférenciation, division cellulaire et redifférenciation en un autre type ; ils exprimeraient donc une nouvelle potentialité histogénétique, comme c'est apparemment le cas chez les chromatophores et les iridophores. Les gènes correspondants, d'abord réprimés, ont la possibilité de s'exprimer au cours du processus régénératif, en relation avec l'environnement de la cellule considérée dans le régénérat.

Nous avons vu, d'autre part, que les différentes étapes de la régénération des bras de *Sepia officinalis* sont en rapport avec l'évolution des systèmes nerveux et sanguin. L'étude des mécanismes de la régénération et de ses régulations devrait en tenir compte ainsi que du rôle possible des centres neurosécréteurs.

Remarquons enfin que les limites entre les phases ne sont pas franches. Si la distinction de différentes étapes peut faciliter l'étude de la régénération en donnant des points de repère, elle ne correspond pas à la réalité biochimique. La régénération est un phénomène continu.

Summary

The principal steps of the post-traumatic regeneration of the arms in *Sepia officinalis* are described. In histological and cytological terms, three phases can be distinguished: I. wound healing (migration of blood cells and massive synthesis of collagen), spreading of epithelial cells on the wound, degeneration of the damaged cells and dedifferentiation of the cells lying close to the wound; II. formation of a blastema with the dedifferentiated cells, activation and mitotic multiplication of its cells and of the epidermis (growth phase); III. redifferentiation and morphogenesis.

These steps are correlated with regenerative processes of the nervous and vascular systems.

Chromatophores and iridophores do not originate from dedifferentiated cells formerly of the same type.

It is possible to draw a parallel between normal and experimental morphogenesis.

Zusammenfassung

Die wichtigsten Schritte der post-traumatischen Regeneration der Arme von *Sepia officinalis* werden beschrieben. Histologisch und cytologisch können 3 Phasen unterschieden werden: I. Verschluss der Wunde (Einwanderung von amöboiden Blutzellen und massive Kollagensynthese). Ausbreitung von Epithelzellen über der Wunde, Degeneration der zu stark zerstörten Zellen und Dedifferenzierung der in Wundnähe liegenden Zellen; II. Bildung eines Regenerationsblastems aus dedifferenzierten Zellen, Aktivierung und mitotische Vermehrung der Blastem- und der Epidermiszellen (Wachstumsphase); III. Redifferenzierung und Morphogenese.

Diese Phasen sind in zeitlicher Hinsicht mit regenerativen Prozessen des Nervensystems und des Blutgefäßsystems korreliert.

Chromatophoren und Iridophoren gehen nicht aus dedifferenzierten Zellen desselben Typs hervor.

Normale Morphogenese und Regeneration sind vergleichbare Prozesse.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- BOGORAZE, D. et CAZAL, P., 1944. — Recherches histologiques sur le système nerveux du Poulpe. Les neurones, le tissu interstitiel et les éléments neurocrines. *Arch. tool. exp. gén.*, 83, pp. 413-444.
- CALLAN, H.G., 1940. — The absence of a sex hormon controlling regeneration of the hectocotylus in *Octopus vulgaris* Lam. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli*, 18, pp. 15-19.
- CHAPRON, C., 1969. — Mécanisme de l'action du système nerveux au cours de la régénération céphalique chez le Lombricien *Eisenia foetida unicolor*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 269, Sér. D, pp. 604-607.
- CHAPRON, C., 1974. — Mise en évidence du rôle, dans la régénération des Amphibiens, d'une glycoprotéine sécrétée par la cape apicale: étude cytochimique et autoradiographique en microscopie électronique. *J. Embryol. exp. Morph.*, 32, pp. 133-145.
- CHÉTAIL, M., 1963. — Etude de la régénération du tentacule oculaire chez un Arionidae (*Arion rufus*) et un Limacidae (*Agriolimax agrestis*). *Arch. Anat. microsc. Morph. exp.*, 52, pp. 129-203.
- DONALDSON, D.J. et WILSON, J.L., 1975. — Dedifferentiation and mitotic activity in amputated newt tails locally deprived of the spinal cord (including a note on effects of amputation level on mitosis). *J. exp. Zool.*, 191, pp. 9-23.
- FÉRAL, J.-P., 1977. — La régénération des bras de *Sepia officinalis* L. (Mollusque, Céphalopode, Coléoloïde). *Thèse de spécialité*, Univ. P.-et-M.-Curie.

- FÉRAL, J.-P., 1978, 1. — La régénération des bras de la Seiche *Sepia officinalis* L. (Cephalopoda, Sepioidea). 1. Etude morphologique. *Cah. Biol. Mar.*, 19, pp. 355-361.
- FÉRAL, J.-P., 1978, 2. — The wound healing of the amputated arm of *Sepia officinalis* (Cephalopoda - Sepioidea), some cytological and biochemical aspects (à paraître).
- FIORONI, P., 1963. — Zur embryonalen und post-embryonalen Entwicklung der Epidermis bei Zehnarmigen Tintenfischen. *Verhändl. Naturf. Ges. Basel*, 74, pp. 149-160.
- FITZHARRIS, T.P., 1976. — Regeneration in Sabellid Annelids. *Amer. Zool.*, 16, pp. 593-616.
- GRAY, E.G., 1969. — Electron microscopy of the glio-vascular organization of the brain of *Octopus*. *Phil. Trans. R. Soc.*, 255, (B), pp. 13-32.
- GUÉRIN, J., 1908. — Contribution à l'étude de l'appareil tentaculaire des Céphalopodes. *Arch. Zool. exp. gén.*, 4, (B), pp. 1-178.
- ITEN, L.E. et BRYANT, S.V., 1976. — Stages of tail regeneration in the adult newt *Notophthalmus viridescens*. *J. exp. Zool.*, 196, (3), pp. 283-292.
- JULLIEN, A., JULLIEN, A.P. et RIPLINGER, J., 1951-52. — Etude histologique de tumeurs naturelles et d'inflammations expérimentales chez les Mollusques Céphalopodes. *Annl. scient. Univ. Besançon*, VI-VII, Zool. et Physiol., (1), pp. 1-39.
- JULLIEN, A., CARDOT, J., RIPLINGER, J. et CLAUDEY, P., 1956. — Réactions inflammatoires provoquées expérimentalement dans le foie des Céphalopodes Décapodes. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 243, Sér. D, pp. 456-458.
- LANGE, M.M., 1920. — On the regeneration and finer structure of the arms of the Cephalopode. *J. exp. Zool.*, 31, (1), pp. 1-57.
- LECHENAULT, H. et GONTCHAROFF, M., 1973. — Le métabolisme des acides nucléiques et des protéines au cours des six premiers jours de la régénération céphalique d'*Eisania foetida* (Sav.). *With. Roix's Arch. EntwMech. Org.*, 173, pp. 60-76.
- LEMAIRE, J., 1970. — Table de développement embryonnaire de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). *Bull. Soc. zool. France*, 95, (4), pp. 773-782.
- MARTIN, R. et BARLOW, J.J., 1975. — Muscle and gland cell degeneration in the *Octopus* posterior salivary gland (PSG) after 6-hydroxydopamine (6 OHDA) administration. *J. ultrastruc. Res.*, 52, pp. 167-178.
- MAY, R.M., 1933. — La formation des terminaisons nerveuses dans les ventouses du bras régénéré du Céphalopode *Octopus vulgaris* Lam. *Ann. St. oceanogr. Salammbo*, 7, pp. 1-15.
- REVARDEL, J.L. et CHAPRON, C., 1975. — Influence de la vascularisation sur la régénération des membres chez les larves d'Urodèles. Nouvelle interprétation du rôle du système nerveux. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 280, Sér. D, pp. 1409-1411.
- REYNOLDS, E.S., 1963. — The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17, pp. 208-213.
- RIFKIN, E. et CHENG, T.C., 1968. — The origin, structure and histochemical characterization of encapsulating cysts in the oyster *Crassostrea virginica* parasitized by the cestode *Tglocephalum* sp. *J. Invertebr. Pathol.*, 10, pp. 54-64.
- RIFKIN, E., CHENG, T.C. et ROHL, H.R., 1969. — An electron-microscope study of the constituents of encapsulating cyst in the american oyster *Crassostrea virginica*, formed in responses to *Tglocephalum* metacestods. *J. Invertebr. Pathol.*, 14, pp. 211-226.
- SANDERS, G. et YOUNG, J.Z., 1974. — Reappearance of specific colour patterns after nerve regeneration in *Octopus*. *Proc. R. Soc. London*, 186, (B), pp. 1-11.
- SERENÍ, E. et YOUNG, J.Z., 1932. — Nervous degeneration and regeneration in Cephalopods. *Pubbl. Sta. zool. Napoli*, 12, pp. 173-208.
- SMITH, A.R. et WOLPERT, L., 1975. — Nerves and angiogenesis in amphibian limb regeneration. *Nature*, 257, pp. 224-225.
- STEENSTRUP, J.J., 1856. — Hectocotyldannelsen hos Octopodoslægterne *Argonauta* og *Tremoctopus* oplyst ved lagtagelse af lignende dannelser hos black-sprutterne i Almindelighed. *K. danske Vidensk. Selsk., Skr.*, 5.R., 4 pp. 186-215, 2 pl.
- TRIPP, M.R., BISIGNANI, L.A. et KENNY, M.T., 1966. — Oyster amoebocytes in vitro. *J. Invert. Pathol.*, 8, pp. 137-140.