



**HAL**  
open science

# La régénération des bras de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode Coléoïdé)

Jean-Pierre Feral

► **To cite this version:**

Jean-Pierre Feral. La régénération des bras de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode Coléoïdé). Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris 6 (UPMC), 1977. Français. NNT: . tel-01541127

**HAL Id: tel-01541127**

**<https://hal.science/tel-01541127>**

Submitted on 17 Jun 2017

**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.

*1<sup>ère</sup> édition  
exemplaire*  
UNIVERSITE PIERRE et MARIE CURIE *Gontcharoff*

Paris 6

**THESE** présentée  
pour l'obtention du

**DIPLOME DE DOCTEUR DE SPECIALITE**

en **BIOLOGIE ANIMALE**  
mention **OCEANOGRAPHIE BIOLOGIQUE**

par **Jean-Pierre FERAL**

Sujet: La régénération des bras de *Sepia officinalis* L.  
( Mollusque Céphalopode Coléoïdé )

Soutenue le 1<sup>er</sup> avril 1977 devant la commission composée de :

M.	P. Bougis	président
M.	J.C. Lacroix	examineur
Mme.	K. Mangold	"
M.	P.M. Lenicque	rapporteur
M.	J. Bergerard	membre invité

## E R R A T U M

- p. 13 § C.1 : lire "... et BOLETZKY 1974 a ..."
- p. 17 3ème ligne : lire "... se font sur eux".
- p. 34 10ème ligne : lire "... la basale repose ..."
- p. 36 § B, 4ème ligne : fermer la parenthèse après "... la ventouse).
- p. 38 § b, 3ème ligne : lire "un ergastoplasme abondant",  
§ c, 8ème ligne : lire "... environ 300 et 500 Å),
- p. 50 17ème ligne : lire ... (300 Å et ...)
- p. 57 17ème ligne : lire (1965 et 1967 a et b) au lieu de (1965-1966)  
20ème ligne : lire "... le péristaltisme veineux permettrait ..."
- p. 60 10ème ligne : lire "... DILLY et al. 1972), de fonction ..."
- p. 76 § Remarque 10ème ligne : lire "... 7-8mm de l'extrémité). Quand..."
- p. 103 et 105 : lire dans les 2 tableaux µg au lieu de ug
- p. 110 dernière ligne : lire " (>50 000 daltons)
- p. 131 11ème ligne : lire "... BOLETZKY, 1974 b,"
- p. 134 27ème ligne : lire "... (FRENCH et al. 1976)..."

UNIVERSITE PIERRE et MARIE CURIE

Paris 6

**THESE** présentée

pour l'obtention du

**DIPLOME DE DOCTEUR DE SPECIALITE**

en **BIOLOGIE ANIMALE**

mention **OCEANOGRAPHIE BIOLOGIQUE**

par **Jean-Pierre FERAL**

**Sujet: La régénération des bras de Sepia officinalis L.**

**( Mollusque Céphalopode Coléoïdé )**

**Soutenue le 1977 devant la commission composée de :**

<b>M.</b>	<b>P. Bougis</b>	<b>président</b>
<b>M.</b>	<b>J.C. Lacroix</b>	<b>examineur</b>
<b>Mme.</b>	<b>K. Mangold</b>	<b>"</b>
<b>M.</b>	<b>P.M. Lenicque</b>	<b>rapporteur</b>
<b>M.</b>	<b>J. Bergerard</b>	<b>membre invité</b>

*J'adresse mes remerciements aux équipages du "MYSIS" et de l'"OBELIA", aux techniciens et aux chercheurs ainsi qu'à tous les amis qui m'ont apporté leur aide aussi bien à PARIS qu'à ROSCOFF.*

*Si j'ai pu terminer mes études, c'est en partie grâce à Monsieur P.M. LENICQUE qui m'a offert la possibilité de travailler avec lui comme technicien au laboratoire de biologie des Invertébrés marins (Museum - PARIS). C'est lui qui, en m'associant à ses travaux sur la régénération, m'a initié à la recherche. Il a bien voulu accepter de diriger cette thèse avec Madame K. MANGOLD, qui anime l'équipe de teuthologie du laboratoire ARAGO à BANYULS-sur-MER.*

*Je leur exprime ici toute ma gratitude pour les encouragements et les conseils qu'ils m'ont prodigués tout au long de ce travail.*

*Je voudrais également assurer de ma gratitude, Monsieur le Professeur J. BERGERARD, pour avoir mis à ma disposition les installations de la station biologique de ROSCOFF. Cela m'a permis d'effectuer mon travail en contact avec d'autres chercheurs, en particulier avec Renata BOUCHER, qui travaille sur le même matériel. Monsieur J. BERGERARD, me fait l'honneur de juger cette thèse.*

*Ma reconnaissance va aussi à Monsieur le Professeur P. BOUGIS et Monsieur J.C. LACROIX, Maître de conférence, qui, malgré leurs multiples occupations, ont accepté de faire partie du jury.*

*Je remercie également :*

- pour ses fructueux conseils, Monsieur le Professeur C. LEVI, qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui a lu le manuscrit de cette thèse ;*
- Madame P. LEVI et Michel VAN PRAET, qui m'ont apporté leur aide pour la microscopie électronique ;*
- Monsieur FAUBERT, pour la réalisation des photographies.*

*Enfin, une pensée affectueuse va à mon épouse et à mes parents qui m'ont apporté leur soutien moral et financier.*

## S O M M A I R E

	Pages
INTRODUCTION . . . . .	1
Principales observations et travaux effectués sur la régénération des Céphalopodes . . . . .	4
CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODES	
I <u>RECOLTES</u> . . . . .	8
II <u>ELEVAGES</u> . . . . .	10
A - Bacs . . . . .	10
B - Facteurs abiotiques . . . . .	10
1 - Lumière . . . . .	10
2 - Température . . . . .	11
3 - Oxygénation . . . . .	11
4 - Autres facteurs . . . . .	13
C - Facteurs biotiques . . . . .	13
1 - Nourriture . . . . .	13
2 - Compétition - Densité d'élevage . . . . .	14
III <u>ANESTHESIE</u> . . . . .	15
IV <u>MODE OPERATOIRE</u> . . . . .	16
V <u>HISTOLOGIE ET CYTOLOGIE</u> . . . . .	17
A - Microscopie optique . . . . .	17
B - Microscopie électronique . . . . .	17
VI <u>MARQUAGE RADIOACTIF</u> . . . . .	18
A - Molécule utilisée . . . . .	18

B - Méthodes de marquage . . . . .	18
1 - Injections . . . . .	18
2 - Bains . . . . .	18
C - Comptages en scintillation liquide . . . . .	19
VII <u>ETUDE DES PROTEINES DU REGENERAT</u> . . . . .	21
A - Précipitation des protéines et isolement du collagène	21
B - Dosage des protéines . . . . .	21
1 - Réactifs . . . . .	21
2 - Mode opératoire . . . . .	23
VIII <u>ELECTROPHORESES (serum)</u> . . . . .	23
A - "Disc-électrophorèse" . . . . .	23
1 - Solutions pour la fabrication des gels . . . . .	23
2 - Fabrication des gels . . . . .	24
3 - Migration . . . . .	25
4 - Coloration . . . . .	25
a) Protéines totales . . . . .	25
b) Cuprotéines . . . . .	26
c) Glycoprotéines . . . . .	26
d) Lipoprotéines . . . . .	27
B - Electrophorèse en gel de S D S polyacrylamide . . . . .	27
1 - Préparation des échantillons . . . . .	28
2 - Préparation des tubes et dépôt des échantillons . . . . .	28
C - Electrophorèse en gel à gradient de polyacrylamide . . . . .	29
CHAPITRE 2 : LA STRUCTURE DU BRAS DE <i>SEPIA OFFICINALIS</i>	
I <u>HISTORIQUE</u> . . . . .	30
II <u>CARACTERES EXTERNES</u> . . . . .	32
III <u>ETUDE ANATOMIQUE, HISTOLOGIQUE ET CYTOLOGIQUE</u> . . . . .	32
A - L'épiderme . . . . .	34

	Pages
B - Le derme . . . . .	36
1 - Le tissu conjonctif . . . . .	36
a) La substance fondamentale . . . . .	38
b) Les cellules . . . . .	38
c) Les fibres de collagène . . . . .	38
2 - La coloration de la peau . . . . .	40
a) Les chromatophores . . . . .	42
b) Les iridophores . . . . .	42
C - Le système musculaire . . . . .	43
1 - La musculature intrinsèque . . . . .	43
2 - Les muscles de la ventouse . . . . .	45
3 - La musculature acétabulo-brachiale . . . . .	45
4 - La musculature extrinsèque . . . . .	46
5 - Les lames marginales . . . . .	46
6 - La cellule musculaire . . . . .	47
D - Le système nerveux brachial . . . . .	50
1 - Le cordon nerveux axial . . . . .	51
2 - Les tractus cérébro-brachiaux . . . . .	52
3 - Les cordons nerveux intra-musculaires . . . . .	52
4 - L'innervation des ventouses . . . . .	52
5 - La cellule nerveuse . . . . .	52
E - Le système sanguin . . . . .	55
1 - Les vaisseaux . . . . .	55
2 - L'innervation des vaisseaux . . . . .	57
3 - Les cellules . . . . .	59
a) Les cellules endothéliales . . . . .	59
b) Les péricytes . . . . .	59
c) Les amoebocytes . . . . .	60
F - La névroglie . . . . .	62

CHAPITRE 3 : ETUDE DE LA REGENERATION DU BRAS DE *SEPIA*  
*OFFICINALIS*

I EVOLUTION DE LA MORPHOLOGIE EXTERNE

A - Evénements morphologiques . . . . .	64
---	----

B - Facteurs influençant la régénération . . . . .	66
1 - Nature de l'amputation . . . . .	66
a) Bras et tentacules . . . . .	66
b) Nageoire . . . . .	67
c) Région du rostre et sésion . . . . .	67
d) Autres parties du corps . . . . .	68
2 - Niveau de l'amputation . . . . .	68
3 - Etat physiologique . . . . .	68
a) Influence de l'âge . . . . .	68
b) Influence de l'état général . . . . .	69
$\alpha$ -Expérimentation . . . . .	69
$\beta$ -Analyse des résultats . . . . .	70
4 - Rôle de la température . . . . .	72
a) 10°C . . . . .	72
b) 14°C . . . . .	72
c) 16°C . . . . .	74
d) 19°C . . . . .	76
II <u>ETUDE HISTOLOGIQUE ET CYTOLOGIQUE</u> . . . . .	78
A - Cicatrisation . . . . .	78
1 - Le tissu cicatriciel . . . . .	78
a) Les amœbocytes . . . . .	78
b) Le collagène . . . . .	80
2 - L'épiderme . . . . .	80
B - La dégénérescence des tissus . . . . .	82
1 - Le tissu nerveux . . . . .	82
2 - Le tissu musculaire . . . . .	85
3 - Les amœbocytes . . . . .	88
4 - Les autres tissus . . . . .	88
C - Le blastème de régénération . . . . .	88
1 - La formation . . . . .	88
2 - L'activation . . . . .	90
D - La régénération . . . . .	90
1 - L'épiderme . . . . .	90

	Pages
2 - Le derme . . . . .	92
a) Le tissu conjonctif . . . . .	92
b) Les chromatophores et les iridophores . . . . .	92
3 - Le système musculaire . . . . .	95
a) Les musculatures intrinsèque et extrinsèque . . . . .	95
b) La musculature acétabulaire . . . . .	96
4 - Le système nerveux et la névroglie . . . . .	96
5 - Le système sanguin . . . . .	98
III <u>VARIATIONS DE LA TENEUR EN COLLAGÈNE DU BRAS ET DES PROTÉINES</u> <u>SÉRIQUES AU COURS DE LA CICATRISATION ET DE LA RÉGÉNÉRATION, .</u>	102
A - Dosage du collagène . . . . .	102
1 - Expérience à 14°C . . . . .	102
2 - Expérience à 10°C . . . . .	102
B - Comptage en scintillation liquide . . . . .	108
1 - La radioactivité liée au collagène . . . . .	108
2 - La radioactivité liée aux autres protéines . . . . .	108
C - Electrophorèses du sang de <i>Sepia officinalis</i> . . . . .	110
IV <u>ÉTUDE DE LA CROISSANCE DU RÉGÉNÉRAT DU BRAS DE <i>SEPIA</i></u> <u><i>OFFICINALIS</i> . . . . .</u>	114
A - Définition du bras de référence . . . . .	114
B - Croissance du régénérat pendant les deux premiers mois . . . . .	118
DISCUSSION ET CONCLUSION . . . . .	120
RESUME . . . . .	135
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

# INTRODUCTION

La régénération concerne tout le règne animal, dans des proportions diverses, en fonction, semble-t-il, du degré d'évolution de l'espèce envisagée. La régénération est plus souvent le fait d'Invertébrés, et parmi ceux-ci, de ceux à reproduction asexuée. Mais les embryons de Vertébrés (oiseaux, mammifères) ont un grand pouvoir de régulation et peuvent remplacer des parties amputées.

On peut définir la régénération comme ... "la restauration, la reconstitution ou la formation d'un organe après usure, lésion ou perte accidentelle". (LENDER 1974). La régénération est physiologique, si elle est la réponse à des perturbations internes de l'organisme. Elle est traumatique, si elle est la réponse à une agression due à un agent extérieur : blessure, amputation, parasite. Il faut noter aussi l'existence d'une régénération dite compensatrice d'organe comme le foie, le pancréas ou le rein qui aboutit non pas à la restauration, mais à une hypertrophie des lobes du foie, du pancréas ou du rein restant.

La régénération nécessite un apport de matériel cellulaire. Pour certains auteurs il y aurait des migrations de cellules spécialisées, totipotentes, qui seraient en réserve. Il semble que le plus souvent, il y ait une dédifférenciation de cellules voisines de la blessure. Elle est considérée comme la source de cellules de régénération. Cette dédifférenciation est le fait d'enzymes synthétisés par les cellules touchées par l'amputation, en réponse au traumatisme. Avant la redifférenciation, il y a une duplication de l'ADN. Ce fait est caractéristique. Les cellules capables de se différencier se divisent d'abord. Morphologiquement, l'"activation" se traduit par l'augmentation du rapport nucléoplasmique (présence d'un gros noyau avec un nucléole très visible et d'un cytoplasme réduit). Après division, les cellules se différencient en général en conservant leur spécificité histogénétique. La différenciation s'exprime en fonction du milieu cellulaire et hormonal.

Les contrôles de la régénération peuvent être des contrôles à distance, nerveux ou hormonaux, ou bien ils peuvent émaner du voisinage de la blessure. Il semble que les deux types se rencontrent.

Le système nerveux peut avoir un rôle neurotrophique (action directe, humorale ou électrophysiologique, du nerf sur les tissus à proximité) ou un rôle neurosécrétoire (production spécifique de substances par des cellules nerveuses spécialisées, suivie de leur libération dans la circulation pour être transportées à la cible). Le tissu nerveux induit la régénération. Son action semble être de nature quantitative, les cellules du blastème devant être programmées pour répondre à un niveau donné d'hormones. Les mécanismes de base, cellulaires et extracellulaires par lesquels le nerf agit, sont encore inconnus.

Le système sanguin, au moins chez les Vertébrés, semble avoir une grande importance dans le maintien de l'état différencié et dans la régénération. C'est en particulier le manque d'irrigation qui est un des facteurs de la dédifférenciation cellulaire. Dans certains cas, on a observé une relation temporelle entre la régénération du nerf, le développement de la membrane basale et la formation des vaisseaux sanguins. Mais une relation de cause à effet entre ces phénomènes n'a pas encore été prouvée.

Nous avons pensé que les Céphalopodes pouvaient aider à répondre à quelques unes de ces questions. Ce sont les Invertébrés les plus évolués dont PACKARD (1972) a établi la convergence avec les Poissons. Les Céphalopodes se singularisent à l'intérieur de l'embranchement des Mollusques par le haut degré d'évolution de leur système nerveux. Le cerveau des Céphalopodes est le résultat de la condensation des ganglions typiques des Mollusques. Les Céphalopodes ont en plus développé de nouvelles formations comme le ganglion brachial. Les bras sont innervés par d'énormes cordons nerveux composés en partie par une couche ganglionnaire sur toute leur longueur. De plus, chaque ventouse possède son propre ganglion. Cette structure donne au bras une remarquable autonomie vis-à-vis des centres nerveux supérieurs.

Une autre caractéristique des Céphalopodes est leur système circulatoire clos et le volume sanguin important.

Ces traits évolutifs chez un Invertébré sont importants du point de vue expérimental, car tous les organes sont individualisés et accessibles, en particulier, le cerveau, pour l'étude des variations des neuro-sécrétions, et le sang. De plus, la symétrie du système brachial donne la possibilité de disposer de bras témoins sur le même individu.

Après avoir passé en revue les travaux existants sur la régénération des Céphalopodes, choisi le matériel et les techniques adéquates (chapitre 1), nous avons d'abord étudié la structure normale du bras de *Sepia officinalis* (chapitre 2). Cette étude a été faite à partir d'observations personnelles, confrontées avec des études antérieures sur la Seiche et d'autres Céphalopodes. Puis nous sommes intervenu expérimentalement et avons suivi les événements morphologiques et cytologiques liés à la régénération, de même que le métabolisme du collagène et les variations éventuelles des protéines sériques (chapitre 3). Une étude de la croissance du régénérat complète ce dernier chapitre.

PRINCIPALES OBSERVATIONS ET TRAVAUX EFFECTUES  
SUR LA REGENERATION DES CEPHALOPODES

Les Céphalopodes sont cités de longue date pour la capacité de régénération de leur bras. Ce phénomène est d'observation courante chez les Octopodes, et n'a jamais été contesté. Il est décrit dès 1856 par STEENSTRUP. La première étude expérimentale remonte à 1920. Elle a été faite sur *Octopus vulgaris* par LANGE. STEENSTRUP (1856) et BROCK (1886) nient la possibilité de régénération chez les Céphalopodes décapodes, comme le fera LANGE en ce qui concerne les bras de *Sepia officinalis*. Cependant, elle parle d'une possible régénération compensatrice qui serait due à la croissance d'un des bras buccaux.

Pourtant, VERRIL (1881 et 1882) observe des remplacements de ventouses ou même de parties du bras tentaculaire de plusieurs Teuthoïdés. ADAM (1937), signale la régénération du tentacule d'un exemplaire de *Sepio-teuthis lessoniana*. Enfin, ALDRICH et al., (1968) découvrent un cas de régénération d'un tentacule sur un spécimen de Calmar géant, *Architeuthis dux*, de 1,85m de longueur dorsale de manteau (LDM).

A côté de ces exemples de régénération traumatique, il existe des cas de régénération physiologique après autotomie. PELSENEER (1897) pose le problème du bras hectocotyle d'*Argonauta*. PORTMANN (1952) celui des bras dorsaux de *Tremoctopus violaceus*. A ceci, on peut ajouter l'hectocotyle d'*Ocythoe* et de *Tremoctopus*. RIGGENBACH parle de régénération lente des bras perdus par autotomie d'*Octopus defilippii*.

Les expériences sont peu nombreuses sur la régénération d'organes de Céphalopodes. LANGE a amputé des bras d'*Octopus vulgaris*, d'*Eledone cirrosa*, de *Sepia officinalis*. Elle a décrit pour les deux premiers, les événements morphologiques et cytologiques. En 1933, MAY a étudié la formation des terminaisons nerveuses dans la ventouse du bras régénéré d'*Octopus vulgaris*. En 1940, CALLAN a recherché si la castration d'un mâle d'*Octopus vulgaris*, avait un effet sur la régénération et la différenciation de son bras hectocotyle préalablement amputé.

Les expériences sur les Sepioïdés n'ont jamais été poussées très loin, car les animaux mourraient avant d'avoir donné un signe d'une quelconque capacité de régénération. C'est le cas de la tentative de LANGE (1920) sur *Sepia officinalis*. Un travail préliminaire effectué à Roscoff, en automne 1975, nous a permis de vérifier que *Sepia officinalis* est capable de régénérer ses bras.

Il faut signaler d'autre part que, dans la nature, les Calmars *Loligo forbesi* et *Loligo vulgaris*, présentent assez souvent des stades de régénération des bras et des tentacules. Nous n'avons rien observé sur *Alloteuthis*.

En ce qui concerne *Sepia officinalis*, les adultes sont relativement peu nombreux à régénérer leur bras (2 à 3%) alors que ceux des juvéniles (LDM 2 à 5 cm) régénèrent dans une proportion de 15% (Fig. 1). Ce phénomène n'est donc pas négligeable.

Les principales observations et expériences sur la régénération des Céphalopodes sont rassemblées dans le tableau 1.

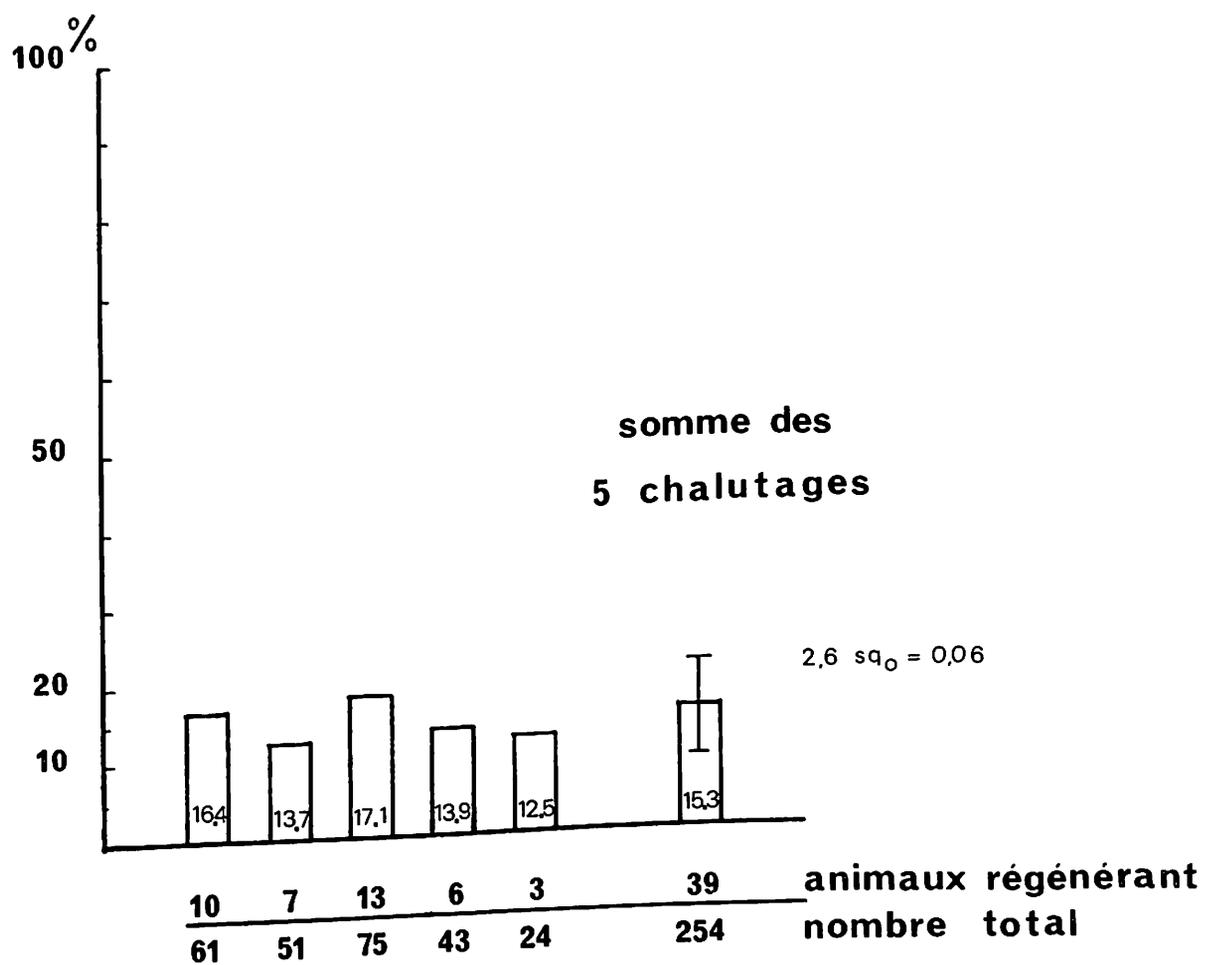


Figure 1 : Pourcentage d'animaux (LDM = 1,5 à 7 cm) en train de régénérer au moment de leur capture au chalut à perche dans l'estuaire de la Penzé en automne 1976

LDM = longueur dorsale du manteau

$2,6 \text{ sq}_0$  = intervalle de confiance au seuil de 99%

ORGANES AMPUTES	ESPECES	AUTEURS
Bras	<i>Octopus sp.</i>	J.J. STEENSTRUP (1856)
Ventouses Bras sessiles Tentacules	<i>Loligo pealei</i> (Lesueur) var. <i>pallida</i> <i>Ommastrephes illecebrosus</i> (Lesueur)	A.E. VERRIL (1881)
Bras dorsal et latéral	<i>Architeuthis harveyi</i> (Verrill)	A.E. VERRIL (1882)
Bras Bras hectocotyle	<i>Octopus fusiformis n. sp.</i> <i>Octopus inconspicuus n. sp.</i> <i>Octopus cuvieri</i>	J. BROCK (1886)
Bras bifides	<i>Octopus vulgaris</i> (Lamark) <i>Eledone aldrovandi</i>	C. PARONA (1900)
Bras bifides	<i>Vitreledonella richardi</i> (Joubin)	L. JOUBIN (1900)
Régénération après autotomie	<i>Octopus defilippii</i>	E. RIGGENBACH (1901)
Bras bifides	<i>Octopus vulgaris</i> (Lamark) <i>Eledone moschata</i> (Lamark)	B. HANKO (1913)
Bras	<i>Eledone cirrosa</i> <i>Octopus vulgaris</i> (Lamark) ( <i>Sepia officinalis</i> (Linné))	M. LANGE <sup>☆</sup> (1920)
Bras bifides	<i>Cuciotheuthis unguiculata</i> (Steenstrup)	L. JOUBIN (1924)
Ventouses Bras	<i>Octopus vulgaris</i> (Lamark)	R.M. MAY <sup>☆</sup> (1933)
Tentacules	<i>Sepioteuthis lessoniana</i> (Lesson)	W. ADAM (1937)
Bras hectocotyle Bras	<i>Octopus vulgaris</i> (Lamark)	H.G. CALLAN <sup>☆</sup> (1940)
Autotomie bras dorsaux	<i>Tremoctopus violaceus</i> (Delle Chiaje)	A. PORTMANN (1952)
Ventouses Tentacules	<i>Architeuthis dux</i> (Steenstrup)	F.A. ALDRICH M.M. ALDRICH (1968)
Bras Nageoires	<i>Sepia officinalis</i> (Linné) <i>Sepiola atlantica</i> (d'Orbigny) <i>Loliginidae</i>	Présent travail

☆ expérimentateurs

TABEAU 1

CHAPITRE 1

MATERIEL ET METHODES

## I - RECOLTES

Les juvéniles de *Sepia officinalis* ont été obtenus soit à partir de pontes, soit capturés dans la nature. Les pontes ont été récoltées dans les herbiers de *Zoostera marina* de l'Ile Verte (à pied), face à la Station Biologique de Roscoff, ou bien dans ceux de Pempoul (à pied et par dragages). Ces oeufs sont maintenus en bacs plexiglas en eau courante convenablement aérée.

Il a été très facile d'obtenir la reproduction d'adultes en aquarium. L'accouplement ne pose aucun problème. Divers supports (tuyaux de caoutchouc, grilles en plastique) ont très bien convenu pour la ponte. Les oeufs étant plutôt déposés près de la surface, il a suffi d'enfoncer petit à petit la grille dans l'eau pour ne pas la surcharger en certains endroits. Une fois entièrement couvertes, les grilles sont disposées dans l'aquarium de façon à ne pas gêner la circulation de l'eau. (Fig. 2 ). A l'éclosion, les jeunes sont transplantés dans des bacs dont le fond est recouvert d'un peu de sable.

La durée d'incubation dépend de la température (MANGOLD-WIRZ, 1963 - RICHARD, 1971), 5 semaines environ à 20°C, près de 4 mois à 10°C. L'éclosion couvre une période de 3 semaines à 15°C. La taille à l'éclosion dépend de la durée d'incubation et de la taille de l'oeuf (plus ou moins grandes réserves vitellines).

Les jeunes *Sepia* ont également été capturées dans la nature au chalut à perche et à la senne (principalement dans l'estuaire de la Penzé). C'est dans ces conditions qu'il est arrivé de prendre des *Sepioloatlantica*, ainsi que de jeunes *Loligo* et des *Alloteuthis*. Il était ainsi possible de récolter aussi de la nourriture pour les seiches de plus grande taille (crabes, crevettes, poissons).

Nous avons obtenu quelques adultes à partir de jeunes nés au laboratoire ou capturés, mais la plupart ont été capturés au chalut à panneaux, au chalut à perche ou à la senne. Il est arrivé d'avoir un individu de temps en temps

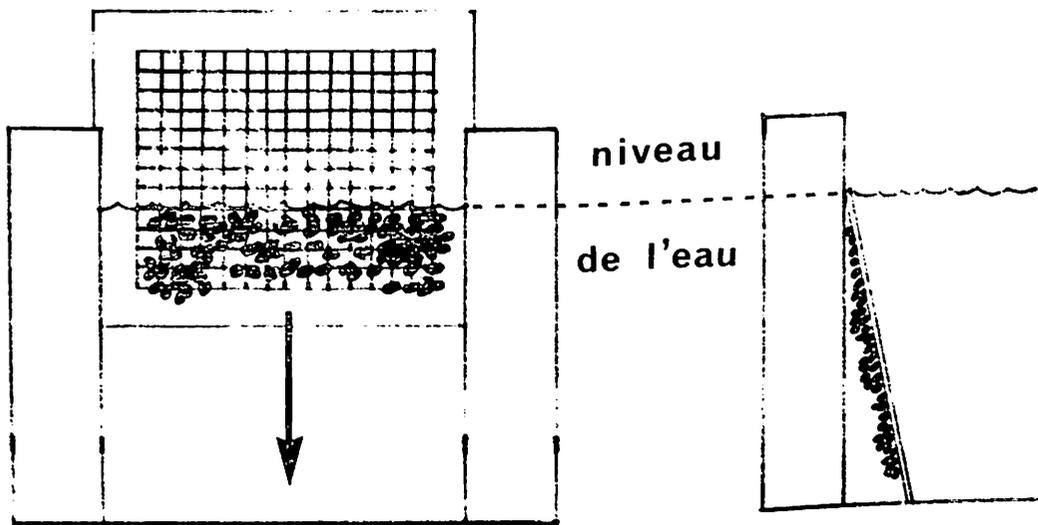


Figure 2 : Schéma de l'installation d'une grille collectrice d'oeufs. Elle est assemblée au fer et à mesure que la porte la recouvre. Une fois pleine, elle est mise le long de la paroi de manière à ne pas gêner la circulation de l'eau.

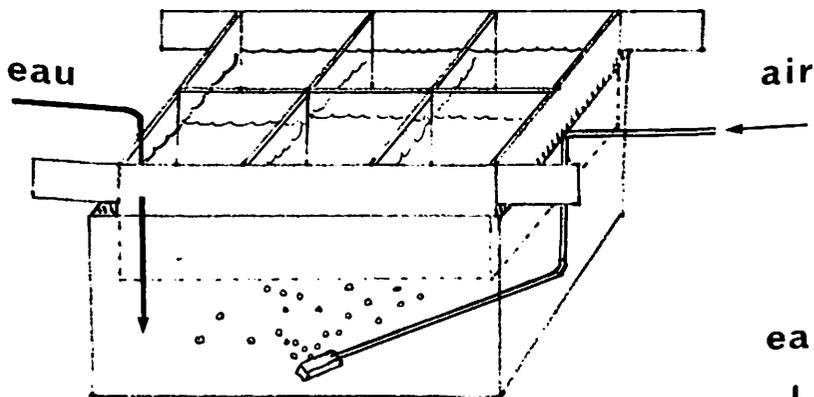
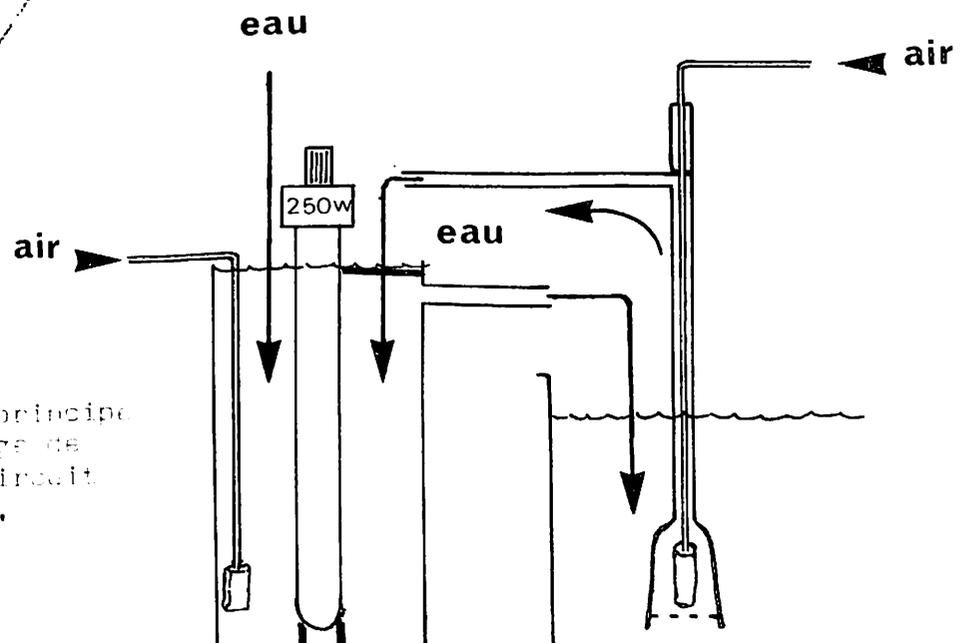


Figure 3 : Schéma des bacs utilisés pour l'élevage de lots de petits individus.

Figure 4 : Schéma de principe du chauffage de l'eau en circuit fermé.



par dragage. Les *Sepia* en meilleur état sont celles prises à la senne et au chalut à perche. A bord, les animaux sont mis dans de grands bacs en plastique où l'eau est renouvelée.

## II - ELEVAGE

L'élevage des seiches est maintenant possible. Divers auteurs ont réussi à obtenir un cycle biologique complet en aquarium (CHOE et al., 1963, CHOE, 1966, RICHARD, 1971, BOLETZKY, 1974 a).

### A - Bacs

Les animaux ont été maintenus dans des bacs en plexiglas ou en grands aquariums. Ils sont mis dans divers bacs selon leur taille et leur nombre. Les plus petits ont pu être séparés en lots de 5 individus dans des casiers (15cm x 15cm) posés sur une réserve d'eau courante et aérée de 35 litres (modèle ISTPM). Il faut éviter un débit d'eau provoquant un courant trop fort qui perturberait les animaux. (Fig. 3 ).

Le fond des bacs est garni de sable en couche peu épaisse. Un simple ratissage hebdomadaire et l'enlèvement des carapaces de crabes et des têtes de poissons permettent d'éviter son pourrissement. Un renouvellement partiel, tous les mois, aux endroits d'accumulation de déchets de nourriture (taches noires de réduction) ainsi qu'un grattage des parois permet de maintenir les animaux dans de bonnes conditions.

### B - Facteurs abiotiques

#### 1 - Lumière

Nous avons laissé les animaux en lumière naturelle sans influencer sur la photopériode. Nous n'avons pas remarqué de différences notables quant au comportement et à la régénération entre les individus soumis à un éclairage normal et ceux vivant dans un sous-sol, bien moins éclairé. Les Seiches sont des animaux qui chassent à vue. Il y a toujours eu des périodes de lumière suffisante pour qu'elles puissent se nourrir.

## 2 - Température

Les Seiches peuvent vivre entre 30°C et 7°C (RICHARD, 1971). Cependant, elles ne supportent pas de sautes brutales de température. Nous avons fait des expériences à température ambiante (Fig. 5) et d'autres à des températures contrôlées. Il s'est toujours agi de chauffer l'eau pour la maintenir au-dessus d'un certain minimum. Nous avons employé des résistances thermostatées "sable-pirex" étanches, de 100 et 250w selon le volume d'eau à chauffer, immergées directement dans le bac. Nous avons pu réaliser un chauffage externe pour de petits bacs (Fig. 4). Les expériences à température constante ont été faites aux époques où les écarts entre la température recherchée et la température de l'eau de mer pompée étaient les moindres.

En hiver, une ou plusieurs cannes chauffantes thermostatées sont laissées en permanence dans les bacs pour avoir une température s'écartant peu de 10°C. Les élevages sont faits en circuit ouvert, ou semi-fermé. Dans ce dernier cas, l'eau du fond de l'aquarium est transportée à la surface en un autre endroit par un élévateur à air comprimé. Cet appareil contribue au brassage de l'eau qui est complété par l'action d'oxygénateurs à pierre poreuse bien disposée. Ce système très simple, a permis d'avoir une température homogène dans toutes les parties des plus grands aquariums.

## 3 - Oxygénation

L'oxygénation a toujours été satisfaisante grâce à l'élevage en eau courante et le brassage perpétuel provoqué, soit par les bulleurs, soit par les élévateurs ou bien par les deux ensemble. Nous avons considéré être à saturation. C'est le cas des eaux superficielles pompées par la Station biologique de Roscoff, qui peuvent même être sursaturées en raison de l'activité photosynthétique. La quantité d'oxygène dissout dépend de la température. Elle diminue quand la température augmente.

Figure 5 : Courbe de températures de l'eau pompée par la station de septembre 1975 à novembre 1976. Chaque point représente la moyenne des températures des 5 jours précédents.

Figure 6 : Elevage d'*Artemia salina*. A gauche, dispositif pour l'éclosion des oeufs. A droite, dispositif pour séparer les jeunes nauplii des coques et les récupérer.

Figure 7 : Amputation de la nageoire.  
AB : coupure longitudinale.  
CDEF : section transverse. Dans ce cas la régénération n'a pas lieu.

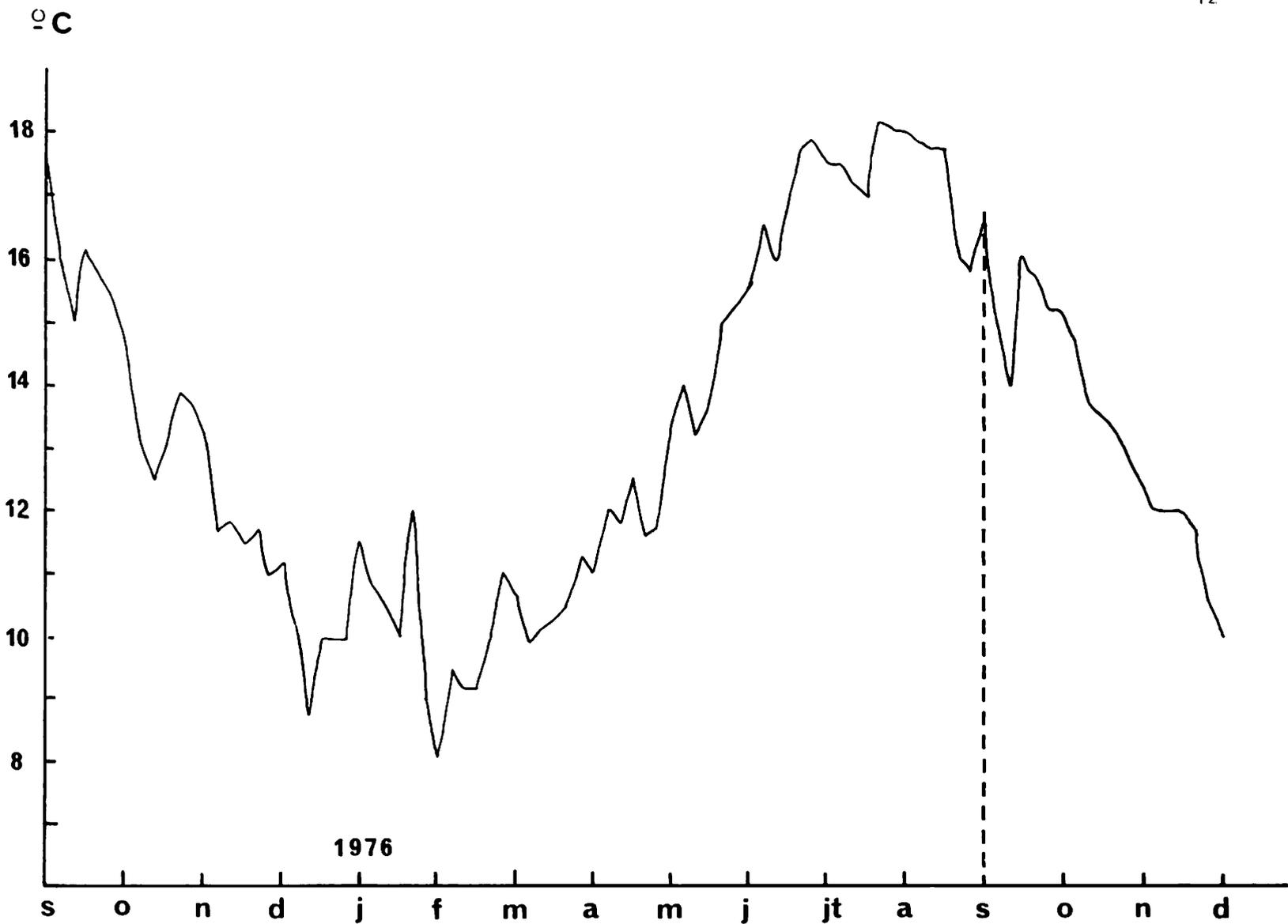


figure 5

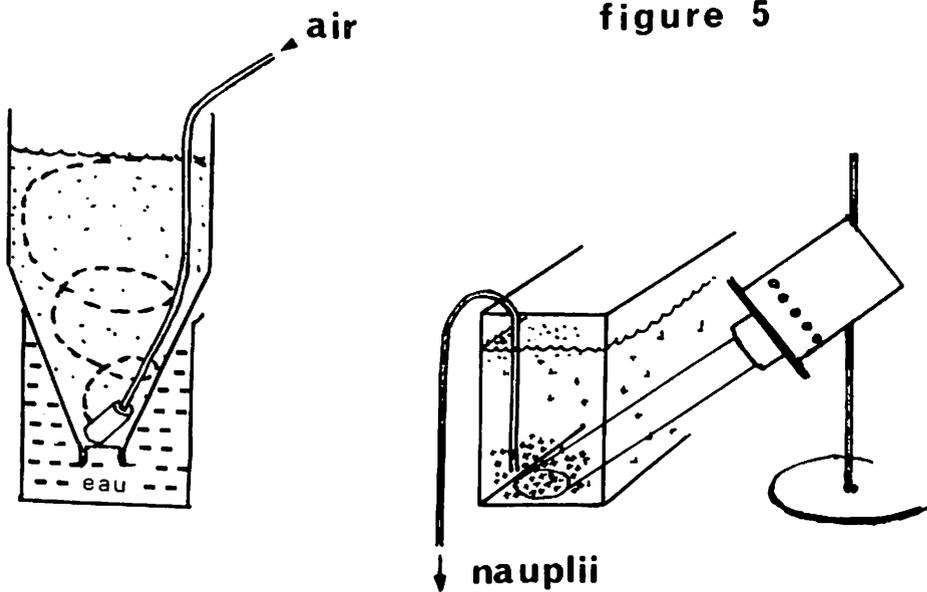


figure 6

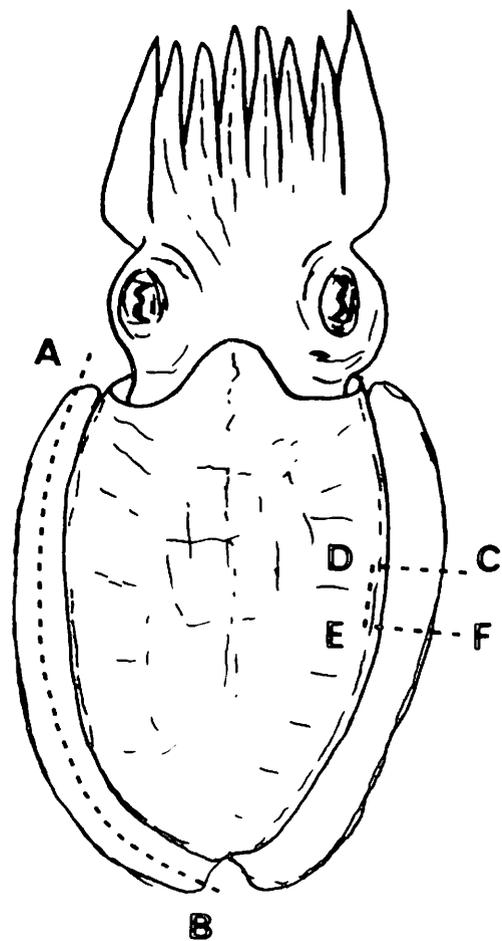


figure 7

#### 4 - Autres facteurs

La salinité varie peu au cours de l'année. RICHARD (1971), signale qu'elle n'a pas d'influence sur la croissance.

L'eau de mer donne une réaction alcaline par suite de l'hydrolyse des carbonates et bicarbonates, ceux-ci étant formés par réaction du gaz carbonique sur l'eau de mer. Pour une augmentation de température, le pH diminue d'autant plus que la salinité est grande.

### C - Facteurs biotiques

Parmi ceux-ci, nous n'en avons retenu que deux.

#### 1 - Nourriture

*Sepia officinalis* est un animal carnivore qui se nourrit d'animaux vivants et chasse à vue des proies mobiles et proportionnées à sa taille.

RICHARD (1971) et BOLETZKY (1974) ont décrit le régime alimentaire en fonction du stade atteint par l'animal.

Nous avons nourri les seiches jusqu'à 5cm de Mysidacés (*Paramysis noveli* et *Praunus flexosus*) ainsi que d'*Artemia salina* mis en culture parallèlement à partir d'oeufs (BLAUPUNKT).

Les oeufs ont été mis dans de l'eau de mer sursalée avec du chlorure de sodium jusqu'à obtenir environ 40‰ et chauffée à 25°C dans une bouteille d'eau minérale en plastique ouverte au fond et renversée. Un bulleur réglé à débit moyen, placé dans le goulot de la bouteille permet une agitation hélicoïdale qui maintient les oeufs en suspension (Fig. 6). A l'éclosion, les nauplii d'*Artemia* sont séparés des coques vides. Pour cela, on verse le contenu de la bouteille dans un petit aquarium dans un coin duquel on fait arriver le faisceau d'une lampe. Les larves se concentrent assez rapidement dans la plage lumineuse, il est alors facile de les recueillir par siphonage. Cette opération terminée, il ne reste qu'à les transporter dans un cristalliseur contenant de l'eau de mer enrichie pour permettre la croissance d'algues vertes. L'eau est aérée par un

oxygénateur à pierre poreuse et renouvelée par parties. Des adultes d'*Artemia* ont ainsi été obtenus en moins de deux semaines.

De 5 à 10cm, nous avons surtout fourni des petits crustacés (*Crangon crangon*, *Palaemon serratus*, *Orchestia marina*, jeunes *Carcinus maenas*) des poissons (*Pomatochistus microps*, jeunes *Mugil auratus* et *Onos mustellus*).

Les individus de tailles supérieures acceptent très bien les *Carcinus maenas*, les grosses *Palaemon serratus*, les *Gobius paganellus*, *Blennius*, *Ammodytes lanceolatus*, *Onos mustellus*, *Mugil auratus*.

La nourriture est distribuée tous les jours.

Dans les expériences de sous-nutrition, nous avons nourri les animaux une fois par semaine avec 2 ou 3 petites *Palaemon* ou alevins de *Pomatochistus* pour chacun (LDM 3 à 4cm). Ceci représentant le minimum journalier des individus témoins.

Les deux lots d'animaux provenaient du même bac d'élevage où ils étaient maintenus depuis leur naissance et nourris de la même manière. Le jeûne a commencé au jour zéro. Il n'a pas pu être total, car dans ce cas, les animaux prennent une flottabilité positive, restent en surface, dans l'impossibilité de descendre, et finissent par mourir.

## 2 - Compétition - Densité d'élevage

Il faut veiller à ce que la nourriture soit suffisamment abondante car sinon, seuls les individus les plus forts se nourrissent. Il faut aussi séparer les individus par classe d'âge, c'est-à-dire ne pas laisser ensemble des seiches de tailles trop différentes. Le cannibalisme n'est pas rare en captivité.

RICHARD (1971) a donné une formule selon laquelle la "surface de seiches" ne doit pas dépasser le 1/10ème de la surface du fond. Dans tous nos élevages, la densité a toujours été de 0,07 à 0,1. Il faut tenir compte aussi du fait que toutes les proies fouisseuses : *Crangon crangon*, petites *Pleuronectes platessa* interviennent dans cette densité.

### III - ANESTHESIE

Au cours d'une série d'expériences antérieures sur des Céphalopodes Octopodes, réalisées au Laboratoire ARAGO à Banyuls-sur-mer, nous avons pu déterminer l'action anesthésiante de diverses concentrations d'éthanol dans l'eau de mer.

Nous avons fait des expériences à courte et à longue durée avec l'alcool (et d'autres anesthésiques). La plus pratique des concentrations essayées (0,5 - 1 - 2 - 3 - 5 et 10%) s'est révélée être 2%. La majorité des Poulpes s'endorment en 2 minutes environ. Ils se réveillent en 3 minutes après avoir été plongés dans l'eau de mer courante.

- L'alcool en solution à 2% est un bon anesthésique pour les Céphalopodes. L'installation de l'anesthésie et la récupération sont rapides. La toxicité est nulle. L'emploi en est facile et peu coûteux. A plus faible dose, c'est un excellent calmant permettant, par exemple, le transport d'animaux.

- L'uréthane (carbonate d'éthyle) a un effet similaire, mais le réveil est plus tardif pour une concentration à 2%. Il faut environ 15-20 minutes. Les muscles sont moins contractés mais on enregistre une mortalité, ce qui n'apparaît jamais avec l'éthanol à 2%.

- Le MS 222 (isomère de la benzocaïne) est un anesthésique employé par voie buccale en physiologie. Il est classiquement utilisé pour endormir les batraciens et les poissons. Il s'est révélé toujours mortel sur *Octopus* même à la dose de 0,07 g/l employée pour anesthésier les jeunes saumons.

Chez *Sepia*, l'anesthésie à l'éthanol se déroule de la même façon que chez *Octopus*. Les animaux sont d'abord un peu excités, puis ils se calment. Leur rythme respiratoire diminue, s'arrête parfois. Les Seiches pâlisent. La nageoire cesse d'onduler. Les animaux flottent, la tête en bas, souvent collés au fond par les ventouses des bras qui y adhèrent modérément. Il faut remarquer que la contraction musculaire est moins grande que chez *Octopus*, mais il faut une exposition à l'alcool plus prolongée pour immobiliser les bras. Ce fait s'explique par l'indépendance du centre brachial par rapport aux centres supérieurs qui, eux, subissent l'action de l'éthanol. Comme chez *Octopus*, le réveil demande quelques minutes après le retour en eau de mer courante.

*Sepiolo atlantica* réagit de la même manière.

#### IV - MODE OPERATOIRE

Une fois anesthésiés, les animaux sont sortis de l'eau, un ou plusieurs bras sont coupés aux ciseaux, le plus nettement possible, perpendiculairement à l'axe médian. L'amputation systématique concerne entre la moitié et le tiers distal du bras.

L'amputation de la nageoire se fait aux ciseaux sur l'animal anesthésié. On peut la faire longitudinalement, sans entamer le cartilage (coupure A-B Fig. 7) ou bien couper un morceau, transversalement. Quand le cartilage de la nageoire est touché, l'animal ne survit pas (coupure C-D-E-F Fig. 7).

Le sang est prélevé pour l'analyse biochimique. L'animal n'est pas anesthésié pour deux raisons : pour qu'il n'y ait pas d'alcool dans le sang et pour ne pas supprimer le péristaltisme des vaisseaux et les battements du coeur facilitant la prise de sang.

On utilise une seringue de 5 ml à grande aiguille. Après ouverture aux ciseaux du manteau, on atteint très facilement la veine céphalique. La meilleure méthode s'est révélée être d'aspirer au passage de chaque onde péristaltique.

Des prélèvements directs dans le coeur donnent également de bons résultats. Notons qu'il est possible d'obtenir de petites quantités de sang sans sacrifier l'animal.

Dès qu'il est en contact avec l'oxygène de l'air, le sang, translucide, devient bleu (oxydation du cuivre de l'hémocyanine).

Le sang de Céphalopode ne contient pas de fibrine, aussi ne coagule-t'il pas. Aussitôt prélevé, le sang est mis en tubes. Ces tubes sont, soit mis au congélateur pour les échantillons à conserver, soit mis dans de la glace fondante pour les échantillons devant être analysés immédiatement. Parfois, une légère floculation apparaît qui sédimente au fond du tube. Examinée au microscope, cette masse blanchâtre se révèle être composée d'amœbocytes.

## V - HISTOLOGIE ET CYTOLOGIE

### A - Microscopie optique

Les animaux de petite taille sont immergés vivants dans le liquide fixateur. Après durcissement, le ou les bras intéressants sont disséqués et la suite de la fixation et des traitements se fait sur eux. La plupart ont été fixés au Bouin à 5% d'acide acétique. Le liquide de Carnoy a été utilisé pour permettre l'observation des noyaux. Le formol à 10% dans l'eau de mer a été choisi pour les imprégnations argentiques.

Après déshydratation à l'éthanol, passage dans le butanol-1, les pièces ont été directement incluses en paraffine ( $T_f = 56-58^\circ\text{C}$ ) ou dans de l'"histosec" (milieu plastifiant MERCK  $T_f = 56-58^\circ\text{C}$ ).

Les coupes ont été faites à 5  $\mu$  d'épaisseur, (15  $\mu$  pour les imprégnations argentiques).

Des colorations ont été pratiquées pour mettre en évidence la topographie du bras et certains constituants chimiques. Les coupes sont traitées à l'azan, au trichrome de Masson ou de Ramon y Cajal, à l'éosine-vert lumière, au bleu de toluidine, au bleu alcian (pH 3,5), à la galloxyanine.

### B - Microscopie électronique

Les morceaux de bras sont fixés au glutaraldéhyde à 3% (concentration finale) dans du tampon cacodylate de sodium 0,4 M (pH 7,4) et du chlorure de sodium 0,3 M pendant 1 heure. Ils sont redisséqués après 15 mn s'ils sont trop gros.

On lave dans le tampon avec du NaCl à 4%. La postfixation se fait à l'acide osmique à 2% dans le même tampon. Elle est suivie d'un lavage. Après des déshydratations progressives à l'éthanol, les pièces sont incluses au durcupan (FLUKA).

Les coupes semi-fines sont colorées au bleu de toluidine (certaines n'ont pas été postosmiées).

Les coupes fines sont traitées par l'acétate d'uranyle (contrastant) puis colorées au citrate de plomb (REYNOLDS, 1963). La plupart ont été carbonées.

Les observations ont été faites au microscope électronique HITACHI HU-11E du Laboratoire de Biologie des Invertébrés marins au Muséum National d'Histoire Naturelle à Paris.

## VI - MARQUAGE RADIOACTIF

### A - Molécule utilisée

Il s'est agi de marquer le collagène. Le marquage a été effectué avec de la  $^{14}\text{C}$  L-proline (activité spécifique 235 mCi/mM) fournie par le C E A, Gif-sur-Yvette, France. La solution stock est à 100  $\mu\text{Ci/ml}$ .

### B - Méthodes de marquage

#### 1 - Injections

Il a d'abord fallu trouver un endroit pour les pratiquer. Après plusieurs essais avec des colorants vitaux (bleu de Nil, vert vital Geigy), c'est la région de la "glande digestive" (BIDDER, 1976), juste sous le sésion, au voisinage de l'artère céphalique, qui a été retenue. En effet, 5 à 10 mn après l'injection à cet endroit, les branchies sont colorées, ce qui est le signe d'une reprise du produit par la circulation générale. Les injections sont pratiquées avec des seringues hypodermiques à insuline de 1ml comportant 40 graduations. Une quantité de proline marquée équivalant à 50  $\mu\text{Ci}$  est dissoute dans 6ml d'eau de mer filtrée. La concentration finale est de 8,3  $\mu\text{Ci/ml}$ . Les injections ont été de 0,6  $\mu\text{Ci/g}$  d'animal.

#### 2 - Bains

L'étonnante possibilité de survie du bras coupé (36 h dans une salière remplie d'eau de mer renouvelée de temps en temps) et l'ultrastructure du bras (microvillosités) nous ont poussé à essayer un marquage en immergeant les bras isolés du corps à des temps bien définis pour l'étude de la synthèse de collagène.

La solution stock de  $^{14}\text{C}$  L-proline a été diluée afin d'arriver à une concentration de 1  $\mu\text{Ci/ml}$ . Les bras (5 à 9 individus) de chaque stade ont été mis dans des salières contenant 2,5 ml de la solution radioactive pendant 2 heures, puis ils ont été placés en milieu froid, 100 fois plus concentré en proline, soit 19 mg/ml. L'opération a été répétée 3 fois une demi-heure. Les bras ont été rincés 2 fois (1 heure et 1/2 heure) en eau de mer filtrée (millipore 0,45  $\mu$ ).

### C - Comptages en scintillation liquide

Ils ont été faits à l'Unité de Radioimmunologie Analytique à l'Institut Pasteur sur un spectromètre INTERTECHNIQUE SL 32.

La mesure de la radioactivité ( $^{14}\text{C}$  L-proline) a été effectuée sur les fractions protéiniques isolées comme indiqué au paragraphe suivant.

Le mélange scintillant est composé de :

PPO - 2,5	diphényl oxalole . . . . .	12 g
POPOP - 1,4	bis/2 (5 - phényloxazoly1) - benzène . . . . .	0,3 g
Toluène	. . . . .	3 l
Triton X 100	. . . . .	1,5 l

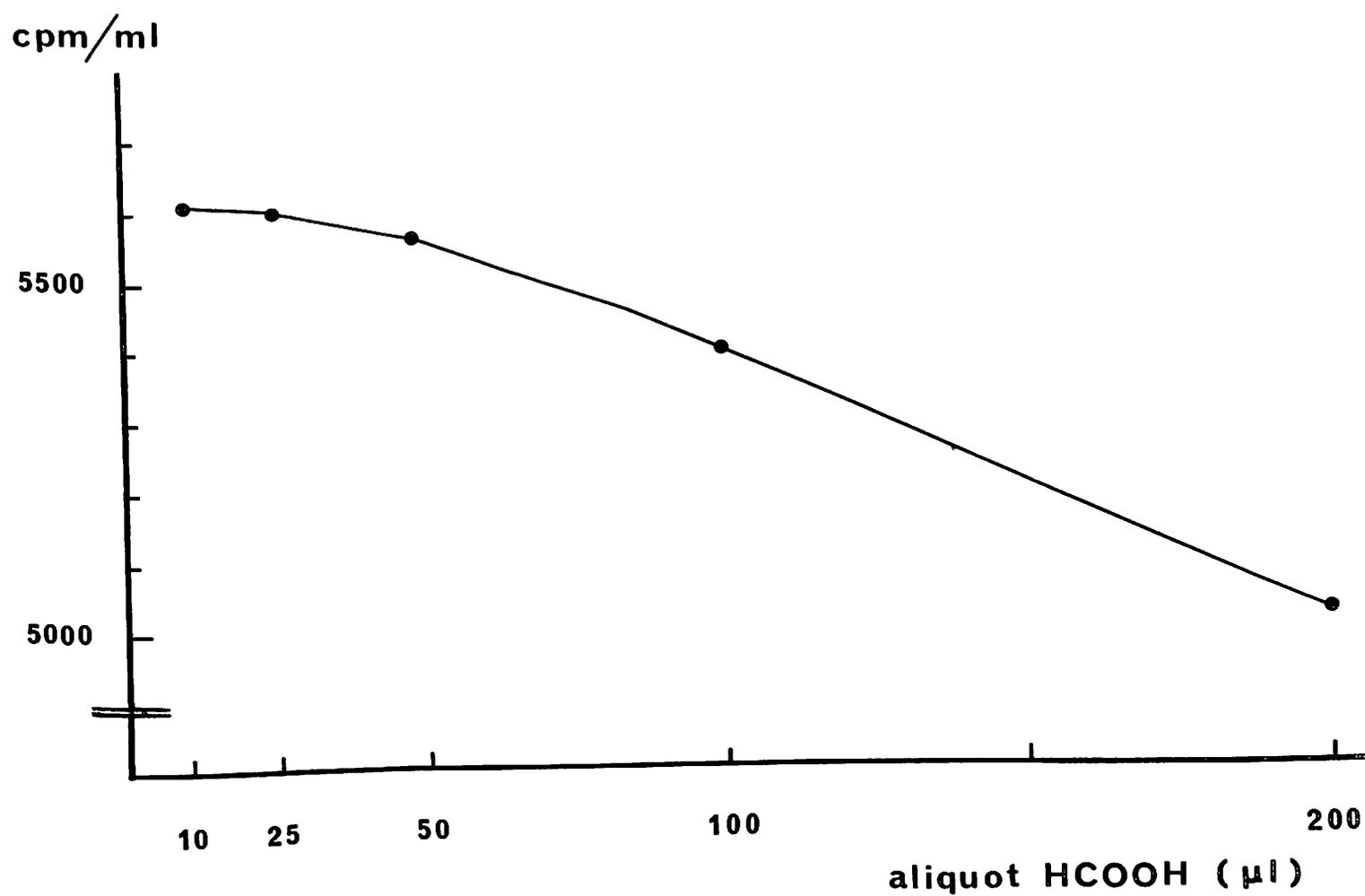
Les comptages ont été faits à ouverture maximale du canal de mesure. La durée a été choisie de telle sorte que l'on totalise toujours entre 2000 et 15000 coups par échantillon. Les résultats sont reportés automatiquement à la minute. Les comptages ont été faits après stabilisation de la température.

Nous nous sommes placés dans des conditions telles que les phénomènes d'atténuation soient minima. Pour les phases aqueuses, l'aliquot était de 100  $\mu\text{l}$  pour les 10 ml de mélange scintillant, ce qui est inférieur au 10 - 15% d'eau compatible avec la mesure (formation d'émulsion).

Les protéines solubilisées à l'acide formique anhydre ont donné une couleur rosée (présence de pigments). Nous avons été obligés de réduire le volume de l'aliquot à 25  $\mu\text{l}$ , la coloration atténuant la lumière émise. La figure 8 donne les résultats obtenus avec l'échantillon le plus coloré.

L'acide formique anhydre lui-même n'intervient ni en quenching, ni en chimiluminescence.

Les résultats finaux ont été rapportés à l'unité de poids frais.



Aliquot (µl)	cpm	cpm/ml
200	1004	5020
100	539	5390
50	277	5540
25	140	5600
10	56	5600

Figure 8 : Courbe d'étalonnage de l'extrait acide formique coloré pour le comptage en scintillation liquide.

## VII - ETUDE DES PROTEINES DU REGENERAT

Le tableau 2 résume le mode opératoire.

### A - Précipitation des protéines et isolement du collagène

Après avoir été pesés, les bras sont homogénéisés dans un Potter avec du TCA à 10% à 0°C. Le matériel insoluble a été récupéré par centrifugation à 16 000 g pendant 5mn à 5°C et a été lavé 3 fois dans du TCA à 5% par resuspension et centrifugation. Le culot lavé est traité par du TCA à 5% à 90°C pendant 1 heure. Le matériel insoluble est éliminé par centrifugation. Le surnageant est conservé. Le précipité est lavé au TCA à 5%. Ce dernier surnageant additionné au précédent constitue la "fraction collagène" qui en fait peut contenir aussi des peptides et des dérivés d'acides nucléiques (LUKENS, 1965). Le TCA est éliminé par 3 lavages, volume à volume, avec de l'éther diéthylique. Des aliquots sont prélevés de la phase aqueuse pour les comptages en scintillation et les dosages.

Le culot, constituant la fraction TCA chaud insoluble est solubilisé à l'acide formique anhydre. Des aliquots servent aux dosages et aux comptages.

### B - Dosage des protéines

Nous avons utilisé la méthode de LOWRY et al., (1951).

#### 1 - Réactifs

Une gamme étalon est faite à partir de *bovine serum albumine* (BSA) lyophilisé MERK de 10 à 50  $\gamma$  car il n'y a plus de relation linéaire entre la concentration et la densité optique au-dessus de 50  $\gamma$ .

Les solutions sont préparées avant chaque dosage.

Solution A :  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 2% dans NaOH 0,1 N

Solution B :  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  à 0,05% dans du tartrate double de sodium et de potassium à 1%

Solution C : Solution A (50 volumes) + Solution B (1 volume)

Le réactif de Folin (MERK) est dilué deux fois avec de l'eau distillée pour avoir une solution acide normale.

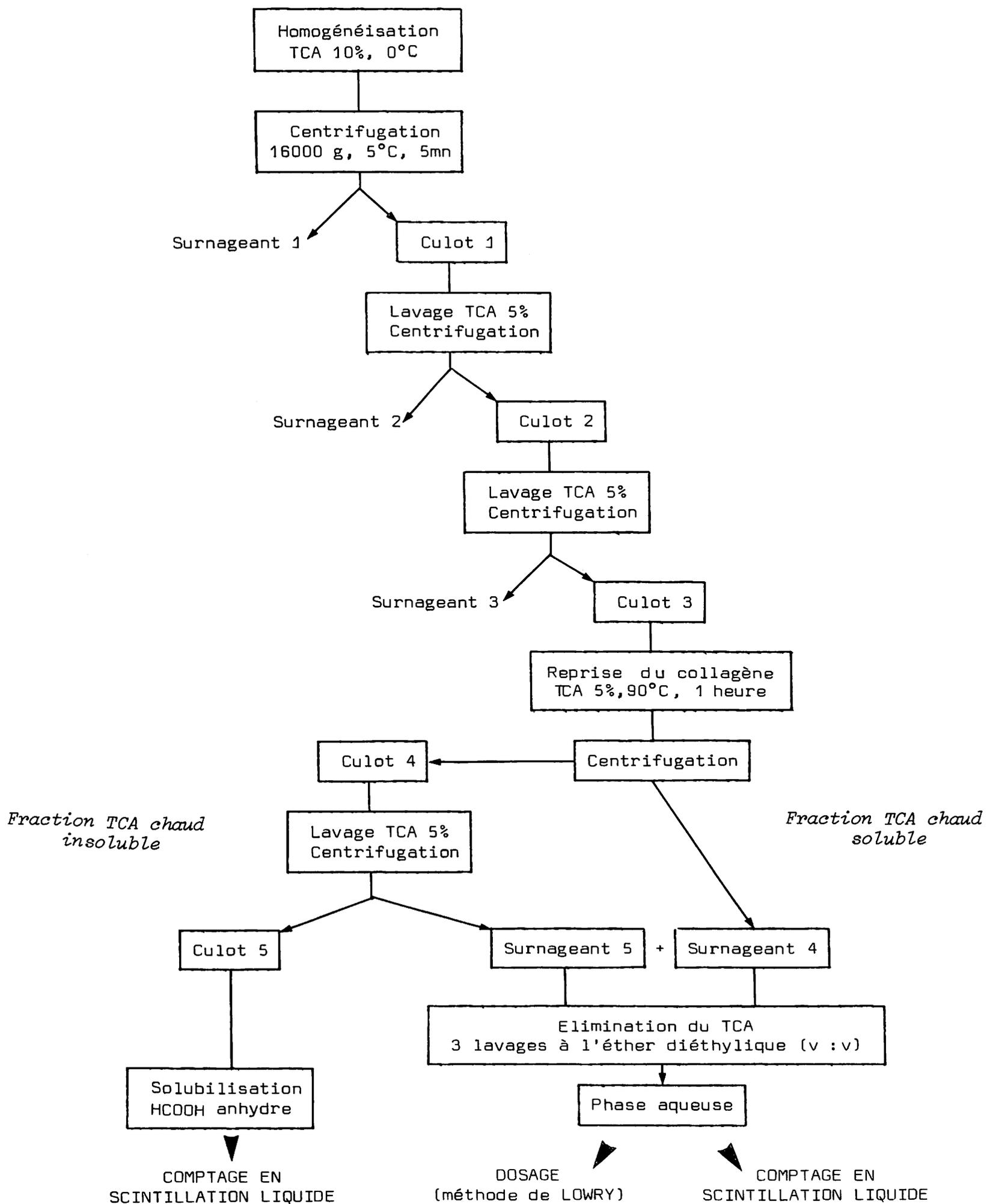


TABLEAU 2 : Extraction des fractions protéiniques

## 2 - Mode opératoire

A 1 ml de "blanc", de standard BSA ou d'échantillon à doser, on ajoute 5 ml de la solution C. On agite et on attend 10 minutes après lesquelles on ajoute 0,5 ml de réactif de Folin. On laisse réagir pendant 30 minutes après avoir bien secoué les tubes. Après une éventuelle dilution à l'eau distillée des échantillons trop colorés, on lit la densité optique à 750 nm. Nous avons effectué les lectures sur un spectrophotomètre UNICAM SP 1700.

## VIII - ELECTROPHORESES

### A - Disc-électrophorèse

Nous avons utilisé la technique de "disc-électrophorèse" qui permet de séparer les ions que sont les protéines à un pH donné et d'obtenir une grande finesse de résolution grâce à un prétéamplification de l'échantillon à travers un gel de polyacrylamide à larges pores. Sur le gel de migration, on coule un gel de tassement, de même nature. Il permet à la quasi totalité des protéines de l'échantillon de se concentrer à la surface du gel de migration en une fine fraction. La migration s'effectue en fonction du poids moléculaire et du point isoélectrique. La mobilité des protéines est une résultante de ces deux paramètres. Elle variera selon le pH du gel et du tampon. Ceci explique que des bandes peuvent paraître nettement séparées ou confondues, nettes ou floues. Le diamètre du tube intervient aussi. Les électrophorégrammes réalisés en tubes de 3mm de diamètre intérieur, s'ils se développent plus vite, sont moins nets que ceux faits en tubes de 5mm.

### 1 - Solutions pour la fabrication des gels

#### Solution A :

. Acide chlorhydrique 1N . . . . .	48 ml
. Tris . . . . .	36,3 g
. Temed . . . . .	0,23ml
. Eau distillée q.s.p. . . . .	100 ml

Solution B :

. Acide chlorhydrique 1N . . . . .	48	ml
. Tris . . . . .	5,98	g
. Temed . . . . .	0,46	ml
. Eau distillée q.s.p. . . . .	100	ml

Solution C :

. Acrylamide ( 7 % ) . . . . .	28	g
. ou Acrylamide ( 4,5% ) . . . . .	18	g
. Bis . . . . .	0,735	g
. Eau distillée q.s.p. . . . .	100	ml

Solution D :

. Acrylamide . . . . .	10	g
. Bis . . . . .	2,5	g
. Eau distillée q.s.p. . . . .	100	ml

Solution E :

. Riboflavine . . . . .	4	mg
. Eau distillée q.s.p. . . . .	100	ml

Solution F :

. Saccharose . . . . .	40	g
. Eau distillée q.s.p. . . . .	100	ml

Solution G (catalyseur) :

. Persulfate d'ammonium . . . . .	0,14	g
. Eau distillée q.s.p. . . . .	100	ml

2 - Fabrication des gels (en tubes de 5mm x 12cm)a) Gel de tassement (pH 6,7)

Solution B	1 volume
Solution D	2 volumes
Solution E	1 volume
Solution F	4 volumes

temps de polymérisation : 1/2 heure environ

b) Gel de migration (pH 8,9)

Solution A	1 volume
Solution C	2 volumes
Eau distillée	1 volume
Solution G	4 volumes

On introduit ce gel après polymérisation du gel de tassement.  
Temps de polymérisation : 1 heure à l'obscurité.

Nous avons travaillé avec des gels à 7 et 4,5%, ce dernier devant mieux séparer les fractions lentes (gros p.m.).

3 - Migration

Les tubes sont disposés dans une cuve à électrophorèse SHANDON. On ajoute 3ml par tube de bleu de bromophénol à 0,05% dans la cuve supérieure avec le tampon d'électrode. Ce colorant servira à suivre le front de migration.

On dépose 10  $\mu$ l d'échantillon (sang entier dilué 10 fois) au sommet de chaque tube. On branche l'appareil. On sélectionne d'abord une intensité de 2 mA par tube, puis 5 mA par tube lorsque le sang a pénétré dans le gel.

4 - Coloration des gels

Quand le front de migration du bleu de bromophénol est à environ 1cm de l'extrémité inférieure du tube, on coupe le courant et on sort les tubes. Chaque gel est extrait au moyen de tampon injecté dans le tube par une seringue. Auparavant, on a mesuré la distance de migration et la longueur du boudin.

a) Protéines totales

On immerge les gels dans une solution de bleu de coomassie G 250 dans l'acide perchlorique pendant 1 heure. Ce procédé ne nécessite pas de décoloration (REISNER et al., 1975).

. Bleu de coomassie G 250	
à 0,25% dans l'eau distillée . . . . .	95 ml
. Acide perchlorique (71 - 73%) . . . . .	30 ml
. Eau distillée . . . . .	475 ml

Les protéines sont colorées en bleu. Le gel est légèrement orange.  
La coloration est stable.

#### b) Cuproprotéines

On immerge les gels dans une solution d'acide rubéanique saturée pendant 24 heures.

. Acide acétique à 7,2% . . . . .	74 ml
. Acétate de sodium à 16,3% . . . . .	26 ml
. Acide rubéanique . . . . .	100 mg

Agiter pendant 1 heure.

Les protéines liées au cuivre sont colorées en vert bouteille. Une coloration secondaire bleue pâle peut se produire sur les autres protéines.

#### c) Glycoprotéines

Les gels sont placés 16 heures dans une solution de :

. Périodate de sodium . . . . .	2,5 g
. Eau distillée . . . . .	86 ml
. Acide acétique glacial . . . . .	10 ml
. Acide chlorhydrique concentré . . . . .	2,5 ml
. Acide trichloracétique . . . . .	1 g

On lave 8 heures dans plusieurs bains d'une solution de :

. Acide acétique glacial . . . . .	10 ml
. Acide trichloracétique . . . . .	1 g
. Eau distillée . . . . .	90 ml

Les gels sont ensuite colorés 16 heures dans du réactif de Schiff.

Ils sont ensuite fixés par 2 bains de 2 heures dans une solution de :

. Sulfate de potassium . . . . .	1	g
. Acide chlorhydrique concentré . . . . .	20	ml
. Eau distillée . . . . .	980	ml

Toutes ces opérations sont faites à 4°C et les gels dans ces solutions sont soumis à une agitation permanente.

#### d) Lipoprotéines

La coloration se fait avant la migration. L'échantillon est mélangé à la moitié de son volume de noir soudan en solution saturée dans de l'éthylène glycol.

Les lipoprotéines sont solorées en brun. Cette coloration ne persiste que si les gels sont conservés dans une solution de :

. Iode sublimé . . . . .	1,5	g
. Acide acétique . . . . .	150	ml
. Eau distillée . . . . .	q.s.p.	2000ml

Les autres protéines sont secondairement colorées en jaune.

### B - Electrophorèse en gel de S.D.S. polyacrylamide

Nous avons employé cette méthode pour tenter de déterminer le poids moléculaire. La méthode ci-dessus ne permet que de séparer les protéines en bandes et de les comparer par leur distance de migration. Mais il est hasardeux d'assimiler 2 protéines d'échantillons différents ayant la même référence front.

SHAPIRO et al., (1967) ont montré qu'il existait une relation linéaire entre le logarithme des masses moléculaires des polypeptides et leur mobilité électrophorétique. Le S.D.S. est un agent dénaturant. Il supprime toute structure qui n'est pas primaire en se complexant aux protéines qui sont chargées à un pH donné. Ce complexe porte une charge négative identique pour toutes les macromolécules. Elles migreraient toutes à la même vitesse si le tamisage moléculaire du polyacrylamide n'intervenait pas. La migration s'effectue selon le seul critère taille.

Les liaisons covalentes entre chaînes polypeptidiques sont rompues par le  $\beta$  mercaptoéthanol (réduction des ponts disulfures). Les -SH démasqués pouvant alors réagir entre eux, on les bloque par une carboxyméthylation à l'iodo-acétamide.

### 1 - Préparation des échantillons

Les échantillons de sang sont chauffés 2mn à 100°C dans une solution de phosphate de sodium (pH 7) contenant 1% de mercaptoéthanol et 1% de sodium dodécylsulfate (S.D.S.).

200 à 500  $\mu$ l de sang sont mélangés à :

50  $\mu$ l de tampon phosphate de Na,  $10^{-2}$ , pH 7,  
S.D.S. 0,1%,  $\beta$ - mercaptoéthanol 0,1%  
10  $\mu$ l de bleu de bromophénol à 0,05%  
10  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoéthanol.  
quelques grains de saccharose

Une partie aliquote du mélange est appliquée au sommet des tubes,

### 2 - Préparation des tubes et dépôt des échantillons

Tampon de gel :	Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O . . . . .	7,8 g
	Na <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O . . . . .	38,6 g
	S.D.S . . . . .	2 g
Acrylamide :	Acrylamide . . . . .	15,5 g
	Bis . . . . .	0,5 g
	Eau distillée . . . . .	q.s.p,100ml

Persulfate d'ammonium à 15 mg/ml

On réalise le mélange :

Tampon de gel . . . . .	7,5 ml
Acrylamide . . . . .	6,75 ml
Persulfate d'ammonium . . . . .	0,75 ml
Temed . . . . .	0,02 ml

On fabrique les colonnes et on laisse polymériser 20mn. Les compartiments de la cuve à électrophorèse sont remplis avec du tampon de gel dilué 2 fois. Les échantillons sont appliqués.

On sélectionne une intensité de 8 mA par tube. La migration est suivie grâce au bleu de bromophénol. Elle demande de 3 à 5 heures,

Puis on procède comme précédemment.

#### C - Electrophorèses en gel à gradient de polyacrylamide

Elles ont été faites avec l'appareil à électrophorèse PHARMACIA GE-4 avec des gels de polyacrylamides à gradient PAA 4/30.

Les protéines migrent dans le gel jusqu'à ce qu'elles ne puissent plus passer par les pores. Les limites d'exclusion du gel 4% - 30% d'acrylamide sont 50 000 et 2 000 000 de daltons. Au-dessus de 2 000 000, les protéines ne pénètrent pas, en-dessous de 50 000, elles traversent tout le gel et se perdent dans le tampon.

On utilise des plaques de gel déjà conditionné. Elles permettent d'analyser 12 échantillons à 20 - 30 mg de protéines par ml. Un prédéveloppement est fait à 125 V pendant 15mn pour équilibrer les plaques. Après le dépôt des échantillons, une préélectrophorèse est faite à 70 V pendant 20mn. L'électrophorèse se fait pendant la nuit (16 heures) à 125 V. (voltage constant). La température est de 15°C. Le tampon est du Tris-glycine, pH 7,2. Les colorations se font comme précédemment. Le gel P A A 2/16 permet d'étaler encore plus les fractions lentes.

CHAPITRE 2

LA STRUCTURE DU BRAS DE  
*SEPIA OFFICINALIS*

## I - HISTORIQUE

Une description relativement juste de l'anatomie de *Sepia officinalis* a été faite par SCHNEIDER en 1784 (d'après GUERIN, 1908). C'est de CUVIER, (1817) que viennent les premières données concises concernant le système pédieux de la Seiche. DELLE CHIAJE, (1825) donne une description de la peau, de la musculature de l'"appareil tentaculaire" avec l'innervation et la vascularisation. Des détails sur la musculature sont donnés par BRANDT et RATZEBURG, (1833) ; KÖLLIKER, (1844) contribue aux connaissances du développement embryologique. DE SIEBOLD et STANNIUS, (1849) décrivent la peau, donnent des renseignements sur les chromatophores, les muscles du bras et des ventouses, la disposition des nerfs et des vaisseaux. Les formations cuticulaires de la ventouse sont étudiées par KÖLLIKER, (1858). CHERON, (1866) décrit le système nerveux et met en évidence les différences dans la disposition des nerfs brachiaux entre Céphalopodes Octopodes et Décapodes. GIROD, (1883) étudie la peau et en 1884, s'occupe de la structure de la ventouse tant du point de vue de la conformation que du fonctionnement. Le premier travail complet sur l'appareil brachial est dû à GUERIN, (1908). SPRENKEL, (1929) met en évidence les terminaisons nerveuses motrices du bras. BOYCOTT, (1961) décrit le système nerveux central. FIORONI, (1963 et 1965) étudie la peau, BARBER et GRAZIADEI (1965 et 1967) l'innervation des vaisseaux sanguins. YOUNG, (1971) reprend une part de leurs observations dans son ouvrage sur le système nerveux du Poulpe. GONZALEZ-SANTANDER et al., (1972) font la première étude ultrastructurale des muscles du bras.

Figure 9 : *Sepia officinalis* adulte. On distingue les bras droits numérotés de I à IV. Le bras IV a une forme aplatie alors que les trois autres sont coniques. Le bras I (encerclé) est en train de régénérer. On remarque l'oeil très développé. (L'animal mange un crabe : *Carcinus maenas*).

Figure 10 : Ventouses de la base d'un bras d'adulte. La ligne en pointillé montre l'arrangement en quinconce d'une des deux rangées.

Figure 11 : Bras hectocotyle (BG IV) d'un mâle adulte. La région hectocotylisée (★) se voit nettement à la base du bras. Les ventouses ont disparu pour la plupart. Celles qui restent sont réduites.

Figure 12 : Coupe transversale d'un bras fixé au liquide de Bouin d'un jeune individu. On distingue les 3 principaux systèmes du bras organisés concentriquement : système nerveux axial, système musculaire, système tégumentaire. Il est aussi possible de distinguer les chromatophores bruns.

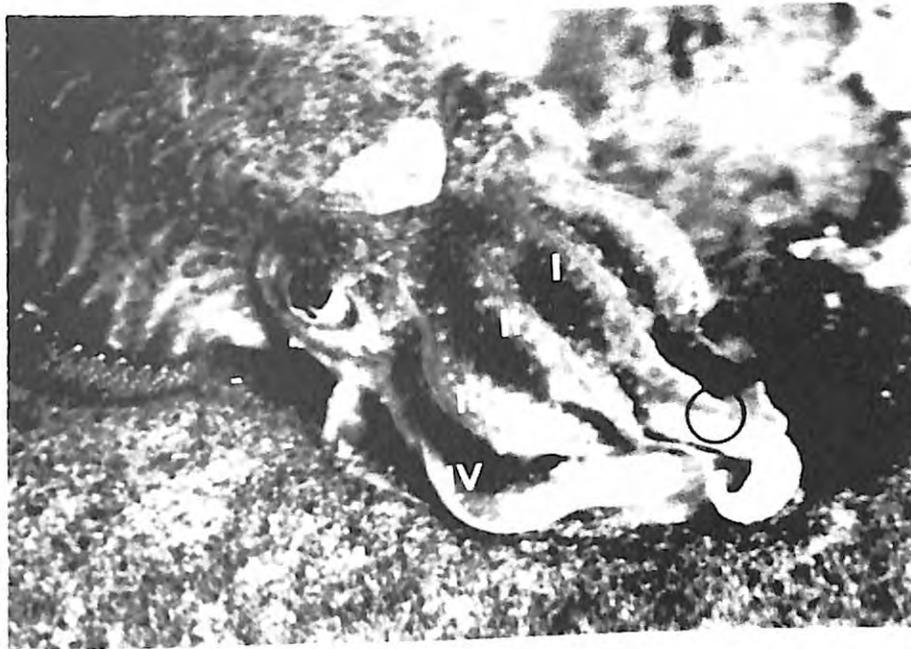


figure 9

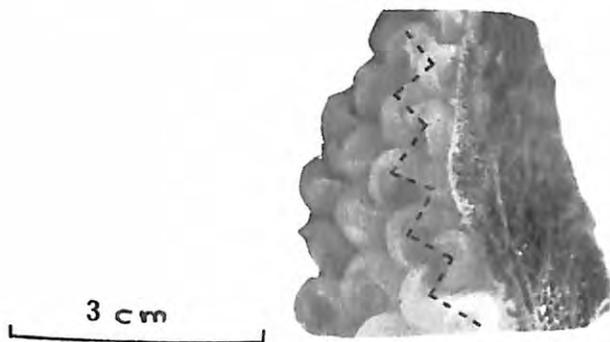


figure 10

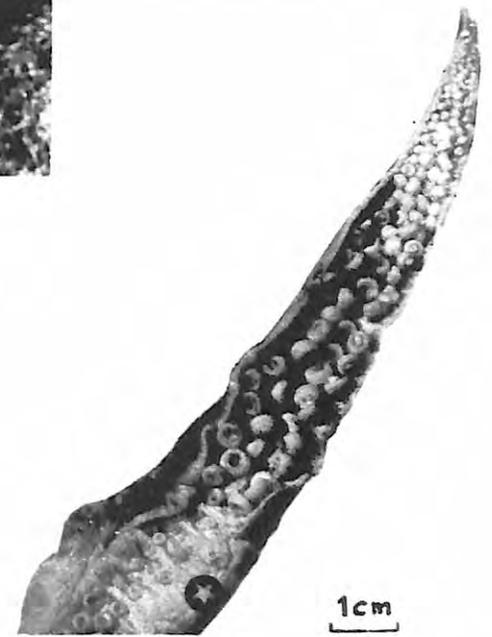


figure 11

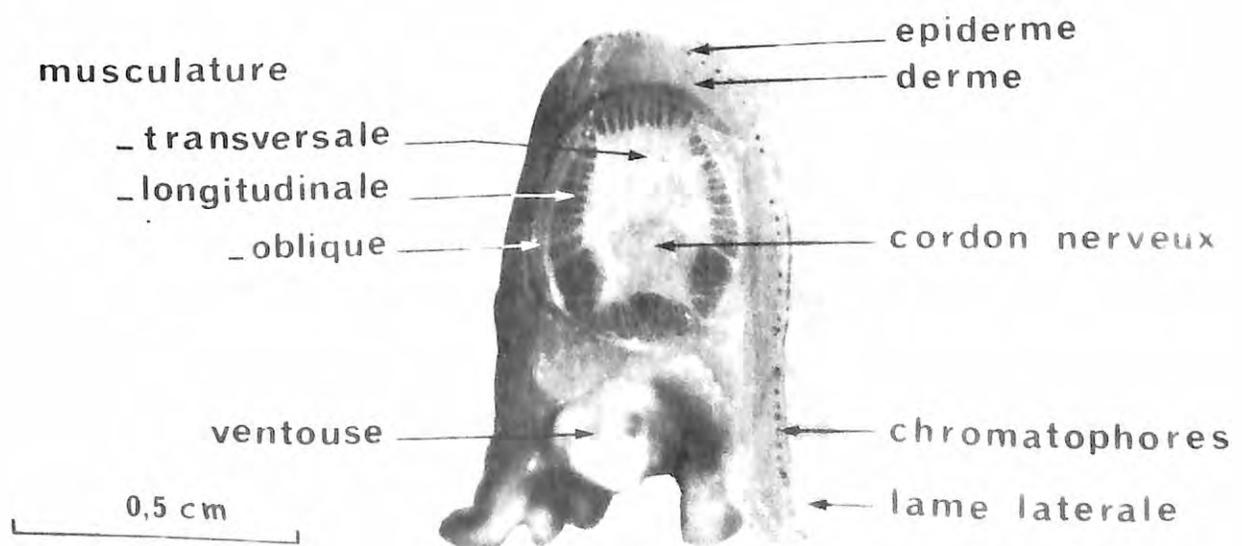


figure 12

## II - CARACTERES EXTERNES

Les Sepiidae, ont un corps aplati, large, des nageoires étroites et allongées, une coquille interne calcaire. La tête porte deux yeux bien développés. On compte dix appendices circumoraux différenciés en quatre paires de bras et une paire de tentacules. Ils sont symétriques par rapport au plan sagittal. Les bras sont numérotés de I à IV de chaque côté, la paire dorsale porte le n° I, la paire ventrale le n° IV. Les paires n° II et n° III sont les bras latéro-dorsaux et latéro-ventraux. (Fig. 9).

Les bras sont de forme conique, courts et très musculeux. Ils portent chacun, sur la face orale, deux rangées longitudinales de ventouses pédonculées à anneau corné, de dimensions variables, les plus grosses se trouvant à la base. (Fig. 10). Les tentacules sont longs et grêles, ils dépassent la longueur de la Seiche, la massue présente seule des ventouses. Ils servent à la capture des proies. Ils sont enroulés dans deux poches sous-oculaires. Les bras sessiles, sauf les deux ventraux, sont réunis par une membrane palmaire peu développée. Chez le mâle, le bras ventral gauche est hectocotylisé et sert à l'accouplement. Les ventouses sont réduites sur environ 1/3 du bras vers sa base, (Fig. 11). (Il arrive que plus d'un bras soit ainsi modifié).

## III - ETUDE ANATOMIQUE, HISTOLOGIQUE ET CYTOLOGIQUE

Coupé transversalement, un bras fixé de *Sepia* permet d'avoir une idée de son anatomie. Il comporte une partie centrale, apparaissant à peu près circulaire, constituée essentiellement de muscles. En son centre, on distingue le cordon nerveux principal. Il est complètement entouré par la musculature qui est puissante et complexe. Une couche plus superficielle représente le système cutané où on distingue les chromatophores juste sous-épidermiques. Les ventouses apparaissent sur la face orale (interne) du bras. De chaque côté, se situent les lames latérales.

Donc trois couches concentriques, représentant trois systèmes principaux du bras : le système cutané, le système musculaire, le système nerveux. (Fig. 12).

Figure 13 : Coupe longitudinale d'un bras de *Sepia* adulte.  
(fixation : Bouin, coloration de van Gienson)

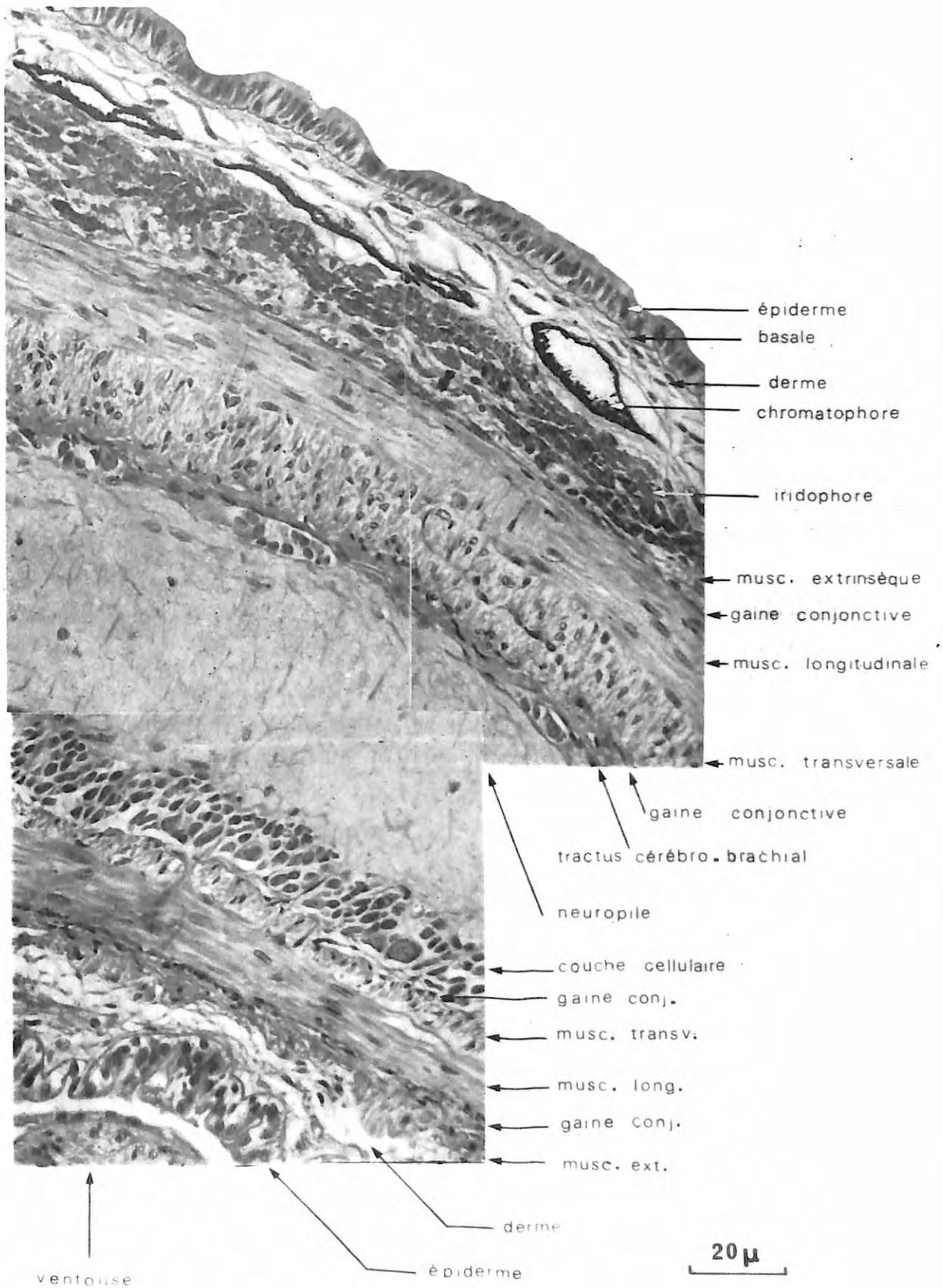


figure 13

## A - L'épiderme

L'épiderme est constitué d'une seule couche de cellules sur tout le bras. Elles sont presque toutes identiques sur la face externe et les faces latérales, de forme prismatique et à microvillosités, (ce que GUERIN appelait cuticule). Cependant, dès 1883, GIROD pensait que la cuticule faisait partie de la cellule. Le noyau, d'aspect globuleux et granuleux, présente une forme ovoïde. L'épiderme devient de plus en plus irrégulier quand on approche des ventouses, sur la face interne, zone où se trouvent des cellules à mucus. A part les pores de ces dernières, la bordure en brosse est continue, l'épiderme se modifie dans la région du pédoncule et de la ventouse. Autour du pédoncule, le basale repose presque directement sur la musculature dont elle n'est séparée que par du collagène. Les cellules sont aplaties. Il n'y a pas de cellules à mucus. Il en est de même au sommet de la ventouse et ce, jusqu'au niveau du sphincter principal où se retrouve du tissu conjonctif. Au niveau de l'infundibulum, les cellules s'allongent ainsi que leur noyau. Les cellules du bord interne sécrètent l'anneau corné muni de dents pointues. En dessous de celui-ci, l'épithélium reprend ses caractères. Il se replie pour tapisser le piston. C'est dans l'épiderme de la face orale et de la ventouse que l'on trouve le plus de cellules à mucus, en ce qui concerne le bras de *Sepia officinalis*. ROSSI et al., (1958) ont mis en évidence de nombreuses cellules nerveuses sensorielles dans la ventouse.

L'observation en microscopie électronique montre que les membranes plasmiques des cellules adjacentes sont très proches l'une de l'autre et s'engrènent par des interdigitations. On remarque aussi des desmosomes. La surface basale repose sur un tissu conjonctif par l'intermédiaire d'une membrane basale bien visible sur les coupes colorées au bleu alcian ou au P A S. La présence quasi continue de microvillosités, sur la face apicale, indique une fonction d'absorption de la cellule. La bordure en brosse est interrompue de temps en temps par l'orifice d'une cellule à mucus (caliciformes). L'épithélium est donc simple, prismatique, à bordure en brosse avec cellules caliciformes. (Fig. 14 et 15).

Figure 14 : (Gt 6 600) Téguments de *Sepia officinalis*

L'épiderme (ep) est formé de cellules s'engrenant les unes aux autres par des interdigitations nombreuses. Il a une bordure en brosse (microvillosités) d'environ  $1\ \mu$  d'épaisseur et une membrane basale (b). Le noyau (Ne) est important et possède un nucléole (n). Le cytoplasme est granuleux et contient de nombreuses mitochondries.

Sous lui, on distingue des éléments du tissu conjonctif : un fibrocyte (f) et son noyau (Nf) ainsi que du collagène. Cette coupe passe par un capillaire veineux (cv) de type 4 (cf. Fig. 45-4) bordé par une rangée de péricytes (p) en contact avec l'hémocyanine (H). Il contient 2 types d'amœbocytes (am), l'un circulant, de forme sphérique, d'environ  $10\ \mu$  avec un noyau de  $5-6\ \mu$  (Na), l'autre immobile, en fuseau, collé à la paroi.

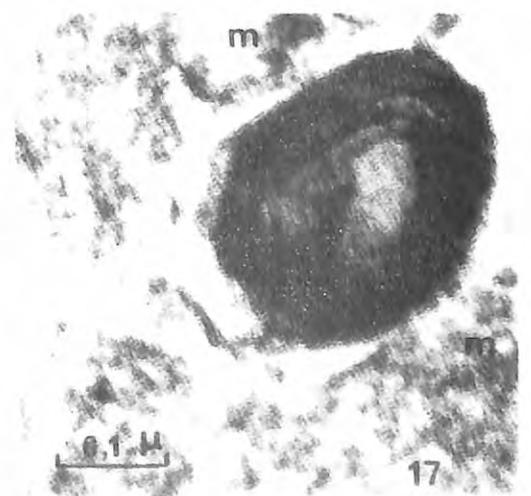
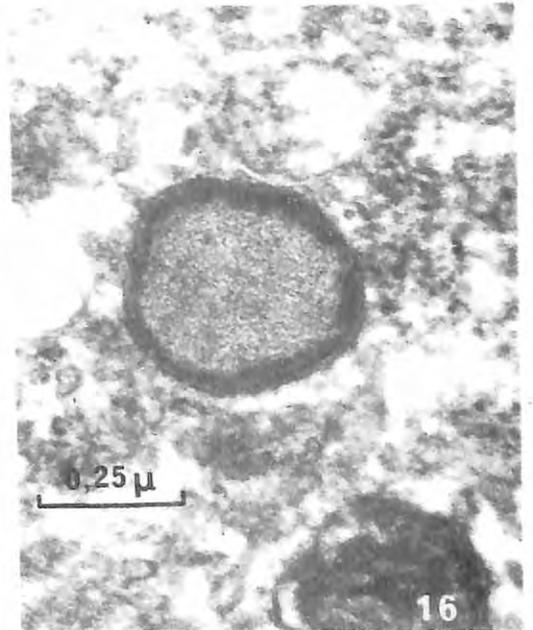
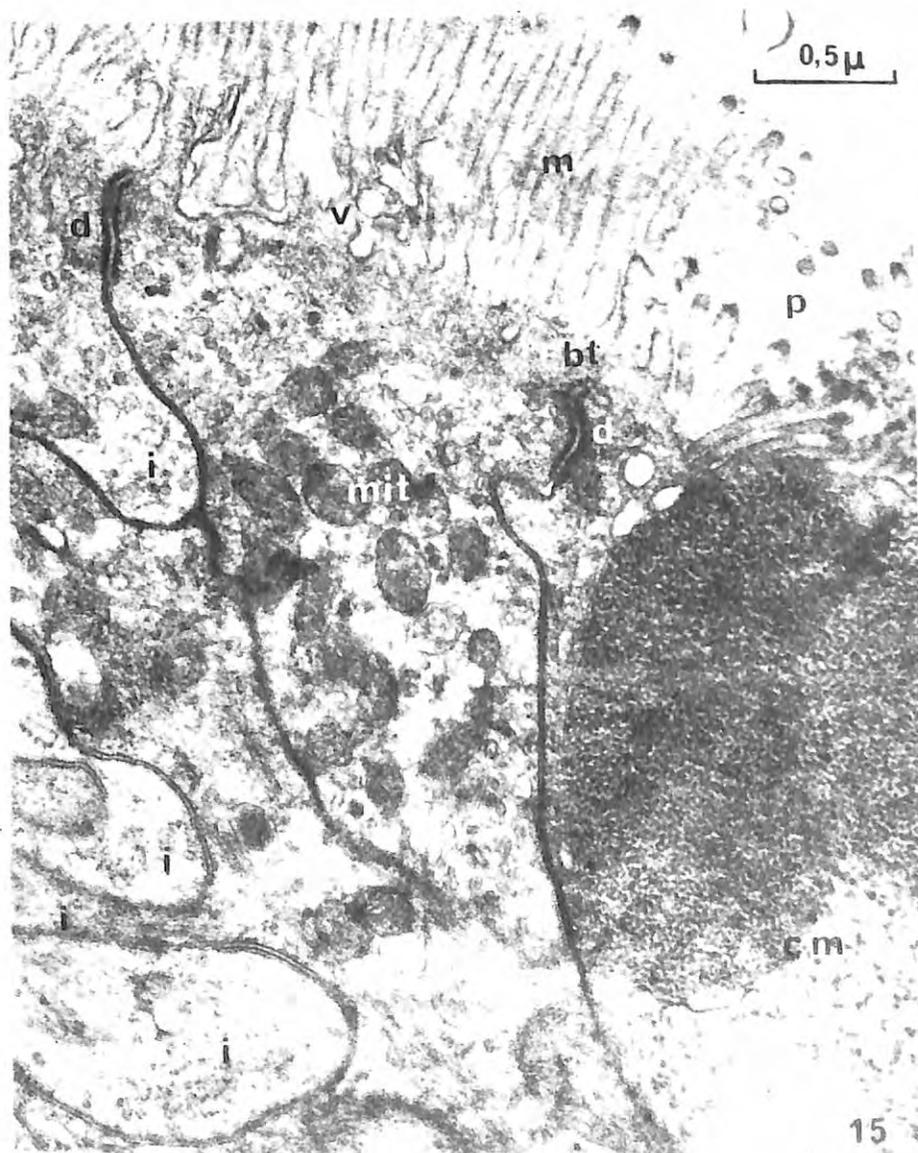
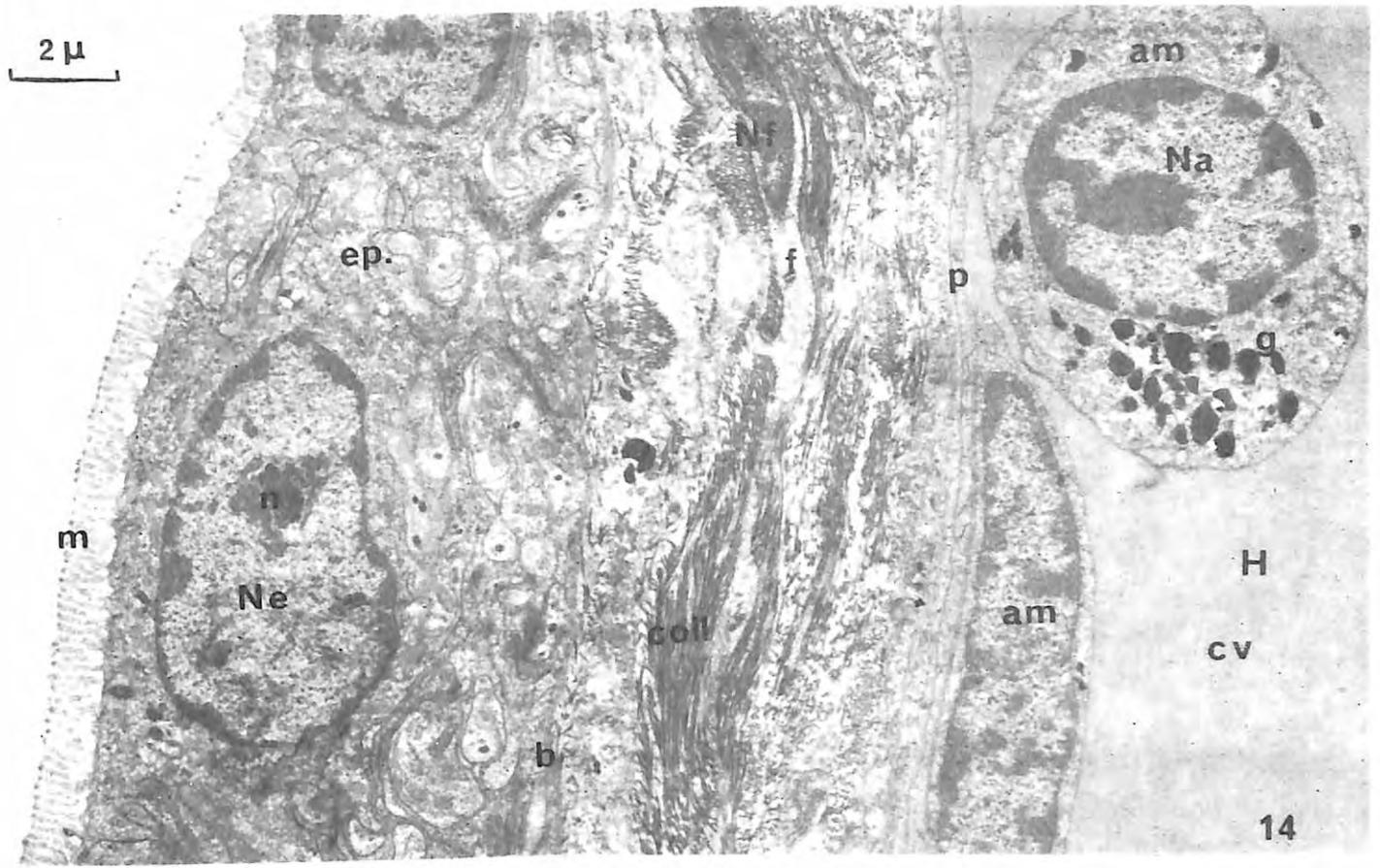
Figure 15 : (Gt 35 000) Cellule épidermique remplie de mitochondries (mit). On peut voir des vésicules de pinocytose (v) et de nombreuses inclusions cytoplasmiques. A côté, une cellule muqueuse (cm) avec du mucus en formation. On note que l'épaisseur des microvillosités (m) diminue au niveau du pore (p). L'espace intercellulaire est réduit. Les dispositifs d'accrochage sont de trois sortes : interdigitations (i), desmosomes (d) (l'espace intercellulaire est plus large), et barre terminale (bt) (l'espace intercellulaire n'existe pratiquement plus).

Figure 16 : (Gt 68 200)

Type d'inclusion cytoplasmique des cellules épidermiques : corps dense, limité par une membrane, de  $0,2$  à  $0,3\ \mu$  de diamètre.

Figure 17 : (Gt 130 000)

Figure de type myélinique qu'il est fréquent de voir au niveau des microvillosités (m). De telles formations peuvent correspondre à un mode d'excrétion.



De par sa structure, on peut dire que l'épithélium a une fonction de protection, d'absorption, de sécrétion (et d'excrétion). (Fig. 16 et 17). Il est dépourvu de vaisseaux sanguins et de capillaires. La nutrition doit se faire par diffusion à partir des capillaires du tissu conjonctif sous-jacent.

L'innervation est représentée par des terminaisons sensibles. Elle montre des caractères primitifs par sa localisation superficielle, son absence de cils sensoriels. A ce niveau, l'épaisseur des microvillosités diminue.

## B - Le derme

Il est essentiellement constitué par du tissu conjonctif. En allant de la surface vers l'intérieur, on distingue quatre couches superposées plus ou moins épaisses selon l'endroit du bras. (L'épaisseur du tissu conjonctif se réduit au niveau du pédoncule et de diverses régions de la ventouse. (Fig. 13)

- une couche de tissu conjonctif lâche, fibreux avec des endroits optiquement homogènes ;
- une couche contenant les chromatophores et leurs fibres musculaires disposées en trois rangs ;
- une couche contenant les iridophores disposés en plusieurs rangs et formant un revêtement à peu près continu ;
- une couche de tissu conjonctif qui sépare la peau de la musculature du bras.

Les muscles peauciers sont quasiment immergés dans le tissu conjonctif sur tout le pourtour du bras. Plusieurs bandes sont présentes du côté externe. Ce tissu est irrigué par de nombreux capillaires sanguins et bien innervé.

### 1 - Le tissu conjonctif

Le tissu conjonctif sous-cutané a été signalé pour la première fois par DELLE CHIAJE, (1825). Nous n'envisagerons ici que le tissu conjonctif proprement dit sans tenir compte des muscles, des nerfs et des vaisseaux sanguins que nous étudierons plus loin.

La masse conjonctive présente partout les mêmes caractères, elle est composée de cellules et de fibres baignant dans une substance fondamentale.

Figure 18 : (Gt 11 660)

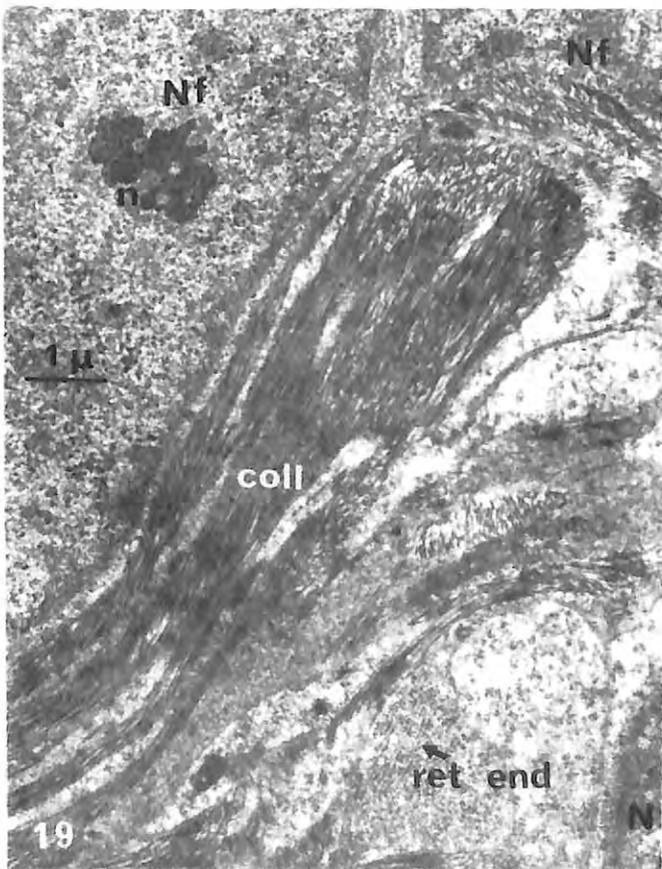
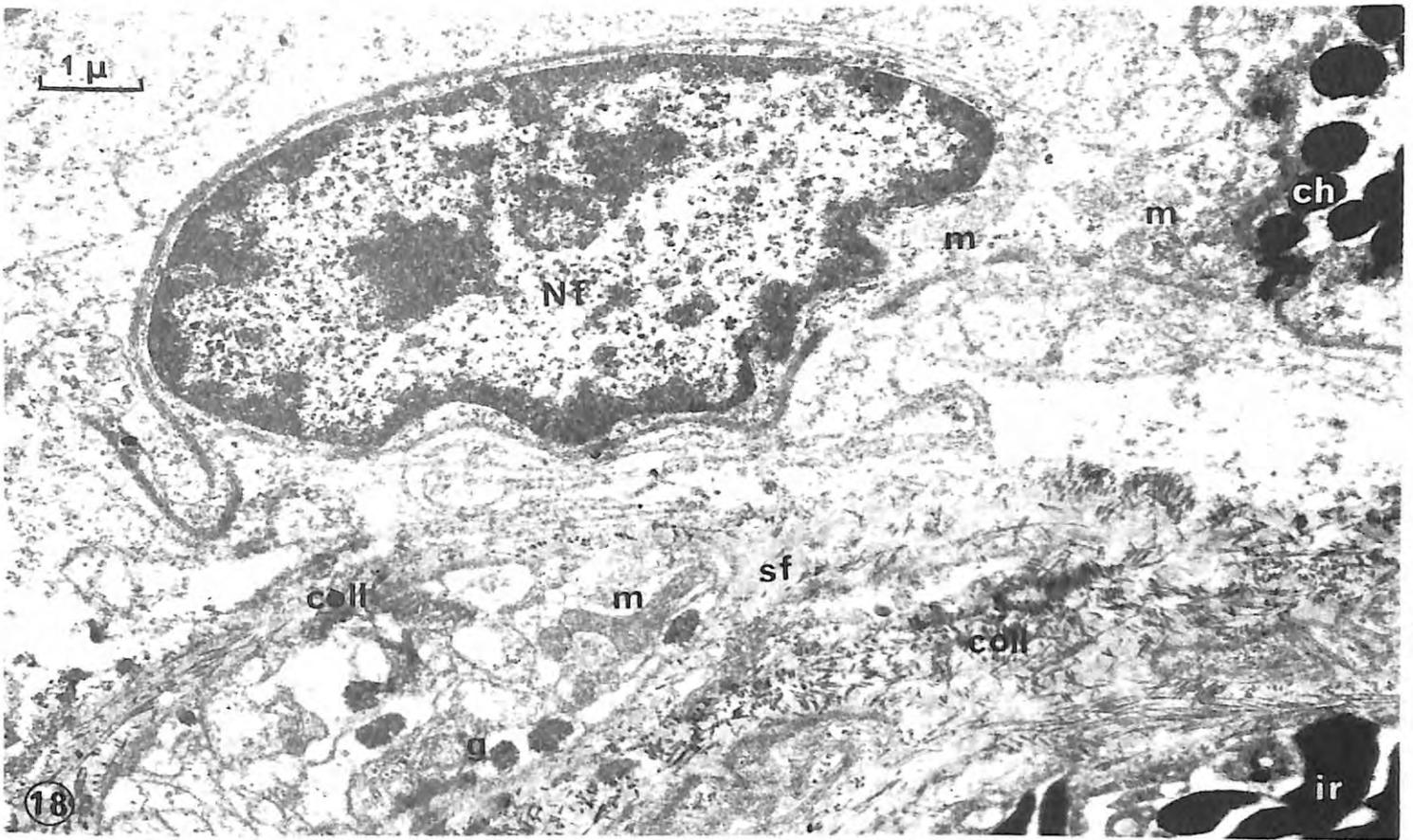
Éléments du derme : On reconnaît un fibrocyte avec son noyau (Nf) et de nombreuses mitochondries. Du collagène (coll) et des éléments gliaux (g) contenant des mitochondries forment la gaine d'un nerf peaucier ou allant à un chromatophore. On peut voir à droite des grains de pigment d'un chromatophore (ch) et les plaquettes iridosomales d'un iridophore (ir).

Figure 19 : (Gt 9 750)

Fibrocytes : On peut en voir 3, séparés par du collagène (coll) et de la substance fondamentale (sf). Le reticulum endoplasmique est bien développé (ret. end.).

Figure 20 : (Gt 73 500)

Collagène : Les fibres sont de 2 types. Le type 1 de 490 Å de diamètre, le type 2 de 270 Å de diamètre. Coupées longitudinalement, une striation de 620 Å de période apparaît. (▲▲▲)



### a) La substance fondamentale

Elle se colore très peu, elle est amorphe, elle a une faible réaction positive au bleu alcian (glycosaminoglycanes) ainsi qu'au P A S (peut-être glycogène) et au bleu de toluidine. Elle contient, en outre, de l'eau et des sels minéraux.

### b) Les cellules

Il n'y a qu'un type de cellules fixes, à noyau allongé, à chromatine périphérique. Le cytoplasme est riche en mitochondries et possède une ergastoplasme abondante. Les fibres de collagène permettent d'assimiler ces cellules à des fibrocytes, (Fig. 18 et 19).

Ils jouent un rôle essentiel dans la biosynthèse de la substance fondamentale et de fibres de collagène. Ils doivent élaborer les GAG et synthétiser les macromolécules de tropocollagène. Il n'y a pas d'adipocytes.

La comparaison avec les Vertébrés devrait s'arrêter à un type cellulaire fixe. Il n'y a pas de représentants de cellules mobiles, macrophages (histiocytes), plasmocytes, mastocytes. Il n'y a pas de système phagocytaire équivalent à celui des Vertébrés. (BAGINSKI, 1964).

Nous verrons que l'on peut trouver des éléments sanguins en plus ou moins grande quantité. Chez *Sepia*, il ne s'agira que des seuls amœbocytes.

### c) Les fibres de collagène

De même que pour les cellules, il ne faudra retenir qu'un type de fibres : les fibres de collagène. Il n'y a pas de fibres élastiques. Ce fait a déjà été observé par GUERIN, (1908).

Les fibres de collagène se présentent isolées ou en faisceaux. Leur abondance est variable. Elles ne s'anastomosent jamais. Leur trajet est souvent ondulant. Elles peuvent être très longues et elles sont finement striées. La période est de 620 Å environ. (Fig. 20).

On trouve 2 catégories de diamètre différent (environ 300 et 500 Å). EASTOE, (1967) a donné la fréquence des résidus acides aminés dans le collagène : glycine 33%, alanine 11%, proline 11%, hydroxyproline 11% et autres acides aminés 33%. La présence de proline et d'hydroxyproline est absolument typique. L'hydroxyproline est si constante,

Figure 21 : Diagramme montrant la fréquence des résidus acides aminés dans le collagène, d'après EASTOE (1967).

Figure 22 : Schéma de la structure retractsée d'un organe chromatophore de *Loligo opalescens*.

A : axone ; C : cortex contractile de la fibre musculaire ;  
F : repli de la membrane cellulaire du chromatophore ;  
G : cellule gliale recouvrant l'axone et ses terminaisons ;  
H : haptosomes reliant des replis de la membrane cellulaire au sac élastique (s) qui renferme les grains de pigment.  
m : mitochondries dans le centre de la fibre musculaire ;  
N : terminaisons nerveuses ; n : noyau des cellules musculaires ; M : fibres musculaires ; J : liaison entre fibres musculaires adjacentes.

La gaine cellulaire qui entoure le chromatophore et les fibres musculaires ne sont pas représentées.

(d'après CLONEY et FLOREY, 1968).

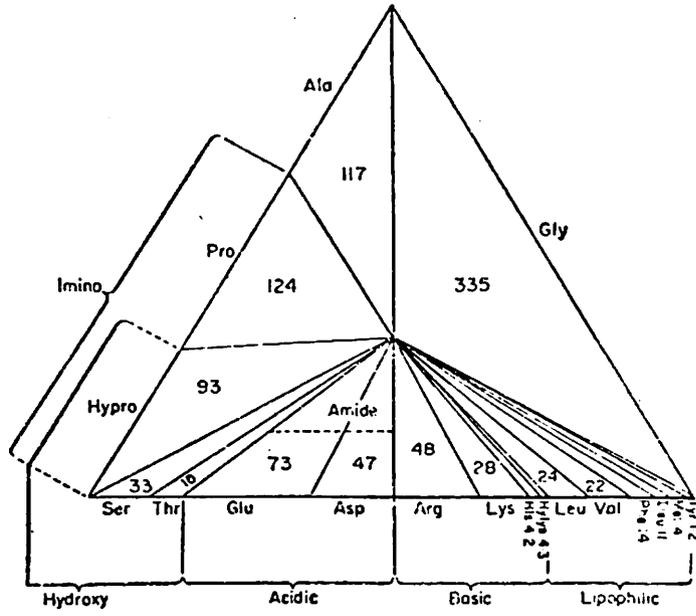


figure 21

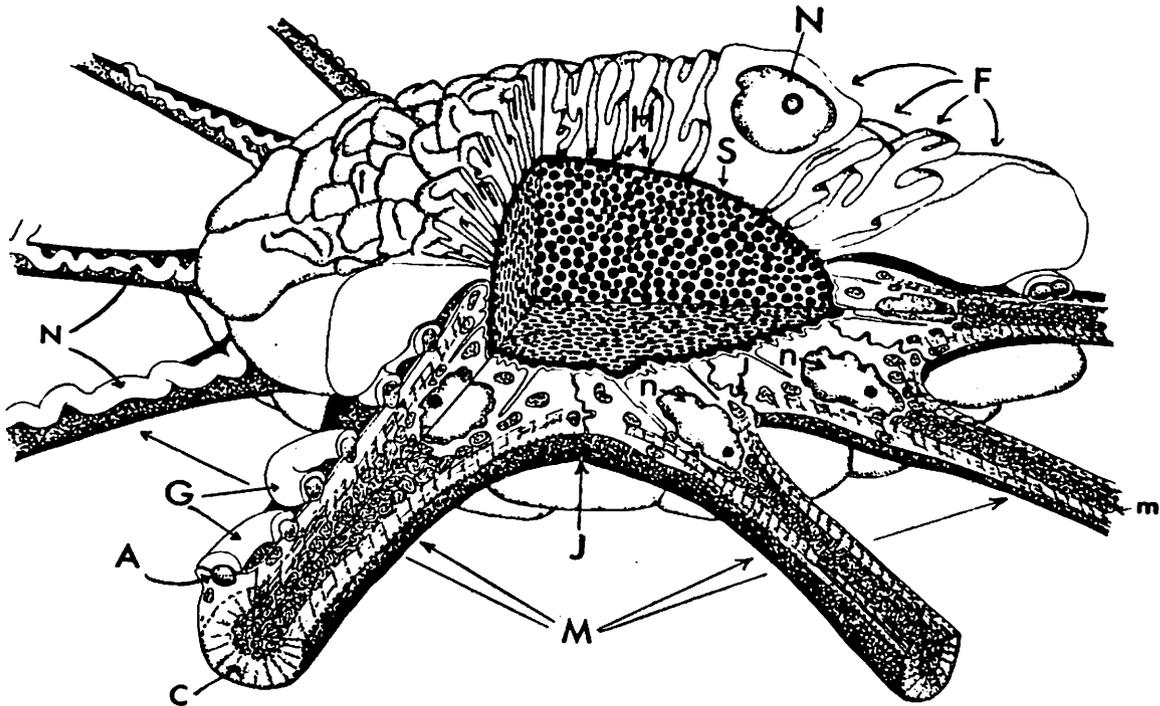


figure 22

(11 à 13%) qu'on a proposé de l'utiliser pour représenter le total du collagène d'un tissu. La cystéine et le tryptophane sont absents. La présence de tyrosine est surtout d'ue à des contaminations. (Fig.21).

Les caractéristiques physiques et chimiques du collagène sont semblables à celles du collagène des poissons d'eau chaude (KIMURA et al., 1969 - BAIRATI, 1972).

## 2 - La coloration de la peau

Décrits la première fois en 1819 par SANGIOVANNI, les chromatophores et les iridophores sont les responsables de la coloration et des changements de couleur de l'animal. Les chromatophores, bruns, rouges et jaunes, selon leur état de contraction ou de dilatation, donnent des teintes allant du blanc ou brun rouge très foncé et au noir, réparties uniformément, ou bien par taches, ou en zébrures (NEILL, 1971). SCHELLING et al., (1971) ont déterminé les colorations provoquées par chaque catégorie selon son état (Tableau 3).

Cellule	jeune	âgée	
		dilatée	contractée
rouge	rouge clair	rouge	brun rouge
brune	orange clair	brun	noir
jaune	jaune clair	jaune foncé	brun rouge

Tableau 3

Les iridophores donnent des bleus et des verts par réflexion et réfraction de la lumière.

On compte 350 chromatophores par mm<sup>2</sup> (FIORONI, 1965). A la naissance, les bras de *Sepia* ressemblent à ceux de l'adulte (forme, proportion et coloration).

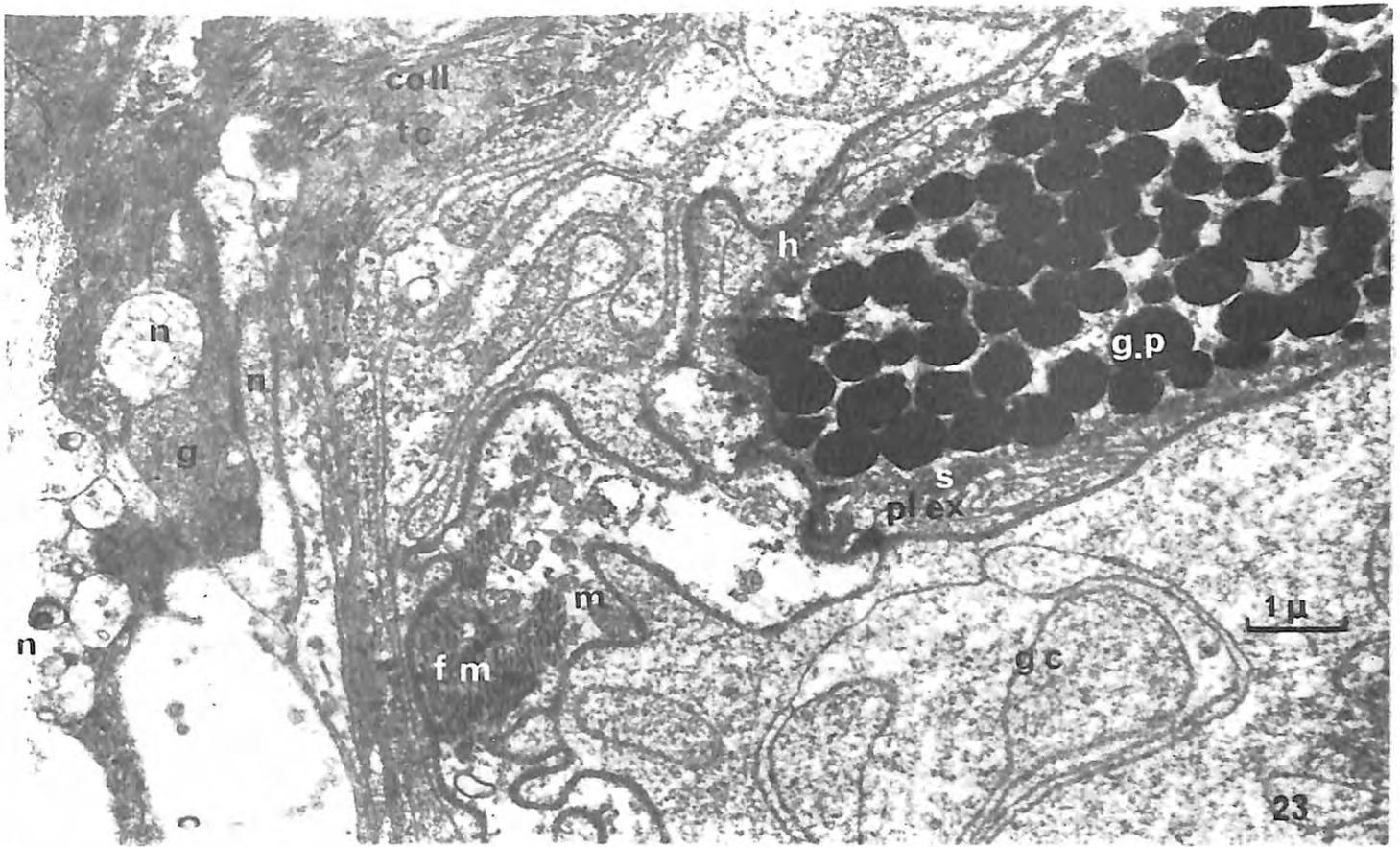
La formation embryologique a été étudiée par FIORONI, (1970) sur *Octopus vulgaris* et SCHELLING et al., (1971) sur *Loligo vulgaris*. Les événements sont les mêmes chez *Sepia*.

Figure 23 : (Gt 11 660)

Chromatophore brun : On peut voir sur ce cliché le sac élastique (s) contenant les grains de pigment omochromes (gp) et relié à la paroi cellulaire par des haptoosomes (h). On distingue le plasme externe (plex). Une des fibres musculaires (fm) coupée par le milieu arrive au chromatophore. Elle contient de nombreuses mitochondries (m). L'organe chromatophore est entouré d'une gaine cellulaire (gc). On distingue d'autre part des éléments nerveux (n) contenant de petites vésicules claires et entourés de glie fibreuse (g), ainsi que du tissu conjonctif (tc) contenant du collagène (coll).

Figure 24 : (Gt 39 600)

Iridophore : La cellule est limitée par une lame basale (lb). Elle contient des plaquettes iridosomales composées de guanine (pl.i) formant des iridosomes (i) et des vésicules (v). A l'extérieur, on a du tissu conjonctif où, noyées dans la substance fondamentale (sf), on trouve les deux types de fibres de collagène (coll) orientées à 90° les unes par rapport aux autres. On note la même périodicité des bandes que dans la figure 20.



### a) Les chromatophores

L'étude ultrastructurale a été faite par CLONEY et al., (1968) sur *Loligo opalescens*. Le chromatophore proprement dit, qui contient les grains de pigment, est entouré de fibres musculaires radiales "pseudostriées" (voir plus loin), qui permettent l'expansion du chromatophore. La fibre musculaire du chromatophore est divisée en deux régions. A l'extérieur, elle est contractile (filaments d'actine et de paramyosine). Au centre, elle est bourrée de mitochondries. Le noyau est près du sac pigmentaire (WEBER, 1973). Ces fibres sont en relation avec des axones eux-mêmes accompagnés de cellules gliales. Le pigment est contenu dans une sorte de sac élastique relié à la paroi cellulaire par des haptosomes zonaux à l'équateur du chromatophore. Le chromatophore, les fibres musculaires et les nerfs sont entourés d'une gaine de cellules conjonctives. (Fig. 22 et 23). L'innervation des fibres a été étudiée par WEBER (1968, 1970 et 1973) sur *Loligo vulgaris*. Les fibres nerveuses forment un contact synaptique avec le sarcoplasme et suivent la fibre musculaire. Sur les plus grands chromatophores bruns des structures nerveuses pénètrent dans la fibre musculaire.

Il existe des jonctions myochromatophores, neuromusculaires et myomusculaires (MIROW, 1972). Les chromatophores rouges et bruns ont une innervation commune, les jaunes sont à part, (FLOREY, 1966).

FRÖSCH (1973) a montré sur *Octopus vulgaris* que les chromatophores des bras étaient commandés par les nerfs brachiaux.

Les grains de pigment brun ont une structure interne. Ce sont des pigments ommochromes produits par oxydation du tryptophane (FOX et al., 1960).

### b) Les iridophores

Ce sont des cellules nucléées, plates, ovales, contenant des lames arrangées en chaînes contournées et entremêlées (SCHÄFER, 1937). KAWAGUTI et al., (1962) en ont trouvé deux sortes : des courts, ellipsoïdes, de 50  $\mu$  de longueur sur 20  $\mu$  de diamètre et des longs, ellipsoïdes aussi de 100  $\mu$  de longueur sur 30  $\mu$  de diamètre.

Les premières observations au microscope électronique sont dues à ARNOLD (1967) sur l'iris de *Loligo*. Les plus courts sont disposés

proches l'un de l'autre en association avec des cellules musculaires. Les plus longs forment une couche plus profonde. Tous sont situés sous les chromatophores.

Les iridophores contiennent des plaquettes formant un iridosome. (Fig. 24). Ces iridosomes ondulent plus ou moins. FOX et al., (1960) ont démontré par analyse biochimique que ces plaquettes étaient formées de guanine. Ils ont également trouvé des figures myéliniques associées aux iridosomes. Les iridosomes sont des réflecteurs. La couche la plus profonde (iridophores longs) réfléchit la lumière transmise par la couche supérieure (iridophores courts). La forme des courts, déterminée par contraction musculaire influe sur la transmission des longueurs d'ondes.

Les iridophores n'apparaissent qu'en fin de période embryonnaire ou après l'éclosion (FIORONI 1963, ARNOLD 1967).

Les changements rapides de couleurs observés dans la peau des Céphalopodes, sont dûs à un unique système anatomique composé des organes chromatophores et des iridophores.

## C - Système musculaire

Nous verrons surtout ici la musculature des bras sessiles. La musculature de l'appareil brachial se révèle extrêmement complexe. Elle comprend : la musculature brachiale proprement dite (intrinsèque), la musculature acétabulaire (la musculature intrinsèque de la ventouse), la musculature acétabulo-brachiale (disposition des muscles extrinsèques unissant la ventouse et le bras), la musculature interbrachiale qui unit les bras entre eux et la musculature des lames latérales. (Fig. 13).

### 1 - Musculature intrinsèque (Fig. 25)

Le cordon nerveux axial est entouré par une musculature dans laquelle on distingue des muscles longitudinaux, des muscles transversaux et des muscles obliques. Cette musculature est limitée par une gaine de tissu conjonctif.

Figure 25 : (fixation BOUIN - trichrome de MASSON)

Coupe transversale d'un bras d'adulte : tc - tissu conjonctif, ext - musculature extrinsèque,  $O_1$  et  $O_2$  - musculature oblique, long - musculature longitudinale, trans - musculature transversale, g - gaine conjonctive, c - cordon nerveux intramusculaire, c n a - cordon nerveux axial.

Figure 26 : (fixation BOUIN - trichrome de MASSON)

Coupe longitudinale de la musculature brachiale : m.tr. - musculature transversale, m lg int. - musculature longitudinale intrinsèque, gc - gaine conjonctive, m lg ext. - musculature longitudinale extrinsèque, m a b. - musculature acétabulobrachiale, tc - tissu conjonctif.

Figure 27 : (fixation BOUIN - azocarmin)

Coupe transversale montrant les trabécules formés par la musculature transversale dans la musculature longitudinale (mêmes légendes).

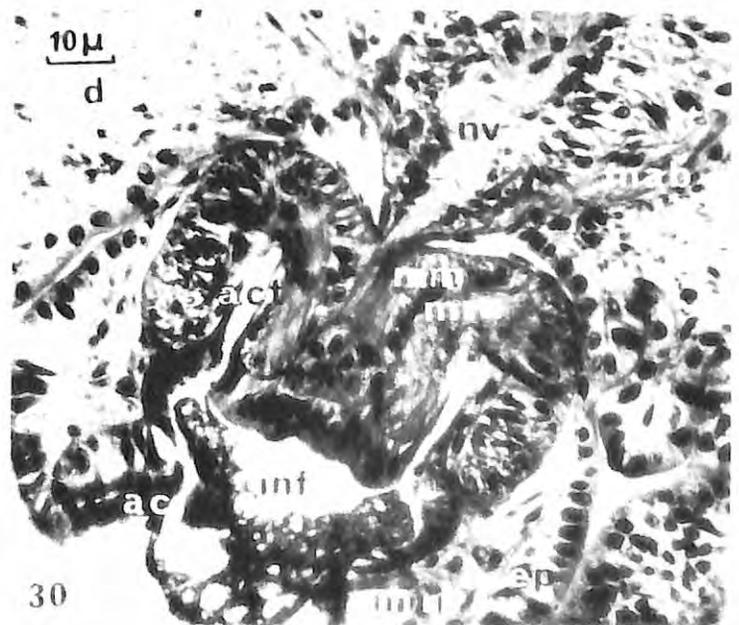
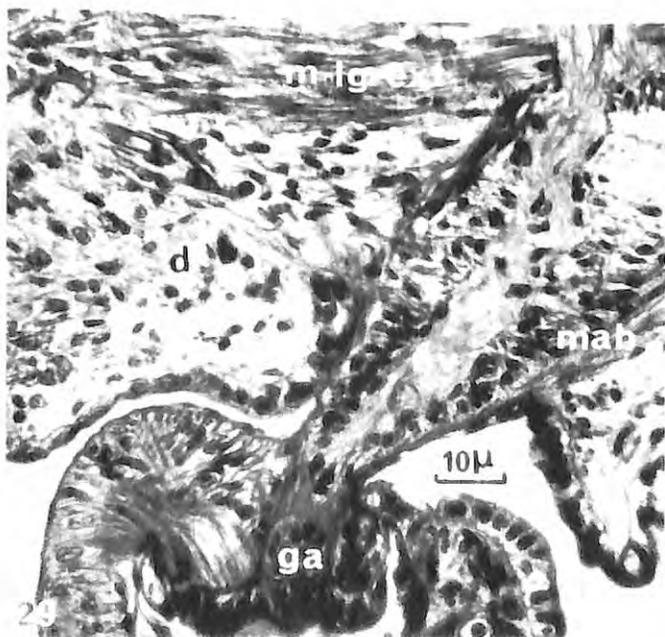
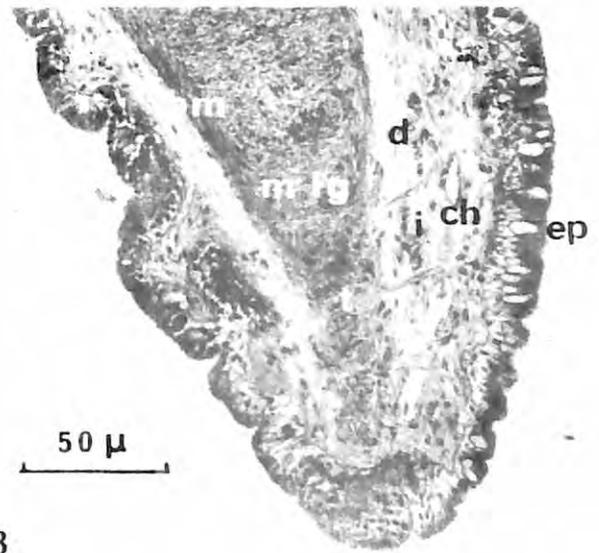
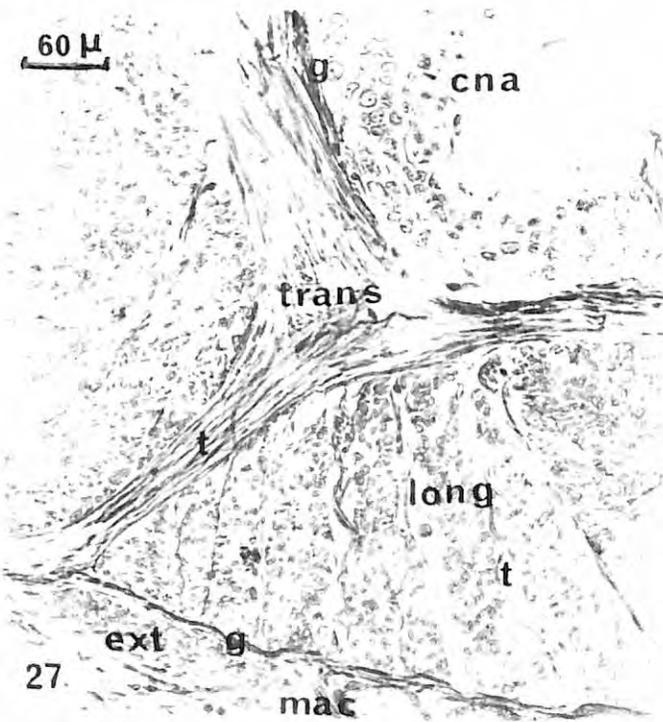
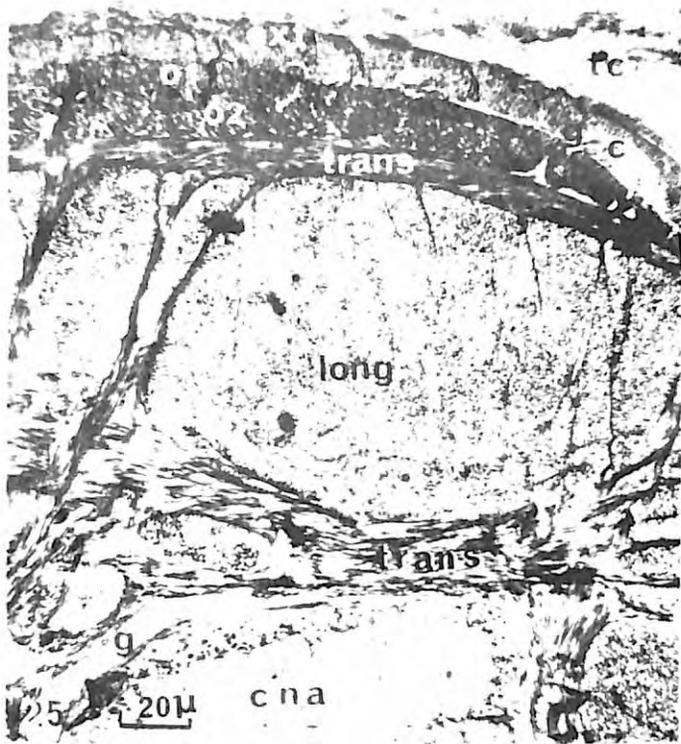
Figure 28 : (fixation BOUIN - trichrome de MASSON)

Coupe transversale d'une lame latérale : ep - épiderme, d - derme, ch - chromatophore, i - iridophore, bm - bande musculaire, m.lg - musculature longitudinale, t - trabécules de musculature transversale.

Figures 29 et 30 : (fixation BOUIN - trichrome de MASSON)

Anatomie de la ventouse

m lg ext. - musculature longitudinale extrinsèque, m a b - musculature acétabulo brachiale (elle traverse la musculature extrinsèque), m.m. - musculature méridienne, m r a - musculature radiaire acétabulaire, m r i - musculature radiaire infundibulaire, act - acétabulum, inf - infundibulum, ac - anneau corné, n.v. - nerf de la ventouse, g.a. ganglion acétabulaire, d - derme, ep - épiderme.



La musculature longitudinale est formée de muscles qui sont groupés en faisceaux de section triangulaire, quadrangulaire ou bien elliptique. Ces faisceaux ont un rôle dans la contraction du bras. Ils sont répartis en une couche unique (contrairement aux Céphalopodes Octopodes) (Fig. 12).

La musculature transversale forme des trabécules séparant les faisceaux longitudinaux et un enchevêtrement autour du cordon nerveux axial. Les fibres s'insèrent sur la gaine conjonctive résistante qui entoure la musculature longitudinale. Une couche de fibres transversales renforce intérieurement la musculature oblique. (Fig. 25).

La musculature oblique est représentée par deux couches contiguës, disposées latéralement. Elles sont d'obliquité alternante et sont séparées du reste de la musculature brachiale par une mince couche de tissu conjonctif. Rien ne sépare les deux couches de musculature oblique. Les fibres acétabulo-brachiales s'entremêlent à leur origine avec la musculature oblique, après avoir traversé la musculature extrinsèque (interbrachiale) (Fig. 25).

## 2 - Les muscles de la ventouse (Fig. 29 et 30)

La ventouse comporte la chambre acétabulaire (champ aspirant) et l'infundibulum (champ adhérent). Un système de fibres radiales se trouve au fond de l'acétabulum et sur les parois de l'infundibulum. Un sphincter principal asymétrique sépare les muscles radiaux acétabulaires et infundibulaires. Il n'y a pas de sphincter infundibulaire. Les sphincters acétabulaires sont comparables au sphincter principal, mais sont plus petits. Les fibres de la musculature méridienne traversent la musculature radiale de la chambre acétabulaire.

## 3 - La musculature acétabulo-brachiale (Fig. 26 et 30)

C'est elle qui constitue le pédoncule. Elle est formée par des faisceaux coniques, serrés les uns contre les autres du fait du rapprochement des ventouses. La partie supérieure du pédoncule

est occupée par une musculature à fibres hélicoïdalement disposées dont les extrémités s'insèrent à des niveaux variables sur la gaine conjonctive pédonculaire.

La musculature longitudinale est en rapport avec la musculature intrinsèque. Les faisceaux extérieurs ont leurs fibres entremêlées à celles de la musculature oblique du bras. Elles traversent la musculature extrinsèque du bras. Les faisceaux musculaires internes s'insèrent dans la gaine conjonctive.

Les fibres de la musculature transversale séparent par paquets, les muscles longitudinaux.

#### 4 - Musculature extrinsèque (interbrachiale) (Fig. 26 et 27)

On trouve sur tout le pourtour du système musculaire, à l'extérieur de la couche conjonctive, un anneau musculaire longitudinal que GUERIN (1908) pense être homologue de la musculature interbrachiale. Cette couche musculaire est traversée par les fibres de la musculature acétabulaire et par les nerfs issus du cordon nerveux axial ou arrivant à lui, ainsi que par des fibres de la musculature des lames marginales.

#### 5 - Les lames marginales (Fig. 12 et 28)

Il existe chez la Seiche des expansions lamellaires, constituées essentiellement de tissus musculaire et conjonctif. Elles occupent les deux bords de la face orale des bras sessiles. La masse musculaire centrale est en dehors de la musculature longitudinale extrabrachiale. Elle en est séparée par du tissu conjonctif. Les lames marginales sont constituées par des muscles longitudinaux qui sont séparés en paquets par des trabécules de muscles transversaux et du tissu conjonctif. On observe une bande musculaire de fibres transversales qui s'accroche sur toute l'étendue inférieure de la lame. Elle traverse les téguments du bras et vient s'insérer contre la gaine périphérique de la musculature intrinsèque, après avoir traversé les fibres de la musculature extrabrachiale. L'épiderme présente peu de cellules à mucus. Il y a des chromatophores dans le derme.

## 6 - La cellule musculaire (Fig. 31 à 37)

La majorité de la musculature de tous les Mollusques est composée de petites cellules non striées et uninucléées (HOYLE 1964 in WILBUR et YONGE). Mais on peut aussi trouver des fibres plus ou moins striées dans les muscles adducteurs de Lamellibranche. Dans ces muscles, les fibres les plus rapides sont striées obliquement et non transversalement. De telles striations ont été découvertes par PLENK (1933) dans le bras d'*Octopus* et dans son gésier. Il a décrit une striation semblable dans les bras et les nageoires de *Loligo* et les tentacules de *Sepia*, la radula et les muscles rétracteurs des tentacules de Gastéropodes. La partie lisse est responsable des contractions longues qui doivent être "économiques" (contraction tonique). La striation se rencontre dans les fibres qui induisent les mouvements rapides (contraction phasique). HANSEN et al., (1959) les ont décrites comme des fibres lisses entourées des fibrilles périphériques.

L'étude ultrastructurale chez *Sepia* (manteau) a été faite par KAWAGUTI et al., (1957). Ce type de fibre est qualifié de "pseudostriée". (Fig. 33 et 34).

Chez les Vertébrés, les cellules musculaires striées sont très allongées, cylindriques. Les noyaux sont multiples. Le cytoplasme renferme deux systèmes de réticulum endoplasmique lisse, un système longitudinal formant un réseau de canalicules et des saccules longitudinaux entourant chaque myofibrille et un système transversal de canalicules étroits formés par des invaginations tubulaires de la membrane plasmique et entourant les myofibrilles au niveau des bandes A et I (voir ci-dessous). Le cytoplasme contient les organites habituels (corps de Golgi, nombreuses mitochondries, lipides, glycogène). La membrane plasmique entoure la cellule et est revêtue sur sa face externe par une lame continue au delà de laquelle peuvent s'insérer des fibres de collagène.

Le cytoplasme est caractérisé par la présence d'un matériel protéique contractile formant les myofilaments qui sont groupés en myofibrilles. Chacune d'elle est divisée en une succession de sarcomères. Chaque sarcomère, représentant en fait plusieurs myofilaments parallèles (filaments épais de myosine et filaments fins d'actine), est limité par la strie Z. On trouve successivement une bande I (claire), une bande A (foncée) et une nouvelle bande I (claire). La bande A est elle-même divisée en deux par une bande H plus claire.

- Figure 31 : Morphologie du sarcomère de Vertébré et ses variations au cours de la contraction. (voir texte)  
(d'après HUXLEY et HANSON 1960).
- Figure 32 : Morphologie du sarcomère de *Sepia* au cours de la contraction. Les accumulations granulaires (►) sont marquées alternativement de chaque côté du sarcomère.  
(d'après GONZALEZ-SANTANDER et GARCIA-BLANCO 1972).
- Figure 33 : Fibre musculaire à striation oblique, STO : système tubulaire oblique ; M : mitochondrie ; N : noyau.  
(d'après GONZALEZ-SANTANDER et GARCIA-BLANCO 1972).
- Figure 34 : Fibre musculaire à striation oblique, Coupes transversales passant par :  
A - le cône supranucléaire qui contient les mitochondries  
B - le noyau  
C - le cône infranucléaire.  
(d'après GONZALEZ-SANTANDER et GARCIA-BLANCO 1972).

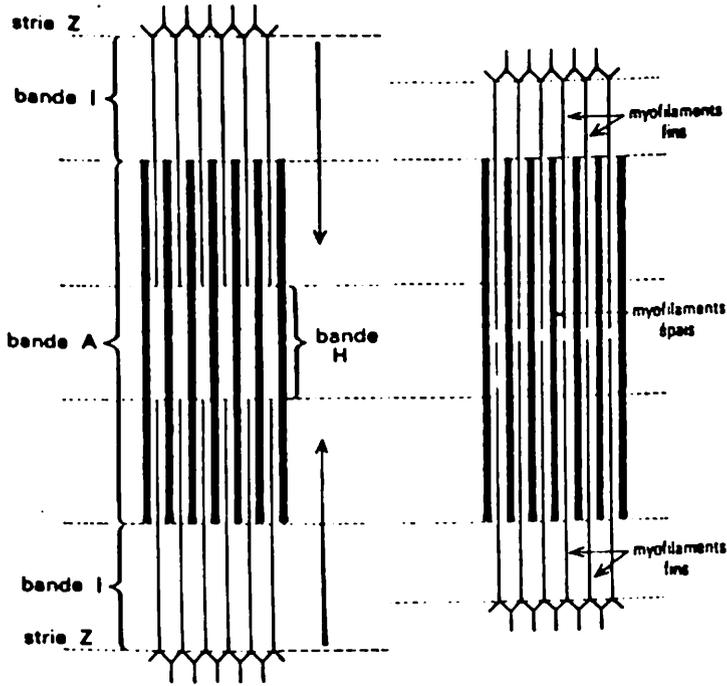


figure 31

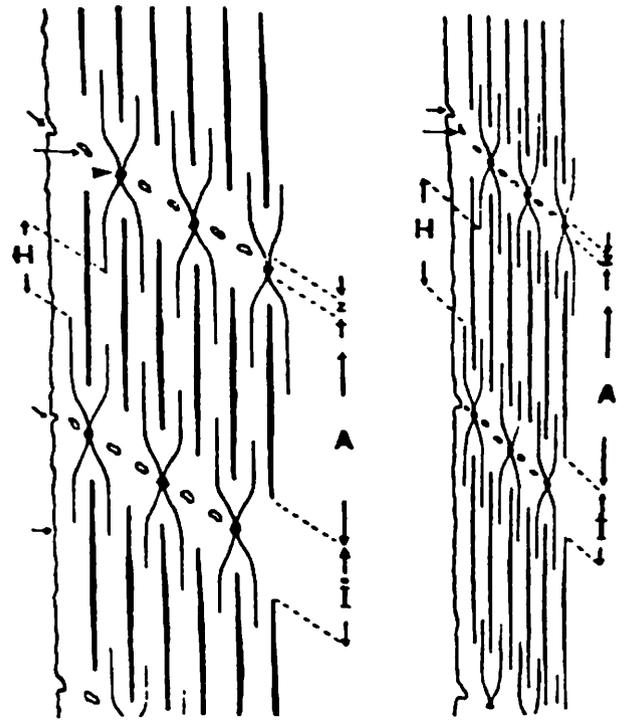


figure 32

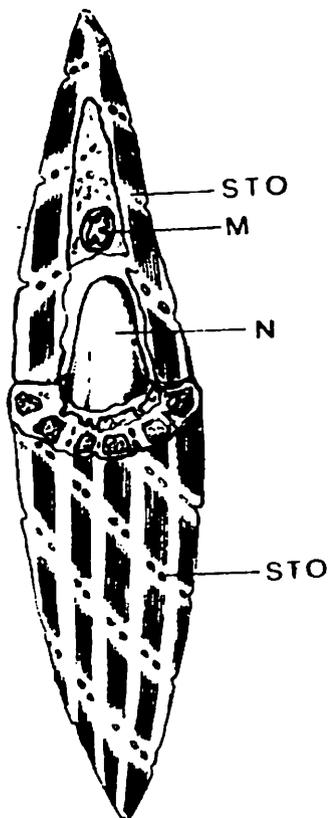


figure 33

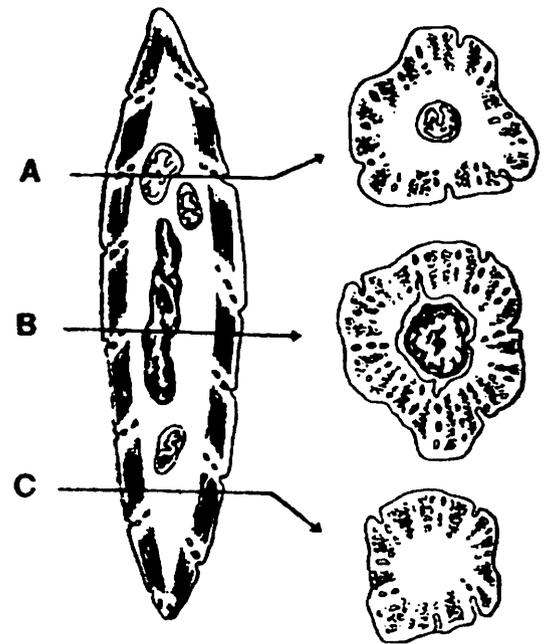


figure 34

Figure 35 : (Gt 14 300)

Coupe transversale de muscle longitudinal de *Sepia officinalis*. Les cellules sont coupées au niveau des cônes supra et infra-nucléaire (Fig. 34). Des mitochondries (m) sont visibles ainsi que les réseaux tubulaires. On reconnaît un noyau de fibrocyte (Nf) de la gaine de tissu conjonctif (tc). Du collagène (coll) remplit l'espace extracellulaire,

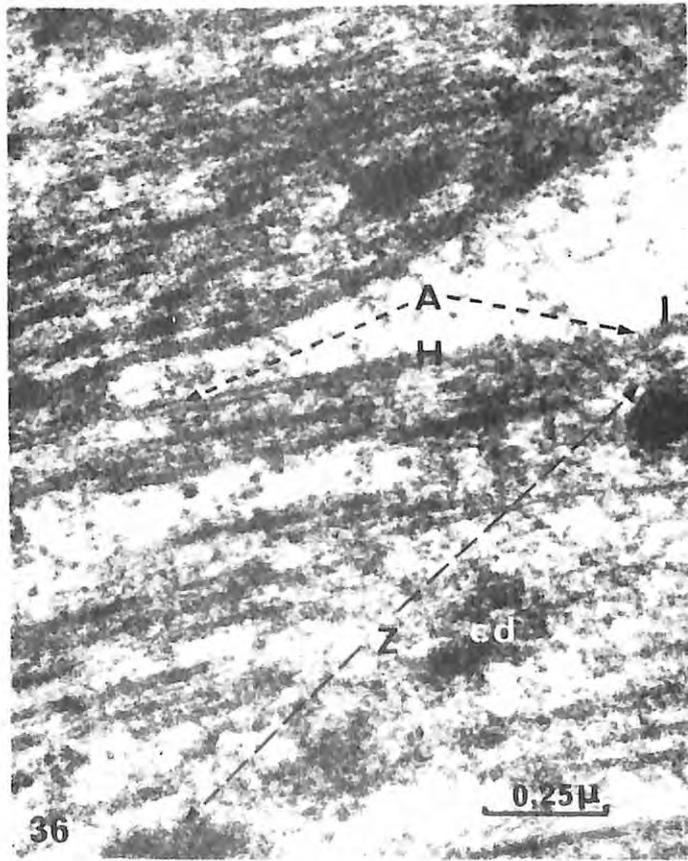
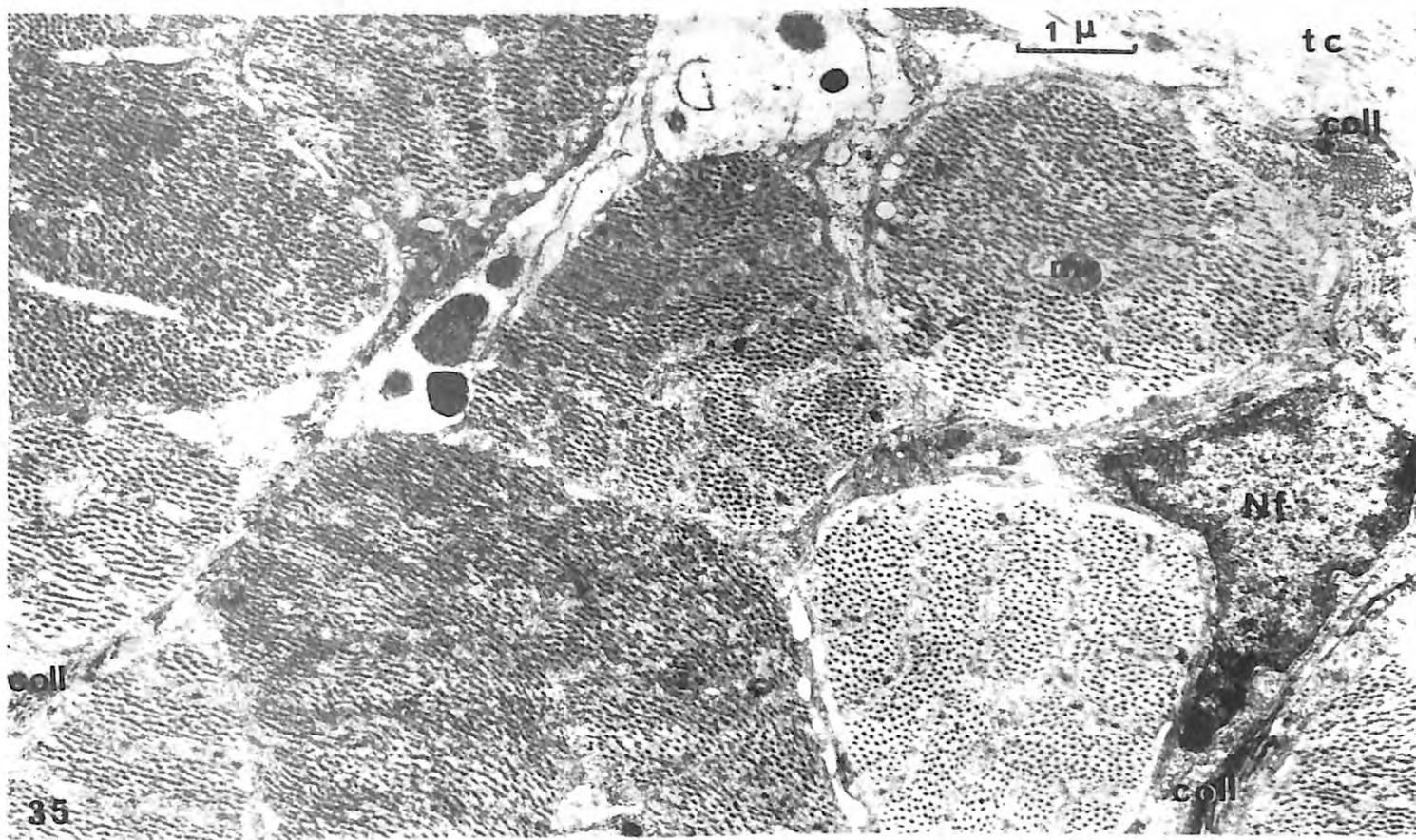
Figure 36 : (Gt 58 500)

Ultrastructure de la striation du muscle de *Sepia officinalis*. A : bande sombre ; I : bande claire ; H : bande correspondant aux filaments de paramyosine quand ils sont seuls, cd : accumulation granulaire formant l'équivalent d'une strie Z.

Figure 37 : Gt (18 000)

Coupe transversale d'une cellule d'un muscle peaucier dont l'innervation (n) est visible.

(Nm : noyau de la cellule musculaire ; f : myofilaments ; tc : tissu conjonctif ; coll : collagène).



La bande A correspond aux filaments de myosine qui chevauchent les filaments d'actine. La bande H est l'endroit où l'on ne trouve que la myosine. Au niveau de la bande I, les filaments fins d'actine sont seuls présents. La strie Z, limite du sarcomère, est marquée par l'interpénétration des filaments d'actine de deux sarcomères contigus. La contraction se fait par pénétration des filaments fins entre les filaments épais (disparition de la bande H). (Fig. 31).

Chez les Céphalopodes, les cellules musculaires sont mononucléées, fusiformes. Le noyau se trouve au milieu du sarcoplasme. Les myofibrilles sont arrangées longitudinalement, entourées de réticulum endoplasmique lisse. GONZALEZ-SANTANDER et al., (1972) ont étudié l'ultrastructure de ces fibres musculaires pseudostriées chez *Sepia officinalis*. Il est possible de faire un parallèle avec ce qui vient d'être décrit chez les Vertébrés. Le réticulum endoplasmique est arrangé en un "système longitudinal de saccules" et en un "système tubulaire oblique" (Fig. 33 et 35). Les myofibrilles contiennent des myofilaments fins (50 Å) et, épais et fuselés (300 Å et 100 Å). Les filaments épais produisent une bande A, sombre, qui est hélicoïdale (et non plus cylindrique comme chez les Vertébrés). Les filaments fins, quand ils sont seuls, donnent la bande claire I, qui est aussi hélicoïdale. L'équivalent d'une strie Z est formé par une rangée régulière de "corps denses" (accumulation granulaire) (Fig. 32 et 36). L'espace extracellulaire est rempli de collagène fibrillaire. (Fig. 35). Des fibres pseudostriées existent dans le derme (Fig. 37) et le long du cordon nerveux axial (Fig. 99 et 101).

#### D - Le système nerveux brachial (Fig. 39 à 44)

Chaque bras est parcouru dans toute son étendue par un axe nerveux, se renflant en ganglions rapprochés au point de se toucher et même de se confondre (GUERIN, 1908). Cet axe est séparé du tissu musculaire par une gaine de tissu conjonctif. Les éléments sont les mêmes que ceux du tissu conjonctif dermique. On compte six cordons périphériques dans la musculature inter-brachiale. (Fig. 13).

Chaque catégorie de muscles est innervée séparément, ce qui leur confère une remarquable autonomie. Les muscles longitudinaux intrinsèques raccourcissent le bras et servent à saisir des proies et à les porter à la bouche. Les muscles transverses et obliques servent à allonger le bras. Le cordon axial est le centre moteur le plus important du bras.

Les quatre paires de nerfs (cordons axiaux) sont issues de l'extrémité antérieure du ganglion brachial (formation nouvelle chez les Céphalopodes), ils longent le sinus péribuccal et pénètrent dans les muscles des bras à mi-chemin de ce sinus. Un peu après, ils forment chacun un petit ganglion. Une commissure interbrachiale les relie, formant un cercle complet, en dehors duquel passent les nerfs tentaculaires. De nombreux petits nerfs, issus de ces ganglions, pénètrent dans le bras. Après la commissure, chaque nerf brachial entre dans le bras correspondant, accompagné de l'artère brachiale. De cet axe partent les nerfs des ventouses.

SPRENKEL ( 1929) a étudié les terminaisons nerveuses dans les muscles du bras mais sans bien préciser de quel muscle. Il parle de renflements terminaux, probablement intracellulaires au voisinage du noyau. Il remarque la présence de cellules, rappelant les cellules interstitielles des Vertébrés, sur le trajet des nerfs.

#### 1 - Le cordon nerveux axial

Il est formé par une série de ganglions très rapprochés arrangés en un cortex tout le long du bras. Ce cortex encadre un neuropile constitué par un enchevêtrement de fibres nerveuses. Du côté externe et du côté interne, on peut observer deux gros paquets de fibres nerveuses d'origine cérébrale. (Fig. 13, 39 et 40).

Le tentacule, dans toute la partie dépourvue de ventouses, est parcouru par un cordon nerveux très réduit avec un petit neuropile et quelques cellules nerveuses. Mais dans sa partie distale, au niveau des palettes couvertes de ventouses, le neuropile et la couche cellulaire augmentent en taille.

Une grande proportion de neurones contenus dans les ganglions est en rapport avec les ventouses (MARTOJA et al., 1956 - YOUNG, 1971). Dans la couche cellulaire on trouve des petits et des grands neurones (neurones moteurs des muscles et des ventouses). (Fig. 40).

## 2 - Les tractus cérébro-brachiaux

Les parties externes et internes du cordon nerveux axial consistent en deux troncs portant des fibres nerveuses de diamètres différents, allant dans les deux directions entre le cerveau et les bras. (Fig. 39 et 48).

## 3 - Les cordons nerveux intra-musculaires

On en compte six, noyés dans la musculature extrabrachiale. Ils sont continus tout le long du bras et entourés d'une gaine conjonctive. Ils sont formés d'un neuropile entouré de neurones. Ils sont reliés au cordon nerveux axial par des connectifs et également entre eux (MARTOJA et al., 1956) (Fig. 25).

## 4 - L'innervation des ventouses (Fig. 40 et 43)

Chaque pédoncule n'est parcouru que par un nerf. Au niveau de l'acetabulum, le nerf pédonculaire répartit ses fibres en plusieurs branches qui progressent vers la périphérie, gagnant l'infundibulum et l'épithélium. Il existe un ganglion acétabulaire dont les fibres vont se mêler à celles du nerf pédonculaire. (Fig. 29). Dans le pédoncule, il existe des cellules de grande taille à cytoplasme abondant et granulé possédant un noyau volumineux (caractères de moto-neurones d'Invertébrés). L'axone pénètre dans le nerf pédonculaire en se dirigeant vers l'acetabulum (MARTOJA et al., 1956). Le nerf pédonculaire est parcouru de fibres sensibles d'origine superficielle et de fibres motrices provenant du cortex central.

## 5 - La cellule nerveuse

Les neurones des Céphalopodes ont intéressé les chercheurs pour leur systématisme et pour leur cytologie, en raison de leur grande taille. Certains d'entre eux sont un excellent matériel d'électrophysiologie (axone géant du calmar).

BOGORAZE et al., (1944) ont donné une classification des divers types de neurones d'*Octopus vulgaris*.

- Les cellules ganglionnaires (neurones plasmochromes) de grande taille avec un gros noyau (10 à 25  $\mu$ ) et un cytoplasme abondant pouvant être divisées en deux selon leur longueur : de 12 à 15  $\mu$  d'une part et de 50 à 100  $\mu$  d'autre part. Ce sont des éléments monopolaires. L'axone, d'une épaisseur de 5 à 6  $\mu$ , s'enfonce dans le neuropile perpendiculairement à la couche cellulaire. Il passe ensuite dans les nerfs, parfois en se divisant en deux ou trois branches.

- Les grains (neurones caryochromes) sont des cellules de petite taille (4 à 5  $\mu$ ), le cytoplasme est réduit. Ils peuvent être mono - bi - ou tri - polaires.

BASSOT et al., (1966) décrivent trois types de neurones chez *Nautilus macromphalus*.

- Les neurones caryochromes répartis dans tout le système nerveux central.

- Les neurones fusiformes d'environ 15  $\mu$ , pourvus d'un gros noyau central uni - ou bi - polaires.

- Les neurones de grande taille (60  $\mu$ ), isolés et qu'on trouve dans toutes les régions du système nerveux. Ils sont globuleux et unipolaires.

C'est dans ce type de cellules que certains auteurs ont vu des inclusions colorables à la fuchsine-paraldéhyde et les ont interprétées comme étant des grains de neuro-sécrétion.

On voit que les neurones fusiformes et neurones de grande taille correspondent aux deux sous-types de neurones plasmochromes de BOGORAZE et al., (1944).

GRAY (1969) trouve les mêmes types de neurones dans le cerveau d'*Octopus vulgaris* : des petits neurones (5 à 8  $\mu$  de diamètre) qui ne sont pas entourés d'une capsule gliale mais parmi lesquels on trouve des cellules gliales et des vaisseaux sanguins, des neurones de taille moyenne (10 à 20  $\mu$  de diamètre) dont le péricaryon est engainé dans de la glie protoplasmique en simple couche et de grands neurones (20 à 100  $\mu$ ) qui ont une gaine gliale complexe interrompue par des canaux extracellulaires,

Figure 39 : (Fixation liquide de BOUIN - Trichrome de MASSON)

Coupe transversale d'un bras de *Sepia officinalis* montrant le cordon nerveux axial. (tcb : tractus cérébro-brachial, cc : couche cellulaire, n : neuropile)

Ce cordon est entouré d'une gaine de collagène (gc). Du côté externe, l'artère brachiale (ab) est bien visible.

(mt : musculature transversale ; ml : musculature longitudinale).

Figure 40 : (Fixation eau de mer formolée à 10%. Imprégnation argentique sur pièce. Coupe 15  $\mu$ )

Système nerveux axial, en coupe longitudinale, d'un bras de *Sepia officinalis*.

(même légende, nv : nerf de la ventouse).

Figure 41 : (Fixation glutaraldéhyde 3%. Bleu de toluidine, coupe 0,5  $\mu$ , Gt 4800)

Aspect de neuropile (n). On note la présence de noyaux de cellules gliales et du système glio-vasculaire (sgv) (cc : couche cellulaire).

Figure 42 : (Fixation et coloration comme fig. 41, Gt 2850)

Aspect d'un tractus cérébro-brachial (tcb). Les fibres, de différents diamètres sont isolées par de la névroglie (▼) dont quelques noyaux sont visibles.

(ab : artère brachiale, cc : couche cellulaire, n : neuropile, gc : gaine conjonctive, m : musculature).

Figure 43 : (Même fixation et coloration que fig. 41, Gt 1200)

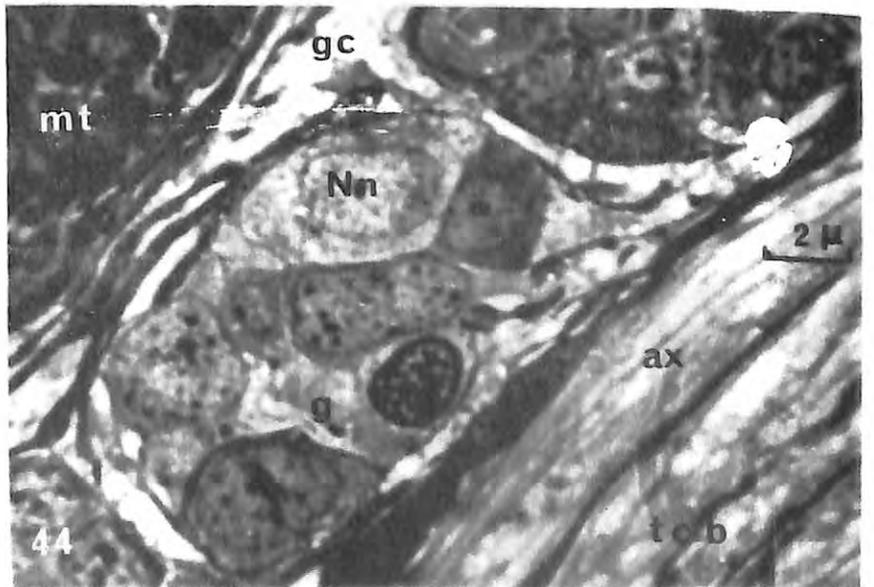
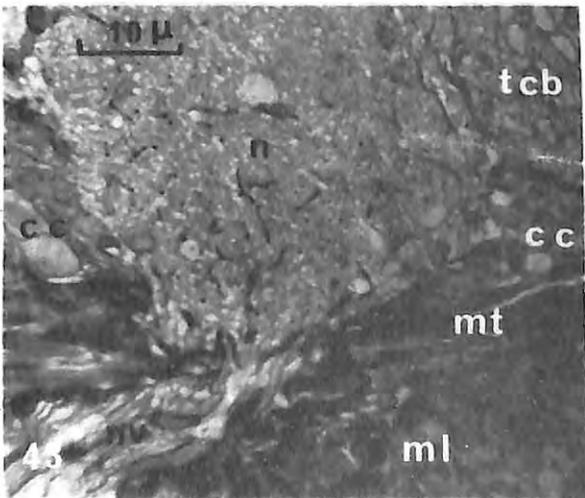
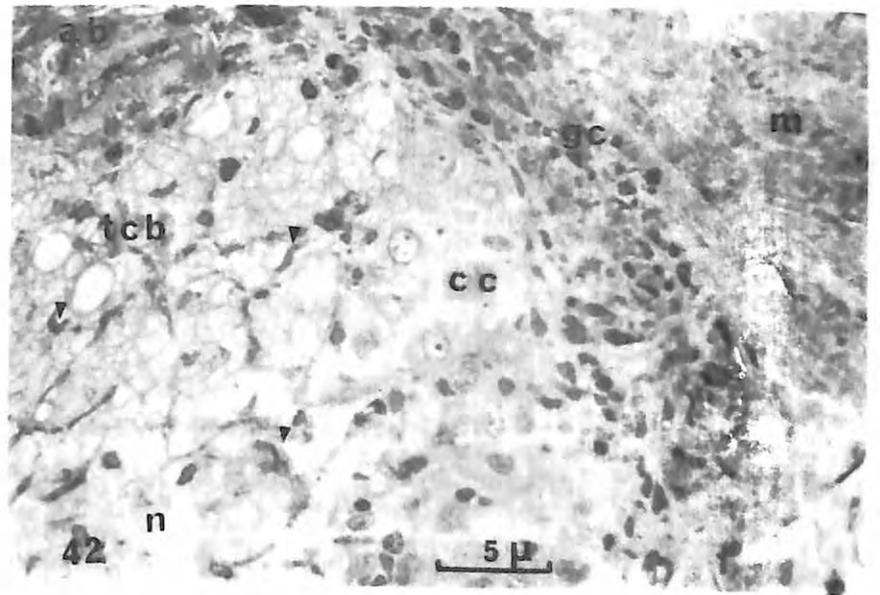
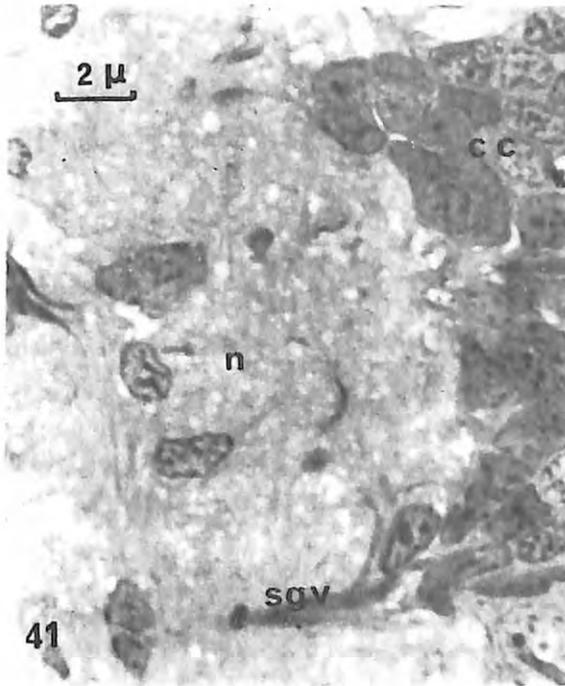
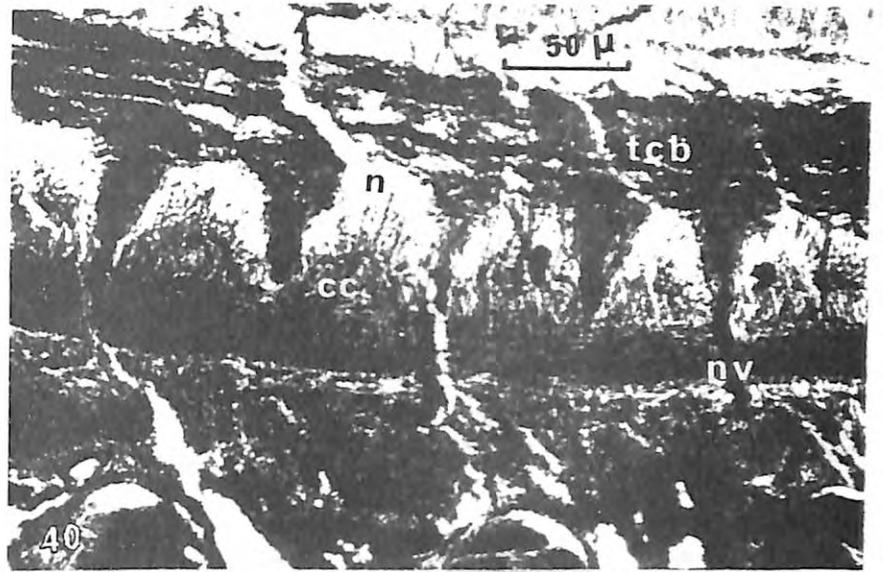
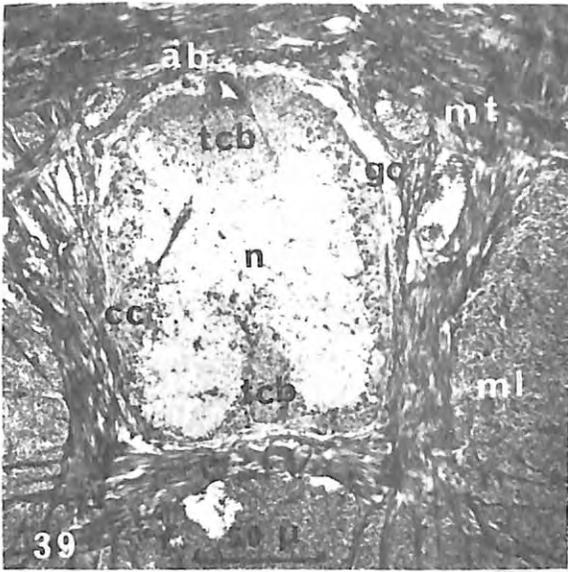
Départ d'un nerf de ventouse (nv) à partir du cordon nerveux axial. Il interrompt les différentes couches musculaires transversales (mt) et longitudinales (ml)

(cc : couche cellulaire, n : neuropile, tcb : tractus cérébro-brachial).

Figure 44 : (Même fixation et coloration que fig. 41, Gt 4800)

Aspect d'un ganglion formant la couche cellulaire. Les noyaux des neurones (Nn) sont isolés par de la glie (g). Le ganglion est entouré d'une gaine conjonctive (gc) qui le sépare de la musculature transversale (mt) et du tractus cérébro-brachial (tcb).

On remarquera les axones de tailles différentes qui le constitue.



Dans la couche cellulaire de l'axe nerveux médian des bras sessiles de *Sepia officinalis*, nous avons trouvé deux catégories de cellules nerveuses. La plus importante en nombre est constituée de neurones de 5 à 10  $\mu$  avec un noyau de 3 à 6  $\mu$  de diamètre. La deuxième n'est représentée que par quelques cellules de grande taille (40 à 50  $\mu$  avec un noyau de 10 à 15  $\mu$  de diamètre). Fig.44). Nous n'avons observé que la première catégorie dans les cordons périphériques, ainsi que dans les ganglions des ventouses.

En ce qui concerne les axones, dans le tractus cérébro-brachial et dans les nerfs périphériques, nous avons observé des fibres de trois ordres dont le diamètre varie de 0,5 à 2  $\mu$ , de 2 à 6  $\mu$  et de 7 à 12  $\mu$ . Elles n'ont pas une section régulière et sont entremêlées de cellules gliales fibreuses, de fibrocytes et de quelques amœbocytes (Fig. 42 et 48).

## E - Le système sanguin

### 1 - Les vaisseaux

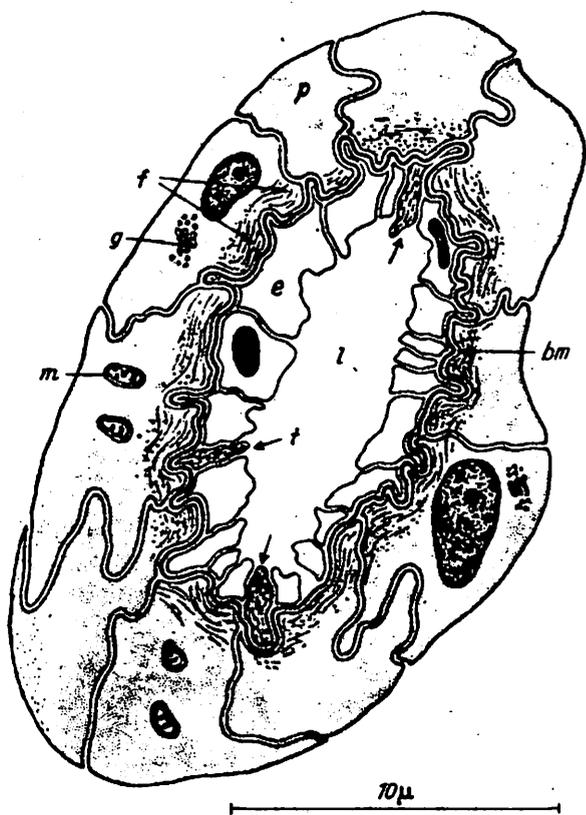
Le sang est distribué dans tout le corps par l'artère céphalique et l'aorte postérieure. L'artère céphalique est la plus grande de toutes. Elle se divise en deux branches au niveau du cartilage céphalique qui se réunissent du côté ventral du cerveau pour former l'artère céphalique antérieure. Cette artère se divise à son tour au niveau du ganglion brachial. Les deux parties contournent le bulbe buccal et donnent naissance aux artères brachiales et tentaculaires. Elles parcourent les bras et les tentacules dans la région centrale, près de l'axe nerveux principal, du côté externe (aboral).

Les bras sont drainés par quatre veines principales. La veine brachiale principale dans le plan médian, près de la face interne (orale) juste à l'extérieur de la musculature interbrachiale, et les deux veines brachiales latérales (une de chaque côté), rejettent le sang directement dans l'anneau veineux de la tête qui s'ouvre dans la veine céphalique antérieure. Les veines brachiales aborales, sauf celles des bras ventraux, débouchent dans la veine ventrale de la tête. Elles se jettent dans la veine dorsale de la tête. Ces deux veines vont à leur tour dans la veine céphalique antérieure.

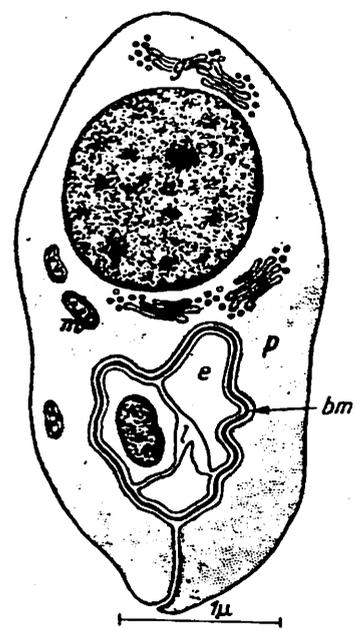
Figure 45 : Schéma des 4 types de vaisseaux identifiés par BARBER et al.

- 1 - type 1 : Il possède des myofilaments (f) dans les péricytes (p). Un endothélium (e) pratiquement complet est présent avec quelques papilles de structure tubulaire (t). Il y a une membrane basale (bm) continue et une grande lumière (l). Des appareils de Golgi (g), des mitochondries (m) et des noyaux (n) sont visibles.
- 2 - type 2 : Il n'y a pas de myofilaments dans les péricytes et bien moins d'endothélium.
- 3 - type 3 : C'est l'équivalent d'un très petit capillaire. Il n'est entouré que par un seul péricyte.
- 4 - type 4 : L'endothélium est clairsemé, les péricytes sont peu épais, la lumière du vaisseau est très grande.

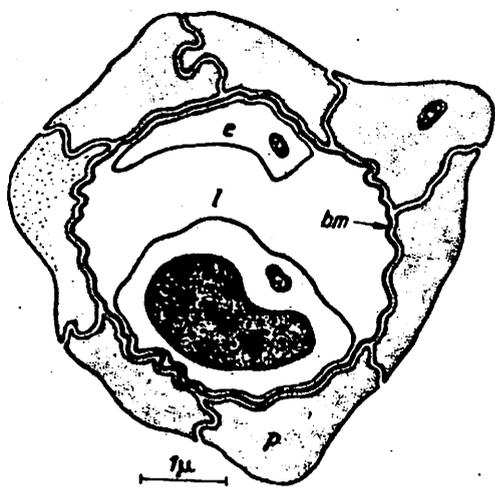
(d'après BARBER et GRAZIADEI, 1965)



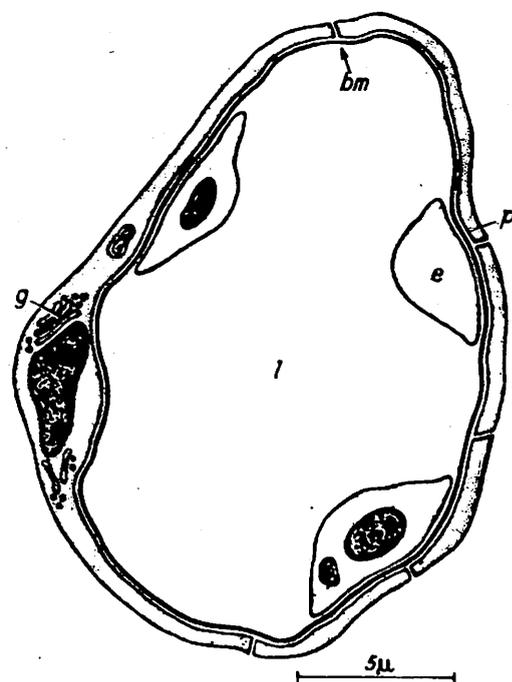
1



3



2



4

figure 45

LANGER (1850) a examiné la morphologie des vaisseaux sanguins dans la peau, les yeux et les membranes de *Loligo*, *Sepia* et *Octopus*. Il trouva des artères à paroi épaisse et à petite lumière, des veines à paroi mince et à grande lumière. De même, il distingua deux types de capillaires, les uns épais avec beaucoup de noyaux, les autres très fins et avec peu de noyaux. Ils existent seuls ou réunis en filets.

JOHANSEN et al., (1962) et SMITH (1962) se sont occupés de la circulation sanguine dans le bras d'*Octopus dofleini*. SMITH a décrit deux types de vaisseaux : le type artériel dont la paroi comprend un endothélium, une membrane interne élastique, une couche musculaire longitudinale, une couche musculaire transversale et une couche de tissu fibreux, et le type veineux comprenant un endothélium, une couche musculaire et du tissu fibreux, (SMITH, 1963).

On retrouve toutes ces catégories dans le bras de *Sepia*. BARBER et al. (1965-1966) ont publié les résultats d'une étude ultrastructurale des vaisseaux irrigant les muscles et le système nerveux, (Fig.45).

MISLIN (1950) sur *Octopus vulgaris* et SMITH (1962) sur *Octopus dofleini* ont montré que artères et veines sont contractiles sur toute leur longueur à un degré bien supérieur à aucun mammifère. Le péristaltisme veineux permettait au sang se trouvant sous basse pression dans les capillaires de passer dans les grandes veines à haute pression. Les ondes péristaltiques dans les veines ont été estimées à 10 cm/s. Une régulation reflexe siègerait dans le ganglion viscéral, mais le synchronisme ne serait pas parfait, et la coordination de l'activité péristaltique semble plus complexe que ne le suggérait MISLIN.

## 2 - L'innervation des vaisseaux

En microscopie optique, ALEXANDROWICZ (1928) a montré que les artères sont bien innervées par des nerfs qui s'anastomosent et cheminent tout le long, les artérioles par des branches des nerfs précédents qui se divisent et donnent des fibres de moindre calibre. Les capillaires sont aussi pourvus de nerfs. L'innervation des veines se fait avec des fibres de plus petit diamètre et moins nombreuses. Cette partie du système nerveux est propre au système sanguin. Il est relié au centre par le nerf viscéral.

Figure 46 :

a : Types de relations vaisseau sanguin/neurone trouvés dans les ganglions du système nerveux des Céphalopodes.

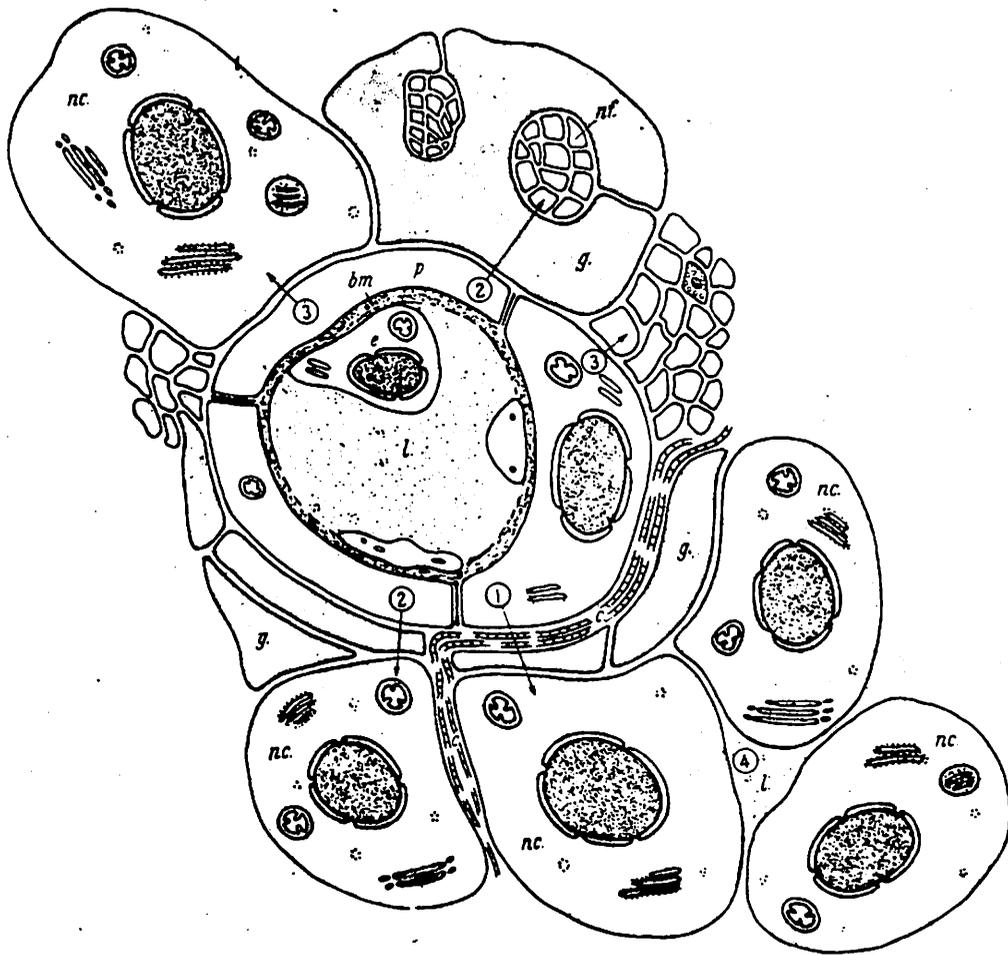
Un vaisseau à lumière (l) avec une couche de cellule endothéliale incomplète (e), une membrane basale continue (bm) et une couche de péricyte continue (p) est entourée par divers éléments neuronaux, cellules nerveuses (nc), cellules gliales (ng), axones (nf).

- 1 : le premier type montre un espace collagène entre péricytes et cellules gliales.
- 2 : le second type montre un arrangement où il n'y a pas d'espace collagène, mais où une cellule gliale est interposée entre le péricyte et le neurone ou l'axone.
- 3 : le troisième type a les neurones ou les axones directement en contact avec les péricytes.
- 4 : le quatrième type est celui où le sang baigne directement les neurones.

b : Schéma montrant les principales possibilités de l'innervation probable d'un vaisseau de type 1. (voir légendes fig. 45).

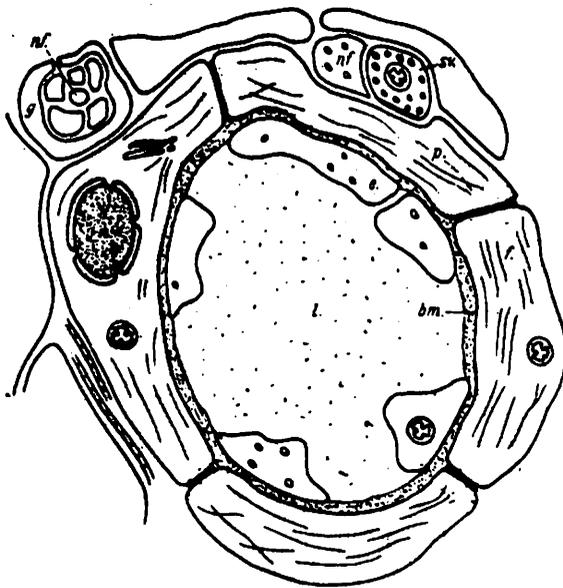
Des paquets d'axones (nf) entourés de cellules gliales sont très communs au voisinage des vaisseaux sanguins des Céphalopodes. Certains axones contiennent des vésicules (sv) et paraissent être en contact synaptique avec un péricyte.

(d'après BARBER et GRAZIADEI, 1967)



a

figure 46



b

BARBER et al., (1967), en microscopie électronique, ont trouvé des axones entourés de cellules gliales, et d'autres avec des vésicules, qui semblent en contact synaptique avec les péricytes, (Fig. 46 b).

### 3 - Les cellules

#### a) Les cellules endothéliales

En contact avec l'hémocytamine, elles forment un revêtement plus ou moins continu. La basale à l'extérieur est épaisse et continue. Le noyau est très allongé, disposé dans l'axe du vaisseau, le cytoplasme est peu abondant. La jonction entre cellules est très lâche. On note la présence d'un double réseau de tubules. GRAY (1969) pense que les cellules endothéliales représentent des amœbocytes inactifs qui seraient collés contre la paroi. Ils sont à ce moment là fusiformes. Cette hypothèse paraît se vérifier (fig. 14). Cependant, l'endothélium, quand il existe, semble beaucoup plus lâche. (Fig. 47).

#### b) Les péricytes (Fig. 14 et 47)

Dans les tissus musculaire et conjonctif, la couche de péricytes est continue. Elle est séparée de l'endothélium ou de la lumière, quand celui-ci n'est pas présent, par une membrane basale continue. On note parfois (vaisseaux de type 1) la présence de filaments musculaires de deux types (paramyosine et actine) qui contribuent sans doute au péristaltisme. La jonction de deux péricytes est caractéristique. On compte sept couches (deux fois trois feuilletts pour les deux membranes et une bande médiane appelée plaque péricytaire par GRAY (1969).

Dans le tissu nerveux, les vaisseaux sont constitués d'une membrane basale continue, une couche continue de péricytes, un endothélium plus ou moins complet. On peut trouver quatre types de liaison avec le tissu nerveux, résumés dans la figure 46 a. Il existe parfois des "cellules gliales sombres" à la place des péricytes.

c) Les amoebocytes (Fig. 14)

Ce sont les seuls éléments figurés du sang (CUENOT, 1891). Ce sont des cellules de 10 à 15  $\mu$  environ. Jeune, le noyau est sphérique (5  $\mu$  de diamètre) puis il peut apparaître bibolé. Une encoche dans ce noyau semble caractéristique. Le cytoplasme contient des ribosomes et des mitochondries, un peu de glycogène et parfois des vésicules remplies de substance dense. Il n'y a pas de division des amoebocytes dans le sang. La gènèse s'effectue dans le corps blanc.

Leur rôle n'est pas déterminé, on a parlé de phase de construction de l'hémocyanine, RICHARD (1971), (celle-ci serait plutôt synthétisée dans la glande brachiale, DILLY et al., 1972) de fonction néphrocytaire (CAZAL et al., 1943). Les amoebocytes seraient les véhicules d'accumulation des déchets cataboliques (RICHARD, 1971). Ce dernier a observé des amoebocytes immiscés entre les cellules de la glande optique. Nous verrons qu'ils peuvent infiltrer d'autres tissus.

CAZAL et al., (1944) pensaient qu'ils pouvaient être un équivalent physiologique de la micrologie des Vertébrés. Ces auteurs ont mis en évidence des "leucocytes" banaux extravasés et migrant à travers le tissu nerveux. Leur structure reste inchangée, sinon leur forme.

JULLIEN et al. (1956) ont montré qu'en cas d'agression, les amoebocytes étaient capables de s'extravaser. Ils envahissent toute la région inflammée. Ils sont toujours sphériques, ont un noyau en bissac et présentent les mêmes granulations. Puis, il y a passage progressif à la forme très allongée, le cytoplasme contient de grosses granulations, résultant de la fusion des granulations précédentes. L'amoebocyte a alors l'allure d'un fibroblaste. De telles transformations semblent irréversibles. Ainsi en fuseau, l'amoebocyte a une forme d'immobilisation (forme d'arrêt "préfibroblastique").

BAGINSKI (1965) confère aux amoebocytes le rôle de cellules du tissu conjonctif. Il leur dénie la possibilité de phagocyter. Il distingue les fibroblastes (8 à 10  $\mu$  de longueur sur 2 à 3  $\mu$  de diamètre) avec peu de cytoplasme, responsables de la synthèse de tropocollagène et les fibrocytes qui polymériseraient le collagène. Il y aurait continuité physiologique entre les deux stades.

Figure 47 : (Gt 11 660)

Coupe transversale d'un vaisseau de type 1 se trouvant dans le tissu conjonctif (tc) dont 3 noyaux de fibrocytes (Nf) sont visibles ainsi que du collagène (coll).

(H : hémocyanine ; mb : membrane basale ; e : endothélium ; p : péricyte ; Np : noyau d'un péricyte ; mp : myofilaments péricytaire ; G : corps de Golgi ; m : mitochondrie). Une partie d'iridophore, coupé obliquement, est visible dans le coin supérieur gauche.

Figure 48 : (Gt 11 400)

Coupe transversale d'une partie d'un tractus cérébro-brachial, 3 types d'axones de tailles différentes sont présents ( $ax_1$ ,  $ax_2$ ,  $ax_3$ ). Les fibres nerveuses sont séparées par paquets et isolées par des prolongements gliaux ( $\rightarrow$ ) et du collagène (coll).

Elles contiennent plusieurs sortes de vésicules.

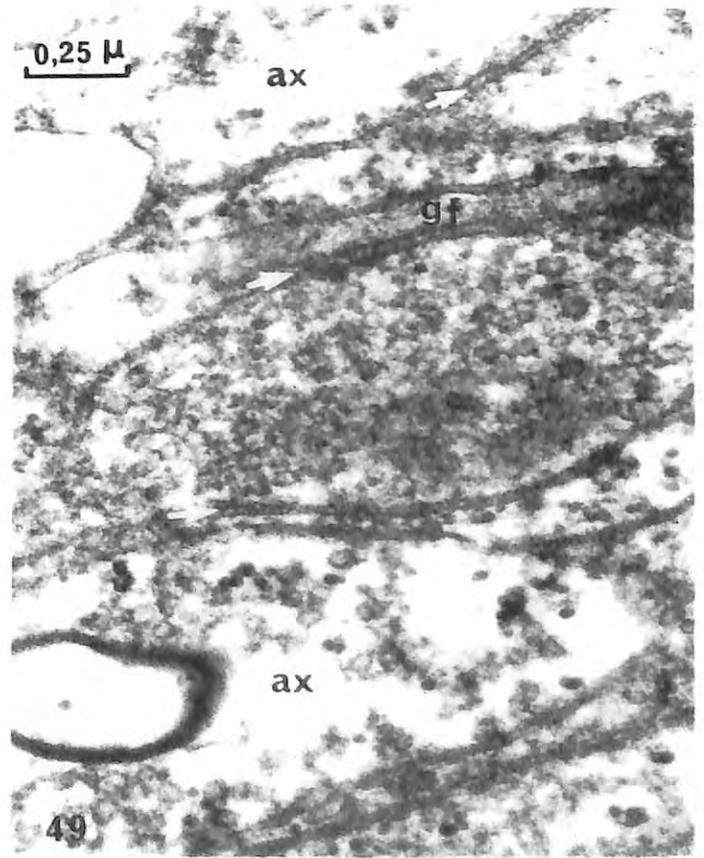
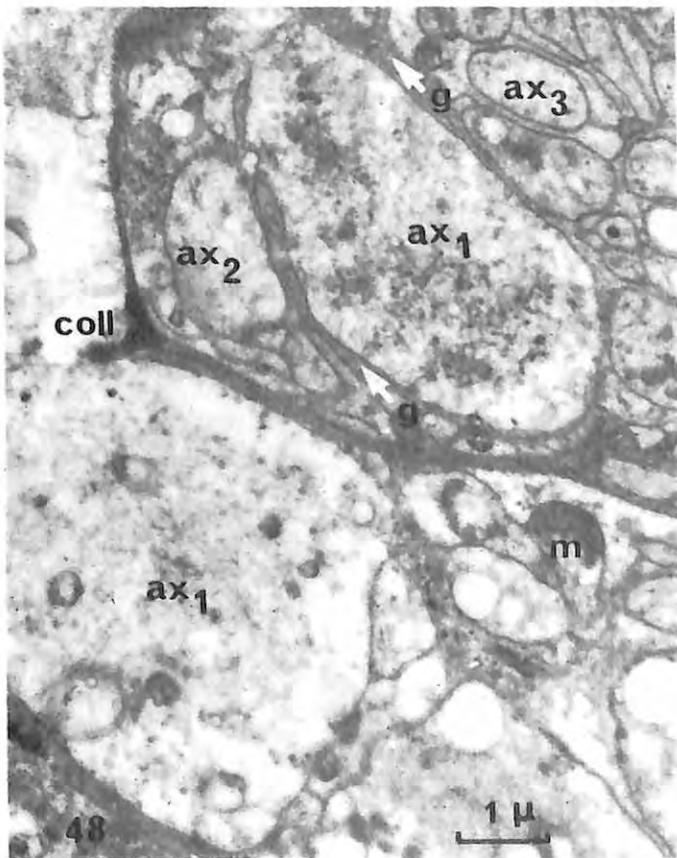
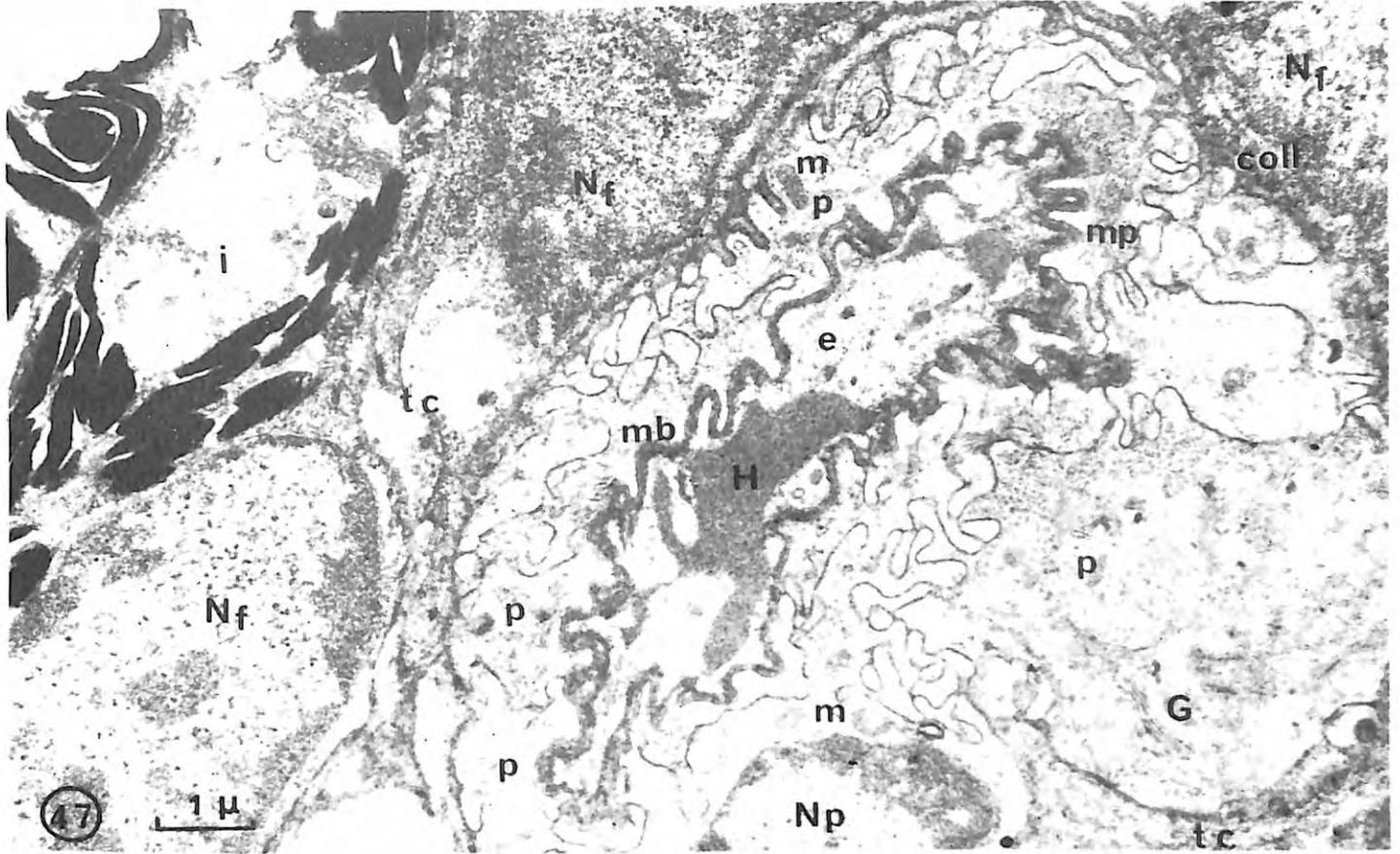
(m : mitochondrie)

Figure 49 : Gt 48 000)

Fibres nerveuses coupées longitudinalement.

Elles contiennent de petites vésicules de 400 Å de diamètre.

Les jonctions cellule gliale fibreuse (gf) / axone (ax) d'une part et axone / axone d'autre part sont plus ou moins écartées (flèche). Les 7 couches denses et claires (membrane, espace extracellulaire, membrane) sont bien visibles.



F - La névroglie (Fig. 48 et 49)

Les formations nerveuses sont recouvertes et entremêlées d'éléments du tissu conjonctif, de vaisseaux sanguins et de névroglie. Les vaisseaux sanguins sont entourés d'un réseau de glie fibreuse (JAKUBSKI, 1915 - HAVET, 1916, respectivement sur *Octopus* et *Helix*).

On note un système d'espaces extracellulaires autour des vaisseaux dans le neuropile et il existe des canaux entre les neurones et les cellules gliales. C'est ce que CAZAL et al., (1944) ont décrit sous le nom de réseau gliovasculaire. Il est reconnaissable dans le neuropile et la couche cellulaire du bras qui présente beaucoup d'analogies de structure avec celle des centres nerveux (Fig. 41). BAGINSKI (1964) note qu'il n'existe pas de grandes différences entre les diverses espèces de Céphalopodes Octopodes et Décapodes de ce point de vue. Les cellules ganglionnaires sont dans une loge fibreuse plus grande que le neurone. Du côté du neuropile, la loge se poursuit. Cette gaine accompagne l'axone jusqu'au "Grenznetz" de JAKUBSKI (1915) qui est une densification locale du réseau gliovasculaire. La gaine stoppe, les fibres tournent et s'entremêlent avec les autres. L'axone poursuit son chemin dans le neuropile.

BASSOT et al., (1966) ont trouvé des cellules névrogliales aussi bien dans le cortex des ganglions que dans les neuropiles des centres nerveux du *Nautilus*. Certaines entourent les neurones de leurs prolongements qui parfois se terminent autour des vaisseaux sanguins.

Les cellules de la névroglie sont de trois types.

Les astrocytes fibreux que l'on rencontre dans le neuropile et dans la couche cellulaire, sont caractérisés par la présence de nombreuses fibrilles dans le cytoplasme. Ce sont les cellules satellites du péricaryon et des axones. Le noyau a une chromatine périphérique. Le cytoplasme contient des ribosomes, des mitochondries qui peuvent être de grande taille, un corps de Golgi et des grains de glycogène. Selon BAGINSKI (1964), DILLY et al., (1963), STEPHENS et al., (1969) elles ont un rôle de soutien. RICHARD (1971), parle d'une étape de repos métabolique de l'astrocyte protoplasmique, CAZAL et al., (1944) leur attribuent en plus un rôle d'isolation. Les fibres sont libres dans cet étui qui est plus grand que leur diamètre. Un astrocyte peut englober plusieurs fibres de petit diamètre ou un groupe de fibres peut être entouré par

plusieurs astrocytes, REINECKE (1975) confirme ce rôle de soutien chez *Helix pomatia*. Il leur suppose aussi une fonction métabolique (réservoir de lipides et de glycogène).

Les astrocytes protoplasmiques se rencontrent surtout dans le neuropile. Les fibrilles sont moins nombreuses, mais on note la présence d'inclusions denses, les gliosomes. Ils sont remplis de microvésicules de 200 Å de diamètre (RICHARD, 1971). Des mitochondries sont accolées à la paroi du gliosome. On note la présence d'ergastoplasme et de dictyosomes (activité endocytosique), de glycogène, de lipides et d'amas denses hypothétiques (GRAY, 1969 - RICHARD, 1971 - YOUNG, 1971 - REINECKE, 1975).

BASSOT et al., (1966) notaient l'abondance de ce tissu autour des vaisseaux et soulignaient ainsi le rôle trophique de la névroglie chez le *Nautilé*. GRAY (1969), tirait les mêmes conclusions en ce qui concerne le Poulpe. Pour RICHARD (1971), les inclusions observées seraient des formes de stockage temporaire, intracellulaire, des métabolites. CHALAZONITIS et al., (1973) envisagent une fonction trophique des cellules gliales dans le neuropile du ganglion viscéral d'*Helix*. Mais il faut noter qu'il n'existe pas de réseau sanguin intraganglionnaire chez les Gastéropodes.

Une troisième catégorie a été décrite par GRAY (1969). Il s'agit des cellules sombres (dark cells) dont la densité est due, en microscopie optique comme en électronique, à une fine granulation du cytoplasme. On en trouve dans la couche cellulaire du bras au milieu des neurones (Fig.48). Elles peuvent enserrer la basale vasculaire. Elles prennent ainsi la place des péricytes.

Mise à part cette dernière catégorie qui reste énigmatique, on peut dire que la névroglie a un rôle mécanique de soutien et de remplissage, un rôle possible d'isolation pour la conduction nerveuse et un rôle trophique. Des expériences d'incorporation de ferritine et de  $^3\text{H}$ -glutamate sur *Helix pomatia* ont montré que les cellules gliales périphériques jouent le rôle de barrière entre les éléments nerveux et le sang, (REINECKE, 1975). Ce fait a été montré chez les mammifères par SCHON et al., (1974) pour le  $^3\text{H}$ -glutamate et le  $^3\text{H}$ -GABA.

HENN et al., (1971) ont montré, sur du cerveau de lapin, que les cellules gliales protègent le neurone d'un excès de neuro-messagers qui a pénétré dans l'espace intercellulaire.

CHAPITRE 3

LA REGENERATION DU BRAS DE

*SEPIA OFFICINALIS*

## I - EVOLUTION DE LA MORPHOLOGIE EXTERNE

### A - Evénements morphologiques (Fig. 50 à 55)

Immédiatement après l'amputation, nous n'avons pas observé d'hémorragie, Il faut rappeler qu'en plus d'un processus naturel qui empêche le saignement après l'amputation, l'anesthésie à l'alcool a sans doute un effet en ce sens qu'elle ralentit, ou même arrête, les mouvements respiratoires et le péristaltisme vasculaire.

Il est aisé de suivre les événements à la loupe binoculaire. Le nerf est d'abord protubérant ainsi que la musculature transversale qui l'entoure. Juste après la coupure, les bords externes se contractent spasmodiquement. Après quelques heures, on observe un resserrement latéral puis dorso-latéral de la plaie, ce qui indique une contraction musculaire. Puis la plaie est progressivement recouverte par l'épithélium. L'étalement a lieu d'abord en direction dorso-ventrale, puis toujours dans ce sens, mais on observe en plus un mouvement des bords latéro-dorsaux vers le bord ventral (Fig. 50).

Au bout d'environ une semaine (selon la température, l'âge), ce processus est terminé. L'épiderme dorsal (externe) est en contact avec l'épiderme ventral (interne ou oral). Quelque temps après (de quelques jours pour les juvéniles à quelques semaines pour les adultes en hiver) une petite boule apparaît au centre de la blessure. Peu à peu, toute la plaie est concernée. Il est possible de voir une demi-sphère faire saillie. Sa forme évolue en cône qui s'allonge peu à peu. Sur la partie ventrale de ce cône apparaissent bientôt des fentes (ébauches des futures ventouses) d'abord sur le moignon et près du moignon, puis de plus en plus distalement. Elles s'individualisent peu à peu. L'acétabulum et l'infundibulum sont formés plus tard par invagination. Peu après, des chromatophores commencent à être visibles sur le régénérat. Leur progression a lieu dans le même sens, c'est-à-dire de la base vers l'extrémité. Ils sont d'abord petits et clairs, puis les ventouses se perfectionnent, deviennent fonctionnelles, les chromatophores sont plus nombreux, plus larges et plus foncés. Ils se dilatent et se contractent en phase avec les autres. Le régénérat devient mobile. (Fig. 55). Ses progrès ont pu être observés grâce à ces deux traceurs

Morphologie de la régénération des bras  
de *Sepia officinalis* adulte

- Figure 50 : Cicatrisation terminée. A la suite de contractions musculaires les bords de la plaie se sont rapprochés, L'épiderme s'est étalé et a recouvert la blessure d'un épithélium cicatriciel.
- Figure 51 : Cas d'un bras ayant cicatrisé, mais qui n'évoluera plus (femelle mature, opérée en hiver).
- Figure 52 : Début de la régénération proprement dite. Le blastème commence à croître et une petite boule (▲) est visible à l'extrémité du bras.
- Figure 53 : Evolution du régénérat en cône (▲). A ce stade, il n'est pas encore pigmenté.
- Figure 54 : Régénération du bras ventral gauche. Le régénérat apparaît sur le bord externe du moignon (▲). Il a la forme aplatie, caractéristique du bras IV.
- Figure 55 : Régénération totale d'un bras d'adulte. Les nouvelles ventouses sont dans l'alignement des 2 rangées du moignon et sont fonctionnelles, Les lames marginales sont développées, La pigmentation est normale.

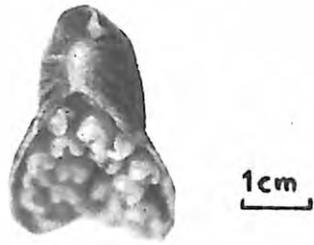


figure 50



figure 51



figure 52



figure 53

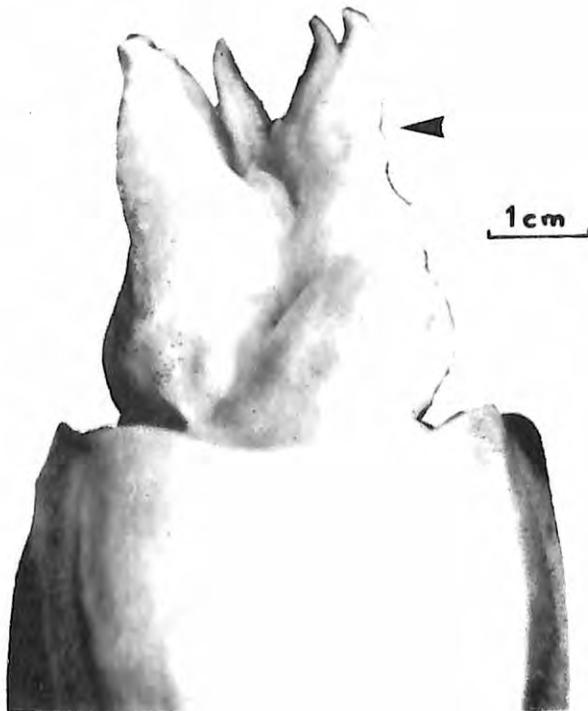


figure 54

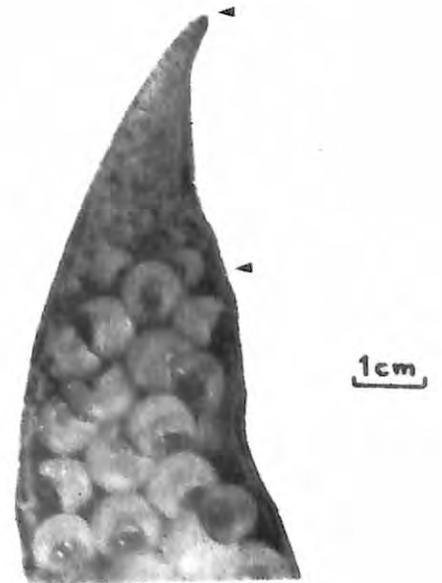


figure 55

physiologiques que sont, dans ce cas, les ventouses et les chromatophores. On note aussi qu'après avoir grandi longitudinalement, le régénérat s'épaissit. On peut en conclure que la musculature longitudinale se différencie et croît plus vite que la musculature transversale. Le bras régénéré restera plus court et un peu plus mince.

Ces premiers résultats donnent une idée du déroulement des phénomènes :

- La migration de l'épiderme correspond à la cicatrisation et à la dédifférenciation (Stade 1).
- Le stade demi-sphère (ou dôme) correspond à la formation du blastème et au début de la croissance (Stade 2).
- Le stade cône correspond à la croissance et au début de la différenciation (Stade 3).
- Les stades "ventouses" (Stade 4) et "chromatophores" (Stade 5), correspondent à la différenciation et à la morphogénèse. (Il existe une polarité centrifuge de la régénération.)
- Le stade 6 correspond au recouvrement de la fonction.

## B - Facteurs influençant la régénération

La vitesse de régénération dépend :

- de la nature et du niveau de l'amputation ou de la blessure,
- de l'état physiologique de l'animal,
- de facteurs saisonniers comme la température.

### 1 - Nature de l'amputation

#### a) bras et tentacules

Les bras et les tentacules cicatrisent puis régénèrent, s'ils sont coupés transversalement. L'amputation de plusieurs bras et même de tous est possible, à condition qu'elle soit pratiquée dans la moitié la plus distale du bras. La survie des animaux et la régénération de leurs bras ont été observées plusieurs fois. Mais la plupart meurent, même sans avoir cicatrisé. La mortalité, dans ce cas, est supérieure chez les jeunes animaux.

Si la coupure n'est pas franche ou si les ciseaux ont dérapé et que la blessure se trouve être presque horizontale, la plaie cicatrise mal. Le phénomène de régénération, quand il se produit, est plus lent.

Nous avons ouvert longitudinalement un bras, sur des animaux jeunes (LDM = 2,5 à 5cm). Ils sont tous morts en 1 à 3 jours. Ceci peut s'expliquer par le fait que le mécanisme de contraction musculaire au cours de la cicatrisation et du colmatage par les amœbocytes ne se fait pas, ou en tout cas, n'est pas efficace.

Il faut noter une variation entre le pouvoir de régénération des différents bras. Ce sont les bras dorsaux (bras I) qui régénèrent le plus vite. Le bras IV (ventral) conserve sa forme aplatie. Le régénérat apparaît sur le bord externe.

Pour pouvoir observer les progrès de la régénération, il faut comparer avec le bras symétrique.

#### b) Nageoire

Coupée longitudinalement sur un côté entier, et si le cartilage natatoire n'est pas complètement entamé, la nageoire régénère. Bien que moins large, elle est fonctionnelle et pourvue de chromatophores, un peu plus dispersés qu'avant. Si le cartilage est trop entaillé, les animaux meurent ; la cicatrisation ne doit pas pouvoir avoir lieu. Nous n'avons jamais pu obtenir la régénération d'un morceau de nageoire amputée comme indiqué figure 7 (C.D.E.F.).

#### c) Région du rostre et sépion

Il arrive fréquemment au laboratoire que les animaux se blessent l'arrière du corps sur les parois des bacs de maintien. En captivité, ces blessures peuvent être très graves et ne cicatrisent jamais, du fait de la répétition des chocs. Mais peu d'entre elles entraînent la mort. Il n'y a jamais eu de signe de régénération de cette partie, même si les animaux sont isolés dans un aquarium beaucoup plus grand.

L'"os de seiche" est incapable d'une quelconque régénération, au moins dans les conditions dans lesquelles se trouvaient les animaux. Il semble même que son endommagement entraîne la mort de l'animal. Celui-ci ne peut plus régler correctement sa flottabilité (DENTON et al., 1961).

#### d) Autres parties du corps

Au cours de la capture surtout (tassement dans le cul du chalut) ou du maintien des animaux (chocs sur des obstacles, combats entre individus), le manteau peut être sérieusement endommagé. Dans de bonnes conditions d'élevage, il y a cicatrisation des téguments. L'emplacement de la plaie est toujours visible. Peu ou pas de chromatophores ne sont reformés à ce niveau.

Nous n'avons pratiqué aucune amputation d'organes internes.

### 2 - Niveau de l'amputation

Le niveau de l'amputation a une grande importance. La taille du bras régénéré est d'autant plus petite que la coupure a été faite près de la base du bras. L'apparition du régénérat est aussi plus tardive dans ce cas. Ce fait, observé dès le début des expériences nous a conduit à essayer de systématiser l'amputation. Elle a été pratiquée entre la moitié et le tiers distal du bras. Les coupures aux autres niveaux du bras (en deçà ou au delà) n'ont pas été assez nombreuses pour faire des comparaisons chiffrées et valables entre les différentes vitesses de régénérations.

### 3 - Etat physiologique

#### a) Influence de l'âge

L'appréhension des différents facteurs internes est difficile. Chez les Céphalopodes en général, la taille n'est pas directement liée à l'âge (MANGOLD, 1963 - RICHARD, 1971). A priori, nous ne pouvons parler que de juvéniles et de matures. C'est pourquoi nous avons séparé toute une classe intermédiaire pour ne faire des expériences qu'avec des animaux à coup sûr immatures ou matures.

Les animaux les plus jeunes régénèrent le plus vite. Les adultes cicatrisent à peu près dans les mêmes temps, mais la période de latence (où rien ne se passe extérieurement) est plus longue (jusqu'à un mois de différence). Ils suivent la même évolution, plus lentement, et la taille relative d'un régénérat d'adulte est plus petite que celle d'un régénérat de juvénile maintenu dans les mêmes conditions.

La figure 57 représente la croissance d'adultes et de juvéniles en fonction de ce qui peut être vu de l'extérieur pour les premiers stades (cicatrisation, demi-sphère, cône). La température était d'environ 14°C.

#### b) Influence de l'état général

Nous avons observé qu'un animal dont l'arrière du corps était trop endommagé régénérerait moins vite que ses congénères intacts. Tout ce qui peut affaiblir les seiches retarde leur croissance. Les animaux faibles régénèrent mal ou pas du tout. La cicatrisation seule intervient.

#### α-Expérimentation

Pour influencer sur la croissance, nous avons fait une expérience de jeûne partiel.

Nous avons comparé 2 lots de 7 animaux juvéniles. Le premier était nourri normalement, le second était sous-alimenté (10 fois moins environ). L'expérience s'est déroulée pendant un mois en automne 1975.

La température a été maintenue à peu près constante (16 à 17°C). De l'eau préalablement chauffée pour des expériences à 18-19°C dans un grand aquarium est récupérée par un élévateur. Un apport d'eau fraîche, à faible débit, ne fait descendre la température que de 1 ou 2°C et permet un renouvellement convenable.

Dans les deux cas, la cicatrisation se fait aux environs d'une semaine. La différence s'accroît pour atteindre le stade en demi-sphère. Il y a des variations d'une semaine chez les animaux en malnutrition. Les individus les plus en retard de ce lot moins bien nourri ont un régénérat en forme de dôme quand le régénérat des Seiches de l'autre lot

a déjà évolué en cône. Nous sommes à 3 semaines. Il faudra 26 jours pour que les Seiches mal nourries atteignent toutes le stade cône. Pour une température donnée, à une vitesse à peu près constante, la différence observée pour passer du stade demi-sphère au stade cône, semble compensée. Il y a un temps d'activation plus long, mais une fois amorcée la croissance à une vitesse constante pour une température donnée. Seuls, deux animaux du lot bien nourri, atteignent le stade chromatophore à la fin de l'expérience (29 jours) ce qui est un peu plus tardif que lorsque l'expérience est faite plus tôt dans l'année. (L'apparition des ventouses n'a pas été notée). Tous les animaux sont morts entre le 21 et le 24 novembre 1975, à la suite d'un arrêt d'eau. L'expérience avait commencé le 23 octobre 1975.

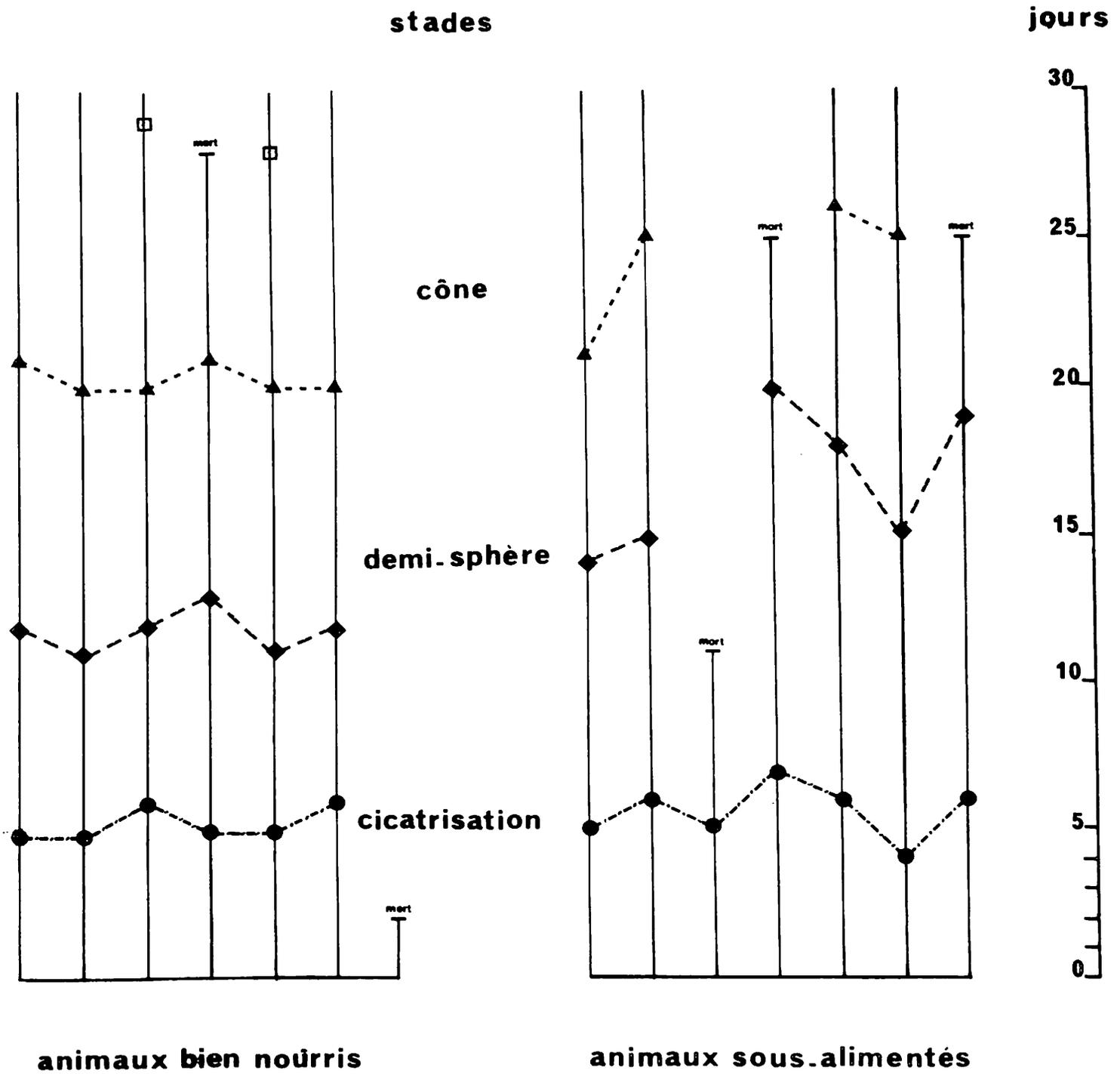
### β - Analyse des résultats (Fig. 56)

Les résultats semblaient différents dans les deux groupes, surtout en ce qui concerne le temps pris pour atteindre les stades 2 et 3 (demi-sphère et cône).

Nous avons voulu comparer les temps moyens mis dans chaque groupe pour arriver à un stade donné. Pour cela, nous avons fait une analyse de variance, afin de reconnaître si les variations observées à l'intérieur d'un groupe et entre les groupes, étaient dues à des fluctuations fortuites ou non. On peut tester ainsi l'influence du jeûne sur la régénération. Nous appellerons A le groupe nourri normalement et B l'autre.

Cicatrisation : Elle nécessite 5,3 jours pour le groupe A en moyenne et 6,6 jours pour le groupe B.

La variance intragroupe est 0,67, la variance intergroupe est 4,06. Le rapport des variances ( $F > 1$ ) est 6,06. Il sert à tester la divergence des deux variances. Les tables de SNEDECOR donnent le seuil de signification au coefficient de sécurité 95% ou 99%. Nous trouvons ici comme valeur limite :  $F_{0,05} = 5,10$  et  $F_{0,01} = 9,80$ . La valeur trouvée est supérieure à  $F_{0,05}$ . Une telle divergence a donc moins de cinq chances sur cent de se produire dans une population unique, par suite de fluctuations fortuites. Mais cette différence entre les deux groupes n'est pas significative au seuil de 99%.



**animaux bien nourris**

**animaux sous-alimentés**

Stade atteint	Durée en jours			
	Lot A		Lot B	
	moyenne	intervalle de confiance	moyenne	intervalle de confiance
cicatrisation	5,3	4,3 à 6,4	6,6	5,1 à 8
demi-sphère	11,8	10,5 à 13,2	16,8	12,4 à 21,3
cône	20,3	19,4 à 21,3	24,2	16,8 à 31,7

Figure 56 : Expérience de jeûne partiel. (température : 16°) □ animaux ayant atteint le stade chromatophore

Stades demi-sphère et cône : En ce qui concerne ces deux stades, la comparaison des variances donne comme très significatifs (moins d'une chance sur cent) les retards de 5 jours et 4 jours que l'on enregistre.

$$\begin{array}{l} F \text{ demi-sphère} = 22,27 ; F_{0,01} = 10,04 \\ F \text{ cône} = 16,75 ; F_{0,01} = 11,26 \end{array}$$

On peut donc dire que dans cette expérience à 16°C, en automne, le jeûne retarde, avec 95% de chance minimum, d'environ 1 jour la cicatrisation de jeunes *Sepia* amputées d'un bras et avec plus de 99% de chance, de 4 ou 5 jours l'évolution du régénérat en demi-sphère et en cône.

#### 4 - Rôle de la température

C'est le facteur saisonnier qui a l'action la plus directe sur la régénération.

Des expériences ont été faites à 10-14-16 et 19°C, (températures naturelles de l'eau de mer ou obtenues par chauffage).

##### a) 10°C

A cette température, la cicatrisation des juvéniles a demandé environ 2 semaines. Dans ce laps de temps, certains n'avaient pas terminé leur cicatrisation et d'autres étaient morts. Le métabolisme de cet animal à sang froid est considérablement ralenti. Il se nourrit beaucoup moins et est moins actif (RICHARD, 1971 - BOUCAUD CAMOU, 1973). A 28 jours, la plaie se gonfle en dôme qui, à 35 jours, a évolué en cône (Fig.58).

Cette série a servi à des dosages de collagène.

Deux adultes opérés d'un bras sont morts après avoir seulement cicatrisé en 2 semaines également.

##### b) 14°C

La cicatrisation des juvéniles est terminée en 6 jours (étalement de l'épiderme. Le stade 1/2 sphère est atteint aux environs de 2 semaines. Le stade cône en un peu plus de 20 jours (Fig.57 ). L'expérience a été arrêtée après 1 mois.

Cette série a servi à faire les dosages de collagène et les mesures d'incorporation de proline marquée.

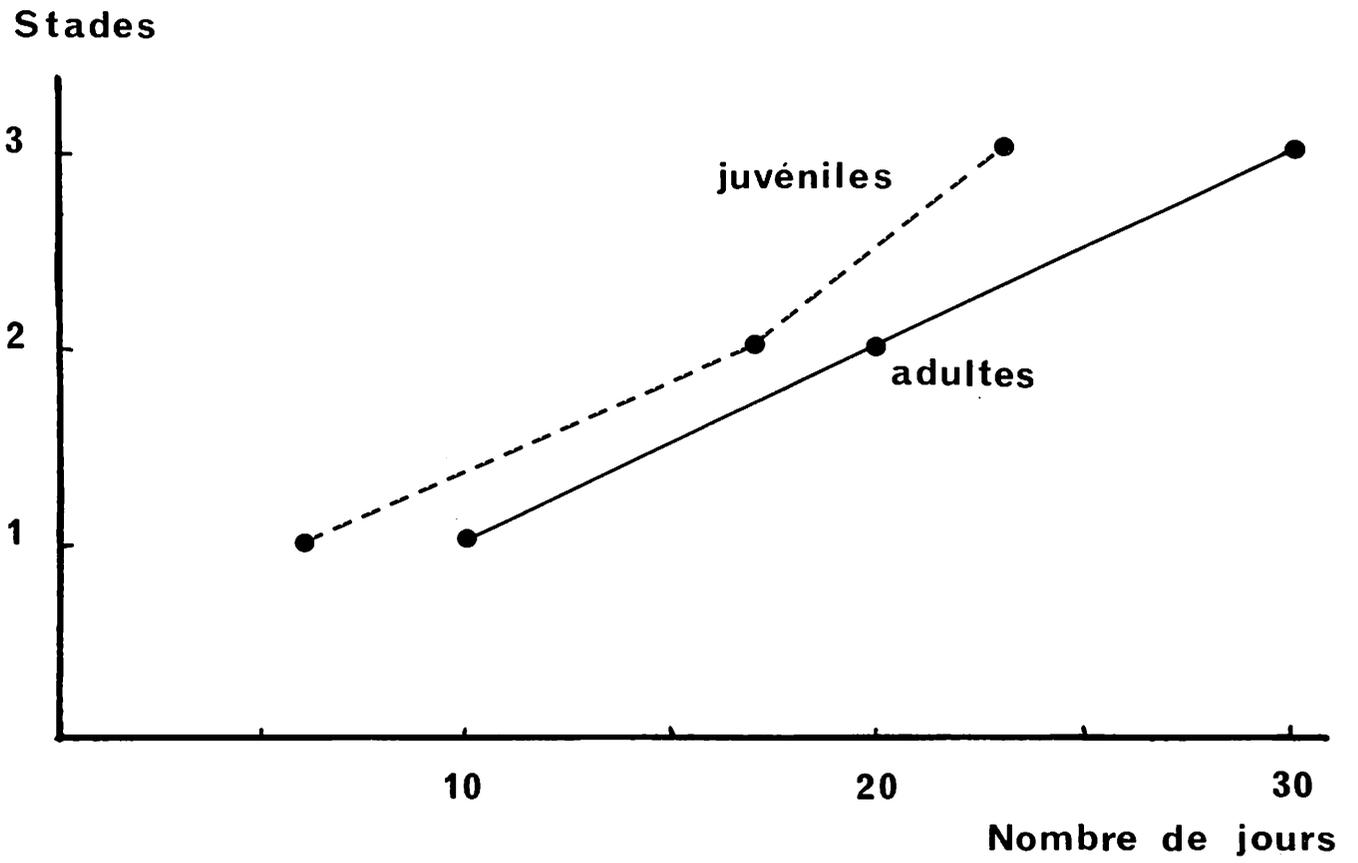


Figure 57 : Evolution du régénérat à 14°C.

Chez les adultes, les résultats concernent 7 animaux des deux sexes pour les 3 premiers mois (stade : 8 j (mort), 10 j, 30 j, 47 j, (mort), 60 j) 2 jusqu'à 100 jours (1 sacrifié) et 1 jusqu'à 200 jours (6 mois et 20 jours). Commencée en automne, l'expérience a été poursuivie pendant l'hiver en chauffant l'eau de manière à maintenir la température aux alentours de 14°C. Le dernier animal a été sacrifié le 25 mars 1976. Il avait été amputé du 1er bras dorsal gauche et du bras ventral gauche ( $G_I$  et  $G_{IV}$ ) le 3 septembre 1975. Les 2 bras ont régénéré. La cicatrisation demande 10 jours, un régénérat incolore et flasque est visible au bout d'un mois. Après 1 mois et demi, rien n'a changé. Ce n'est qu'au bout de 2 mois que les ventouses se dessinent sur le moignon et sur le régénérat. Celui-ci possède des chromatophores et les lames latérales se développent. Il a la même taille qu'à l'âge de 1 mois. Il grandit très peu jusqu'à 100 jours, les chromatophores sont plus nombreux et il est mobile, signe des progrès de l'innervation. A 200 jours, on observe peu de croissance, l'innervation est terminée, l'animal se sert aussi de l'extrémité de ses bras ( $G_I$  et  $G_{IV}$ ) pour saisir les proies. Les ventouses sont fonctionnelles, mais plus petites que celles du bras symétrique correspondant. Les chromatophores se dilatent et se contractent en phase. Le bras  $G_{IV}$  a sa forme aplatie et a suivi le même processus (Fig. 54).

c) 16°C (Fig. 58)

Chez les juvéniles, la cicatrisation est faite en 5 jours. Il ne se passe rien de visible jusqu'au 10ème jour où apparaît une petite boule au centre de la blessure (7ème jour pour un individu). A 12 - 14 jours, toute la plaie est concernée. Une demi-sphère fait saillie. Au 20ème jour, le stade cône est atteint. On peut observer le début de la formation des ventouses dès 23 jours. Le cône s'allonge. En un mois environ, les premiers chromatophores sont visibles à la surface. A deux mois, les chromatophores sont plus nombreux et les ventouses les plus proches du moignon et sur le moignon commencent à avoir un pédoncule. Les lames latérales du bras se développent.

Il faut près de trois mois pour que les premiers mouvements apparaissent. En quatre mois, l'aspect du bras est normal, les premières rangées de

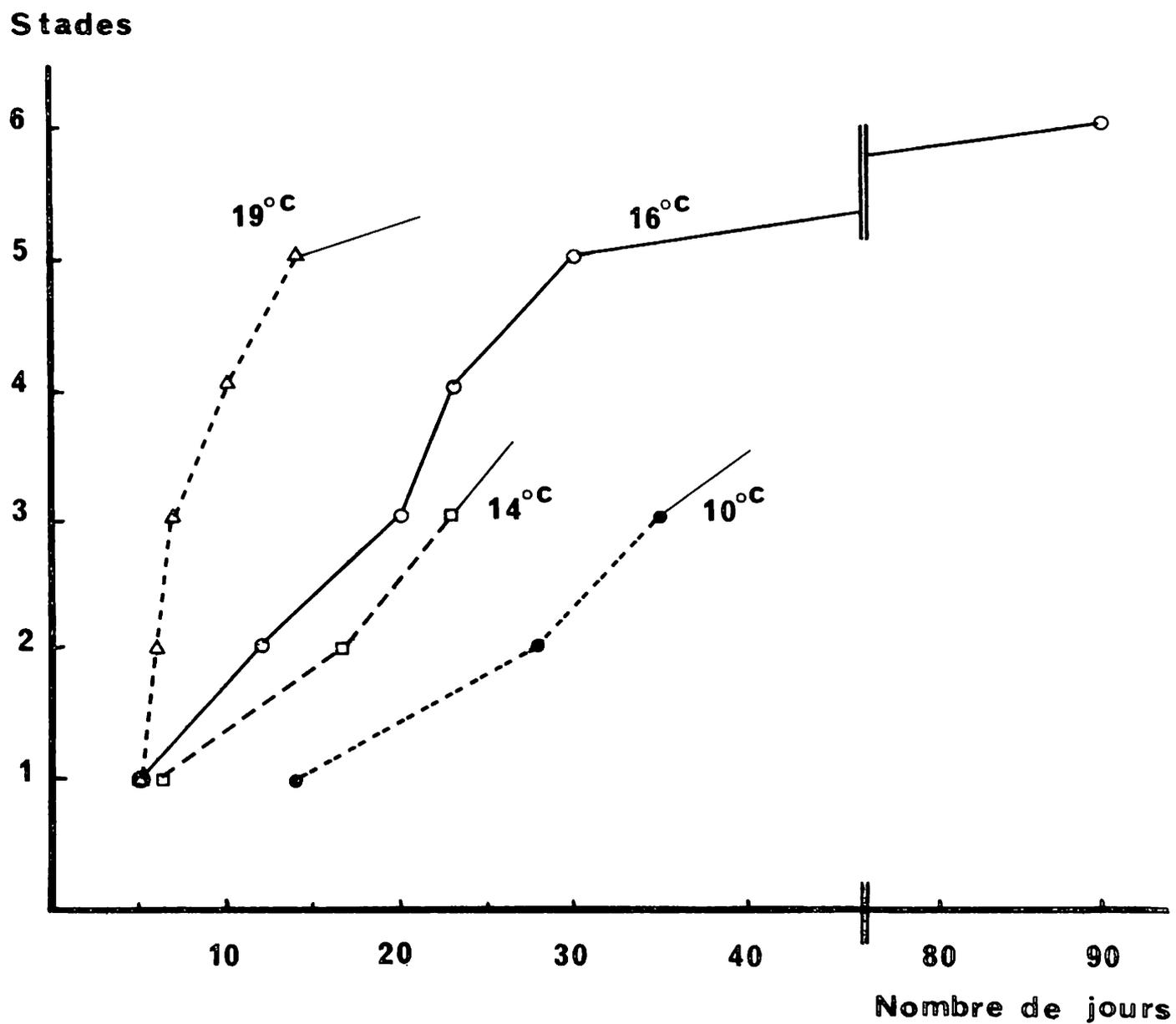


Figure 58 : Evolution du régénérat de jeunes *Sepia officinalis* en fonction de la température,

ventouses sont complètement développées, ainsi que les lames latérales. Le bras est parfaitement fonctionnel, mais il est plus petit que son symétrique.

d) 19°C (Fig. 58)

L'eau a continuellement été chauffée : l'expérience a duré 1 mois, sur des juvéniles. Tout se passe beaucoup plus vite. Les animaux cicatrisent en 5 jours, le stade cône est atteint en 1 semaine. A 10 jours, les premières ébauches des ventouses apparaissent chez la plupart des individus. En 2 semaines, le bras commence à être coloré. Le régénérat s'allonge très vite, il est filiforme et pend. Au bout d'un mois, il est toujours plus clair que le reste du bras et non fonctionnel. Les ventouses n'ont pratiquement pas évolué.

Remarque : Une expérience portant sur une trentaine de *Sepiolo atlantica* capturées en novembre 1975, a été faite à 14°C (Fig. 59). La cicatrisation a lieu en 2 jours, la demi-sphère se forme du 5ème au 7ème jour, le stade cône à 10 jours, les premières ventouses complètes en 1 mois (soit 2 semaines après l'apparition des ébauches) mais il n'y a pas de chromatophores visibles. En 2 mois, le bras I est coloré, les ventouses parfaitement formées ; le régénérat mesure près de 1/2 cm (pour une amputation pratiquée à environ 7 - 8 mm de l'extrémité. Quand l'expérience est faite sur les bras dorsal et latéro-dorsal droits, le bras I devance le bras II. A un mois, il est couvert de chromatophores et ses ventouses sont formées, alors que le bras II est blanc et sans ventouse. Comme chez *Sepia*, le développement du bras I est le plus rapide.

La régénération totale d'un bras de *Sepiolo* demande moins de temps que celle d'un bras de *Sepia*. Elle ne semble pas dépendre de l'âge de l'animal, ni de la température (donc de la saison). Cela peut être rapproché du fait que la période de ponte de *Sepiolo* s'étale sur toute l'année, alors que les Seiches ne pondent qu'environ 6 mois, du printemps à l'automne (MANGOLD-WIRZ, 1963 - BOLETZKY, 1975).

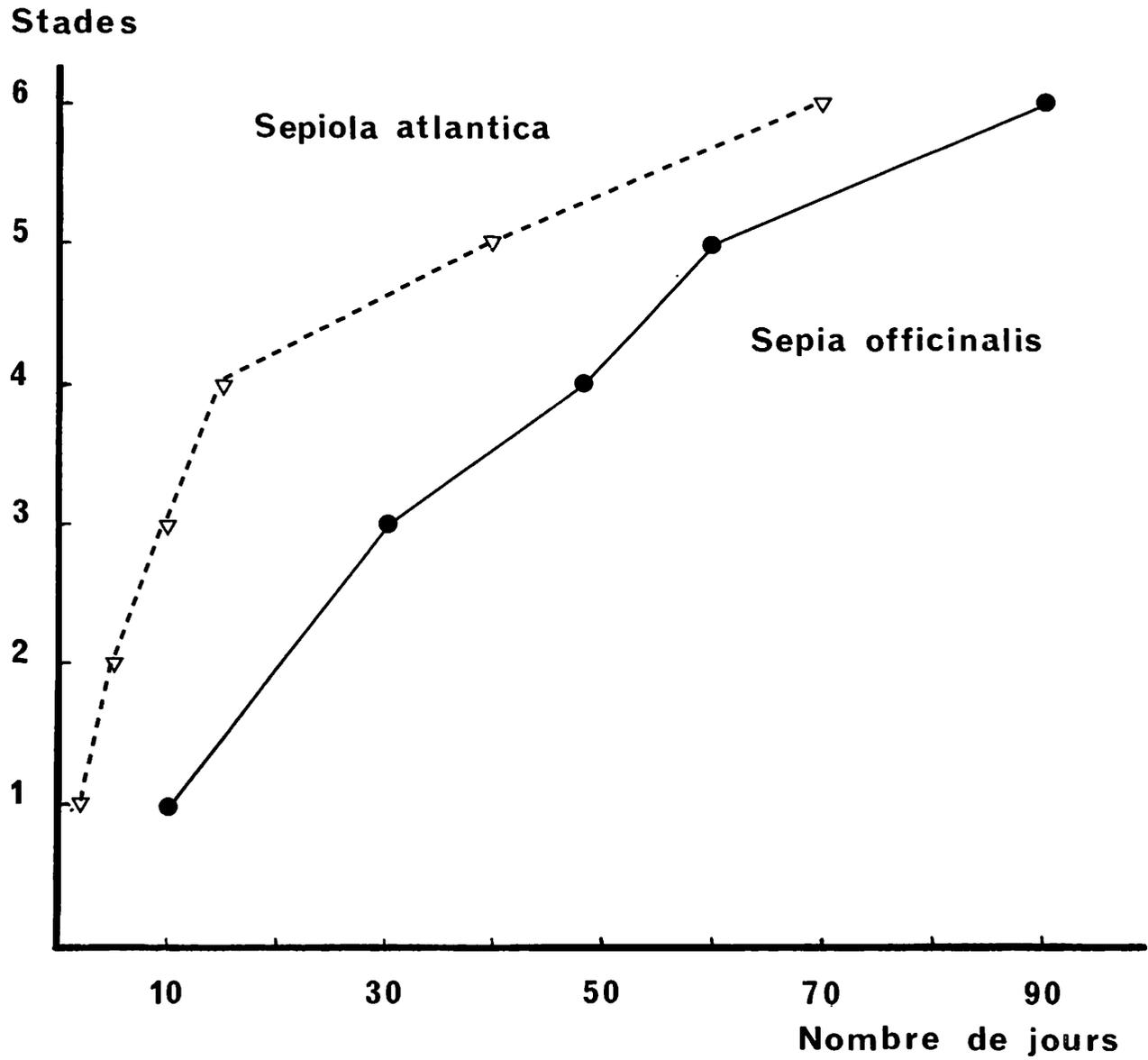


Figure 59 : Evolution du régénérat d'adultes de *Sepia officinalis* et de *Sepioloatlantica* à 14°C (en automne et en hiver).

## II - ETUDE HISTOLOGIQUE ET CYTOLOGIQUE

### A - Cicatrisation

C'est un mécanisme de défense de base qui a toujours lieu, même s'il n'y a pas régénération. (Les temps indiqués plus bas correspondent à une température de 16°C).

#### 1 - Le tissu cicatriciel

##### a) Les amoebocytes

Les cellules sanguines font leur apparition comme dans toute réaction inflammatoire. Environ 6 heures après l'opération, elles commencent à migrer vers la zone irritée. Plusieurs voies d'accès sont utilisées : les vaisseaux eux-mêmes, les cordons nerveux, les muscles, le tissu conjonctif. La quantité d'amoebocytes dans chaque cas, est en rapport avec la disposition des tissus.

Les plus nombreux arrivent par les vaisseaux sanguins et les cordons nerveux. On trouve aussi des cellules sanguines dans le tissu conjonctif (Fig. 71). Ce tissu est plus lâche et plus vascularisé que les muscles. Ce sont les muscles longitudinaux qui offrent le plus de possibilités à l'infiltration en raison de l'orientation des fibres. La densité en amoebocytes augmente quand on approche de la lésion.

Les amoebocytes impliqués subissent des transformations structurales. D'abord contractés, sphériques ou ovoïdes (forme circulante) avec un noyau bibolé et des granulations dans le cytoplasme (Fig. 14), ils deviennent fusiformes quand ils sont extravasés (Fig. 71). Ce phénomène semble irréversible.

On trouve quelques unes de ces cellules allongées, collées à la paroi des vaisseaux et des capillaires (Fig. 14). Elles ressemblent à des fibrocytes. L'encoche nucléaire et les granulations disparaissent.

La cicatrisation du bras de *Sepia officinalis*  
(Fixation BOUIN, coloration AZAN).

Figure 60 : Gt 680

Aspect de la blessure, juste après la coupure. Le cordon nerveux axial est protubérant. La flèche  indique des neurones qui sont atteints de manière irréversible.

Figure 61 : Gt 340

Coupe longitudinale médiane du bras montrant l'invasion des tissus par les amœbocytes et la formation du bouchon cicatriciel 24 heures après l'opération. Le derme est nettement séparé du tissu cicatriciel par un amas de collagène, alors que la limite n'est pas claire pour les autres tissus du bras.

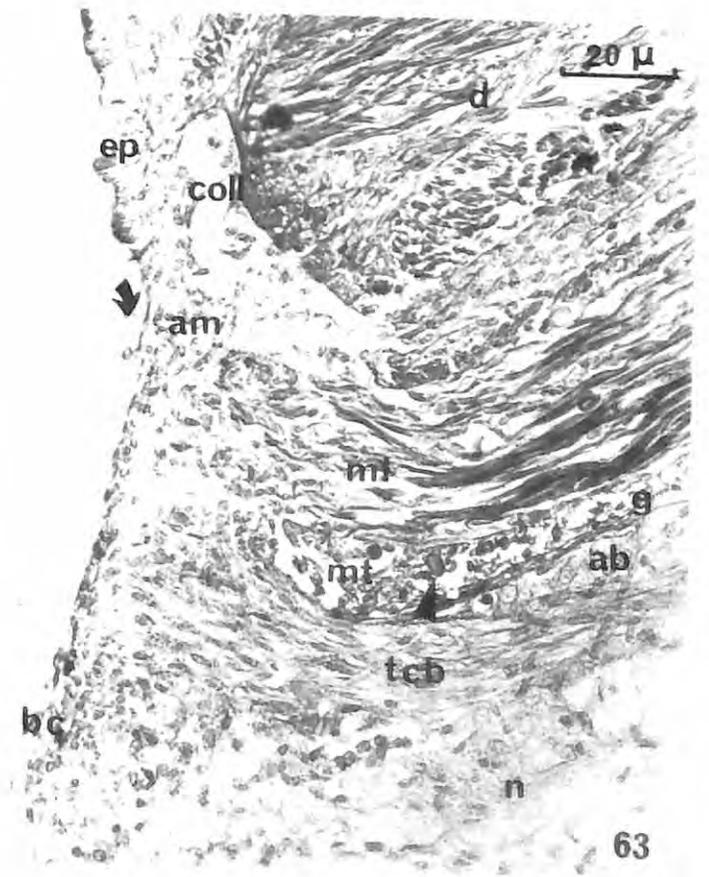
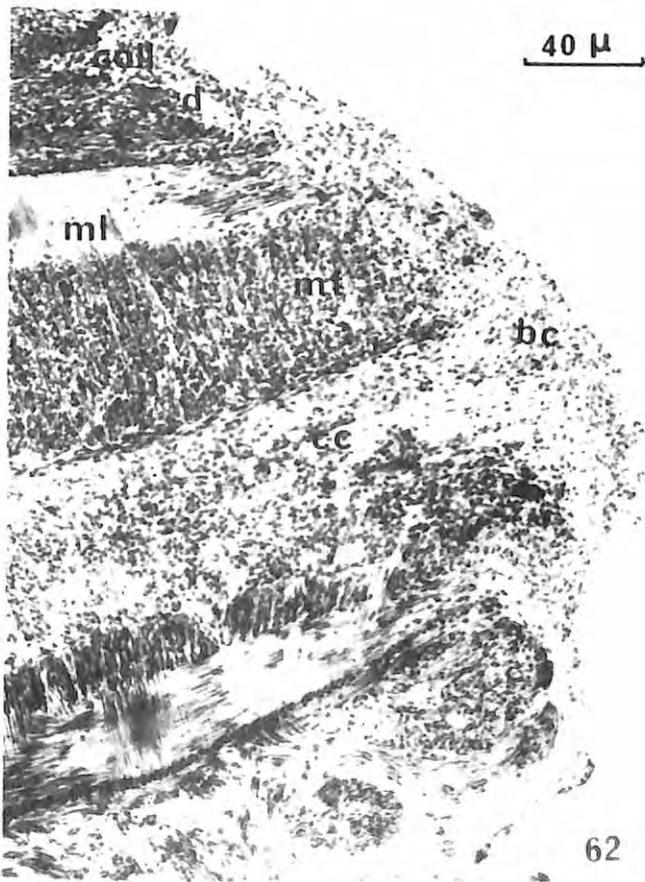
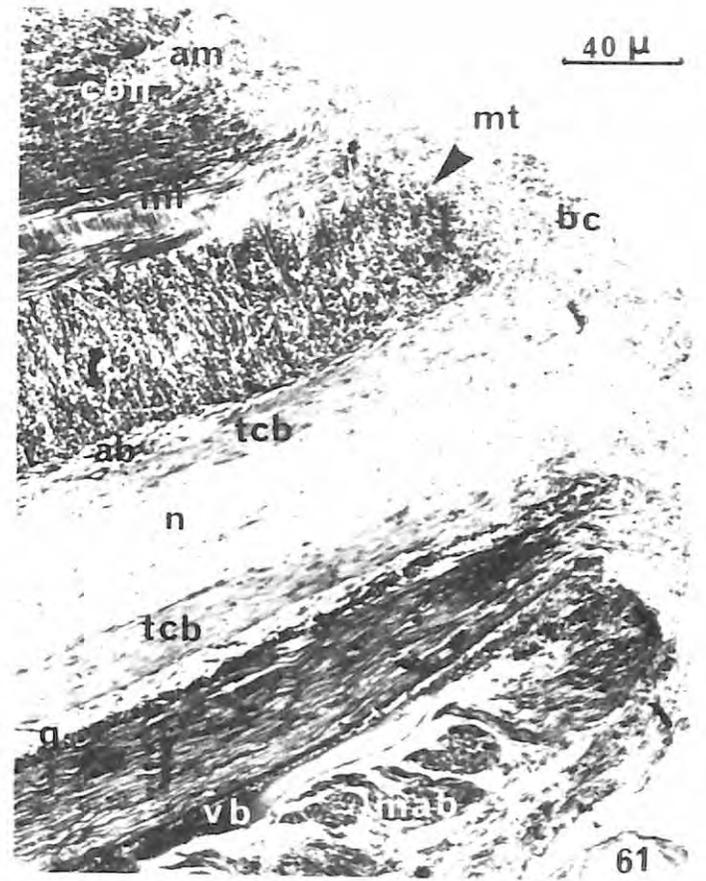
Figure 62 : Gt 340

Aspect du même bras que dans la figure 61, coupé plus latéralement, au niveau de la couche cellulaire, qui, elle aussi, est envahie par les cellules sanguines.

Figure 63 : Gt 680

Détails du même bras. L'épiderme commence à s'étaler (). Les muscles proches de la blessure dégénèrent. Les restes de sarcoplasme forment des amas sphériques ou ovoïdes (). Le tissu cicatriciel est surtout formé d'amœbocytes, de fibrilles non collagène et d'une substance amorphe. Sa limite avec le derme est bien visible. L'artère brachiale est remplie d'éléments figurés.

(ab : artère brachiale, am : amœbocytes, bc : bouchon cicatriciel, cc : couche cellulaire, coll : collagène, d : derme, g : gaine conjonctive, ml : musculature longitudinale, mt : musculature transversale, n : neuropile, tcb : tractus cérébro-brachial).



Arrivées au niveau de la lésion, les cellules sanguines s'agglutinent et forment une masse plasmodiale. Le sang ne contenant pas de fibrine, il ne peut y avoir coagulation. L'agglutination est une fonction cellulaire.

Il n'y a pas d'hémorragie après la coupure. Pendant les premières heures, l'artère brachiale est vide de sang. La circulation est interrompue par contraction des fibres musculaires de la base des péricytes. Puis, les vaisseaux sont remplis d'amoebocytes qui se déversent dans le tissu cicatriciel (Fig. 63).

Après 24 heures, 3 ou 4 couches de cellules recouvrent la surface de la blessure. A 36 heures (Fig. 64), on peut voir un "pseudo-caillot" composé de 5 couches parallèles. Un réseau fibreux, non collagène, relie ces cellules entre elles. Le phénomène de migration est maximum entre le 1er et le 3ème jour après l'amputation (Fig. 65), puis il diminue jusqu'au 5ème jour (Fig. 66). Entre le 5ème et le 7ème jour, l'aspect du neuropile redevient normal.

#### b) Le collagène

Une synthèse accrue de collagène est détectée par les colorations cytochimiques, telles l'Azan ou le trichrome de Masson. Elle est localisée au niveau du derme. Il y a formation d'un véritable bouchon durant les premières 24 heures (Fig. 63). Il n'existe pas devant la musculature, ni au niveau de l'axe nerveux. Il persiste jusqu'à la fin de la cicatrisation.

## 2 - L'épiderme

Il y a dans les premières heures, un décollement de la membrane basale certainement dû à la lyse localisée de cette dernière.

24 heures après l'amputation, les cellules épithéliales ont commencé à s'étaler (Fig. 63). Le mouvement part du bord dorsal en direction du bord ventral, puis il y a des composantes latérales. Cet étalement se fait sur le bouchon cicatriciel qui s'est formé. Il se poursuit jusqu'à la rencontre des bords dorsal et ventral (Fig. 66). Il n'y a

La cicatrisation du bras de *Sepia officinalis*

Figure 64 : Gt 1200 (BOUIN/Bleu alcian - Hématoxyline)

Aspect du bouchon cicatriciel 36 heures après l'amputation. Les amoebocytes, dont on ne distingue plus que le noyau, s'accumulent en couches superposées. La limite tissu nerveux/tissu cicatriciel est inexistante.

Figure 65 : Gt 340 (BOUIN /AZAN)

3 jours après l'amputation, les amoebocytes migrent toujours vers l'extrémité du bras amputé. Tissus nerveux et musculaire (▲) dégénèrent localement. Le bouchon cicatriciel et les autres tissus commencent à être isolés les uns des autres.

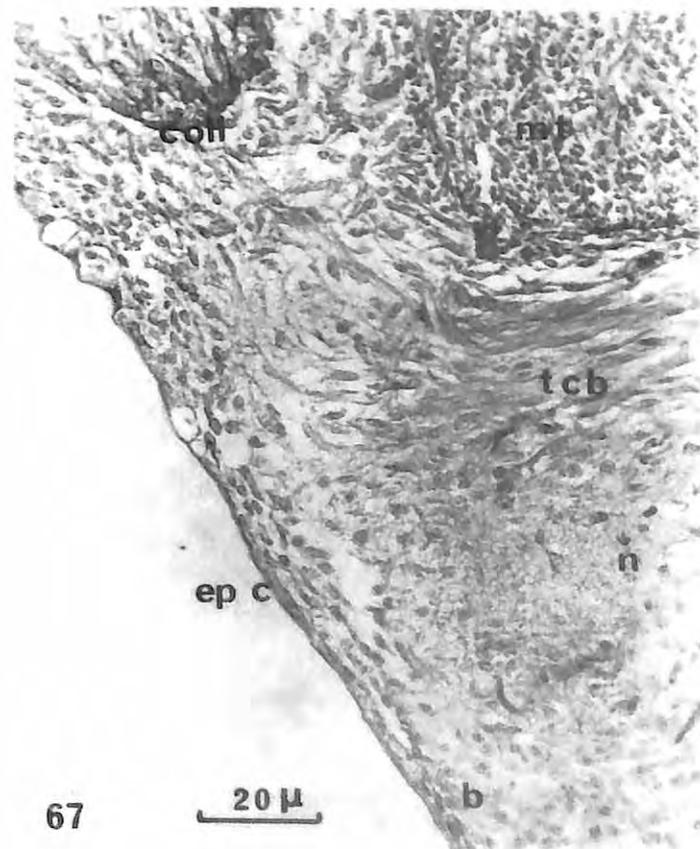
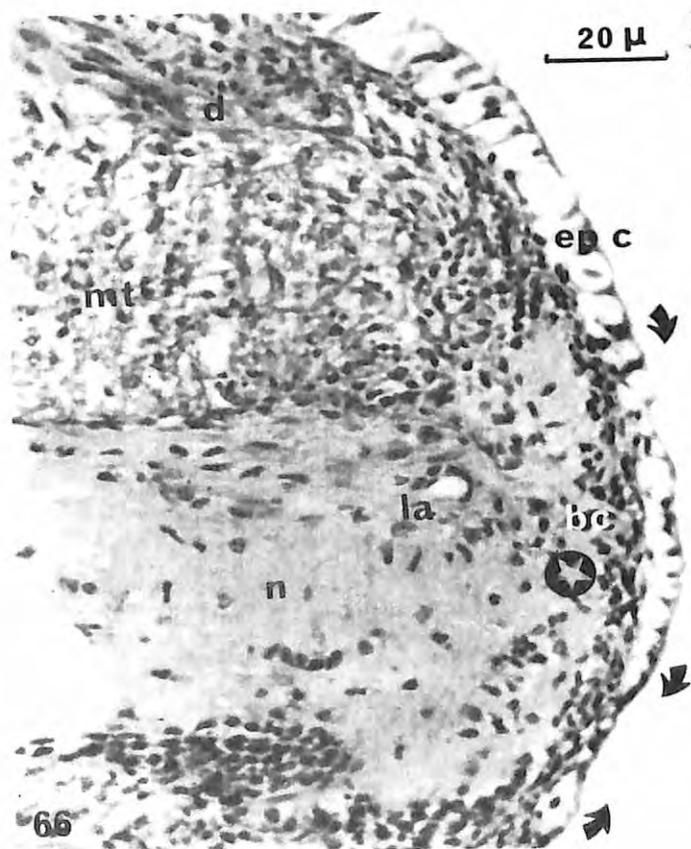
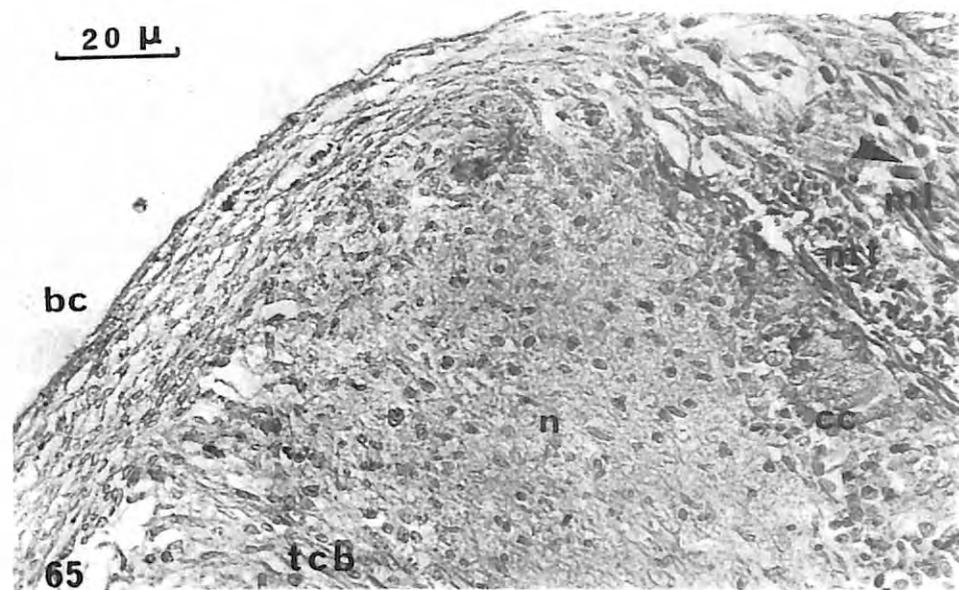
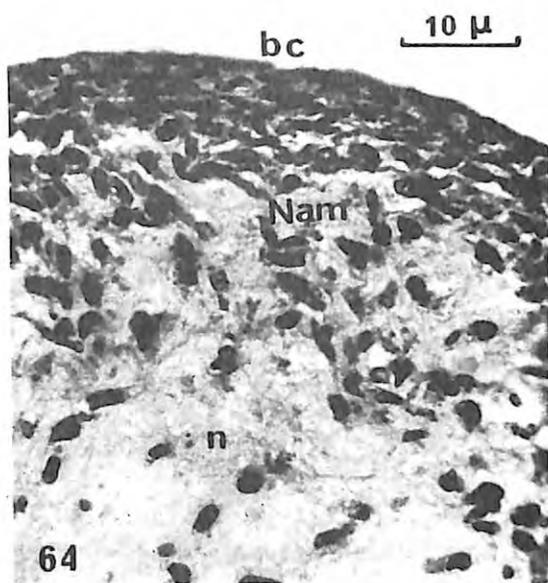
Figure 66 : Gt 340 (BOUIN/Bleu alcian - Hématoxyline)

L'étalement de l'épiderme est terminé après 5 jours. La partie dorsale a été plus mobile (▼). L'aspect du neuropile est redevenu normal. Les phénomènes de dégénérescence ne se sont pas accentués. Les lacunes qui en résultent, sont visibles dans le tissu nerveux. La névroglie a réagi, elle forme un gliome repérable par la différence d'affinité tinctoriale de ses éléments par rapport au reste du tissu nerveux.★

Figure 67 : Gt 340 (BOUIN/AZAN)

Après 6 jours, le blastème commence à être bien visible. Il est formé d'éléments indifférenciés et recouvert par l'épiderme cicatriciel, qui, comme dans la figure 66, n'a pas de membrane basale.

(mêmes abréviations que pour les figures de la page 79).



pas eu de division cellulaire, ni participation de cellules autres qu'épidermiques, au recouvrement de la plaie.

Pendant tout ce temps, les cellules épithéliales conservent leurs caractères généraux décrits précédemment. En particulier, les microvillosités et les cellules glandulaires, qui restent fonctionnelles. Ces dernières peuvent servir de traceur. Celles contenant des produits de sécrétion, qui n'ont pas encore été rejetées au dehors, ne s'étalent pas comme leurs voisines et sont aisément repérables. De prismatiques, les cellules épithéliales sont devenues cubiques puis, pavimenteuses (Fig. 66).

Il n'y a pas de véritable différenciation morphologique.

L'épiderme est acidophile pendant l'étalement qui nécessite 3 à 5 jours, selon l'âge de l'animal et la température.

## B - La dégénérescence des tissus

Elle commence immédiatement après la coupure qui a touché les téguments, les muscles, les cordons nerveux, les vaisseaux sanguins.

### 1 - Le tissu nerveux

Les neurones de la couche cellulaire du cordon axial sont les premiers touchés (Fig. 60). 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.

D'autres sont touchés par le phénomène de dégénérescence rétrograde, plus ou moins accentuée, en fonction de la longueur de la fibre amputée.

Les axones du tractus cérébro-brachial subissent une dégénérescence primaire, liée au traumatisme. Le fait que l'on n'observe pas de nécrose sur les coupes de cerveau, semble indiquer que la dégénérescence rétrograde n'est pas très poussée. Cependant, les imprégnations argentiques destinées à suivre ce phénomène, n'ont pas donné les résultats attendus. On note la dégénérescence de l'axoplasme. Il en est de même pour les axones des nerfs périphériques (Fig. 69).

Figure 68 : Gt 6600

Aspect du derme, 20 heures après l'opération au niveau de la cicatrice.

Les cellules sont en état de dégénérescence avancée. Les amoébocytes (am) arrivés les premiers sur place, se nécrosent. Ils sont reconnaissables par leurs granulations. Un fibrocyte, dont on voit surtout le noyau (Nf) est visible en haut du cliché. L'espace extracellulaire est encombré de déchets (▲). Le collagène (coll) est très abondant. Les péricytes (p) d'un capillaire sanguin (Cs) contenant de l'hémocyanine (H) se décomposent.

Figure 69 : Gt 6600

Aspect d'un cordon nerveux périphérique (CNP), après 20 heures, certaines fibres sont en train de dégénérer. Elles présentent des lacunes (la). D'autres, semblent encore en bon état. L'espace péri-nerveux est occupé par du collagène (coll) et des prolongements de fibres gliales (g). Une cellule à granulations denses (amoébocyte ?) semble infiltrée entre les fibres. Le tissu conjonctif à proximité, montre aussi des signes de dégénérescence. Le capillaire sanguin (Cs) et le fibrocyte (f) se nécrosent.

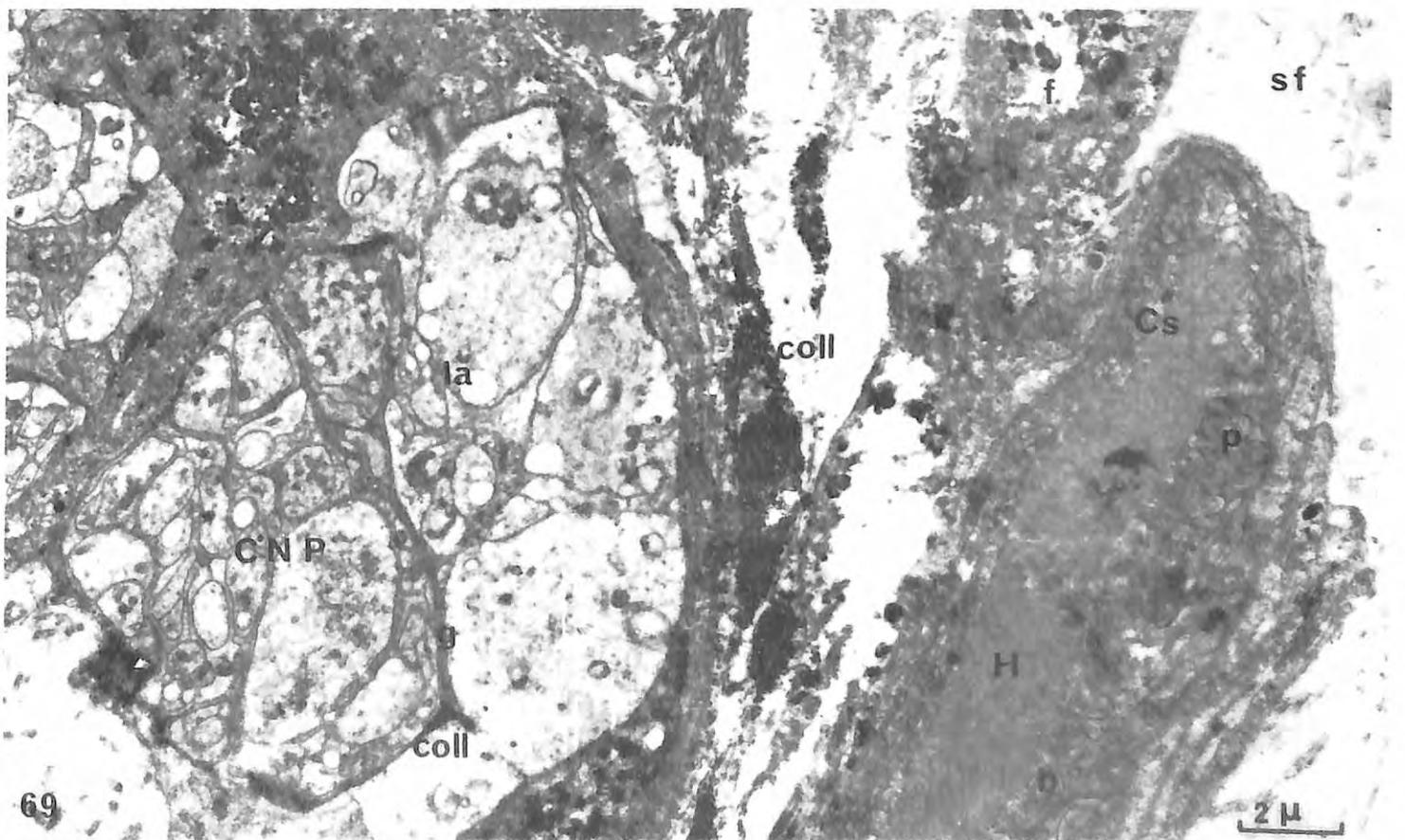
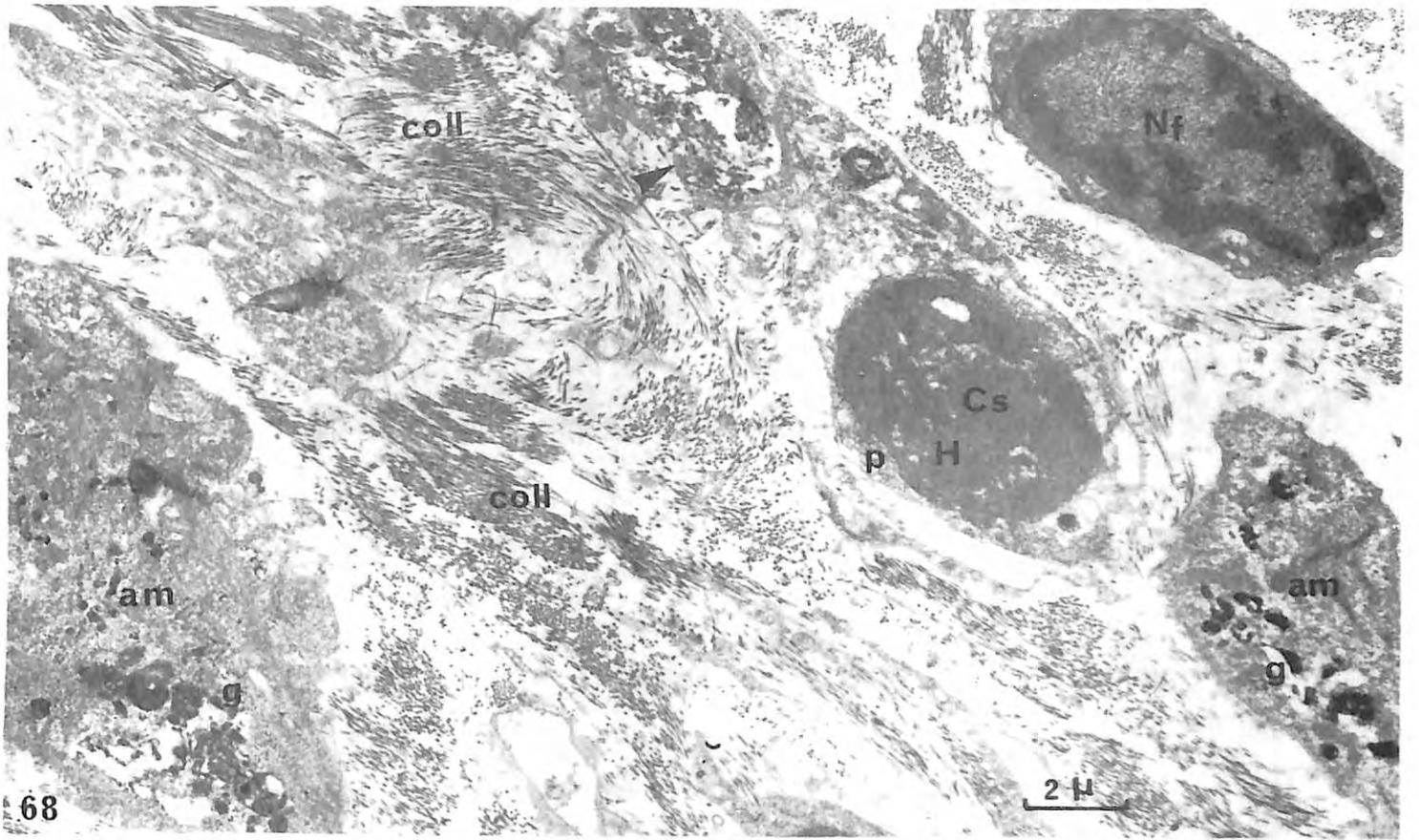
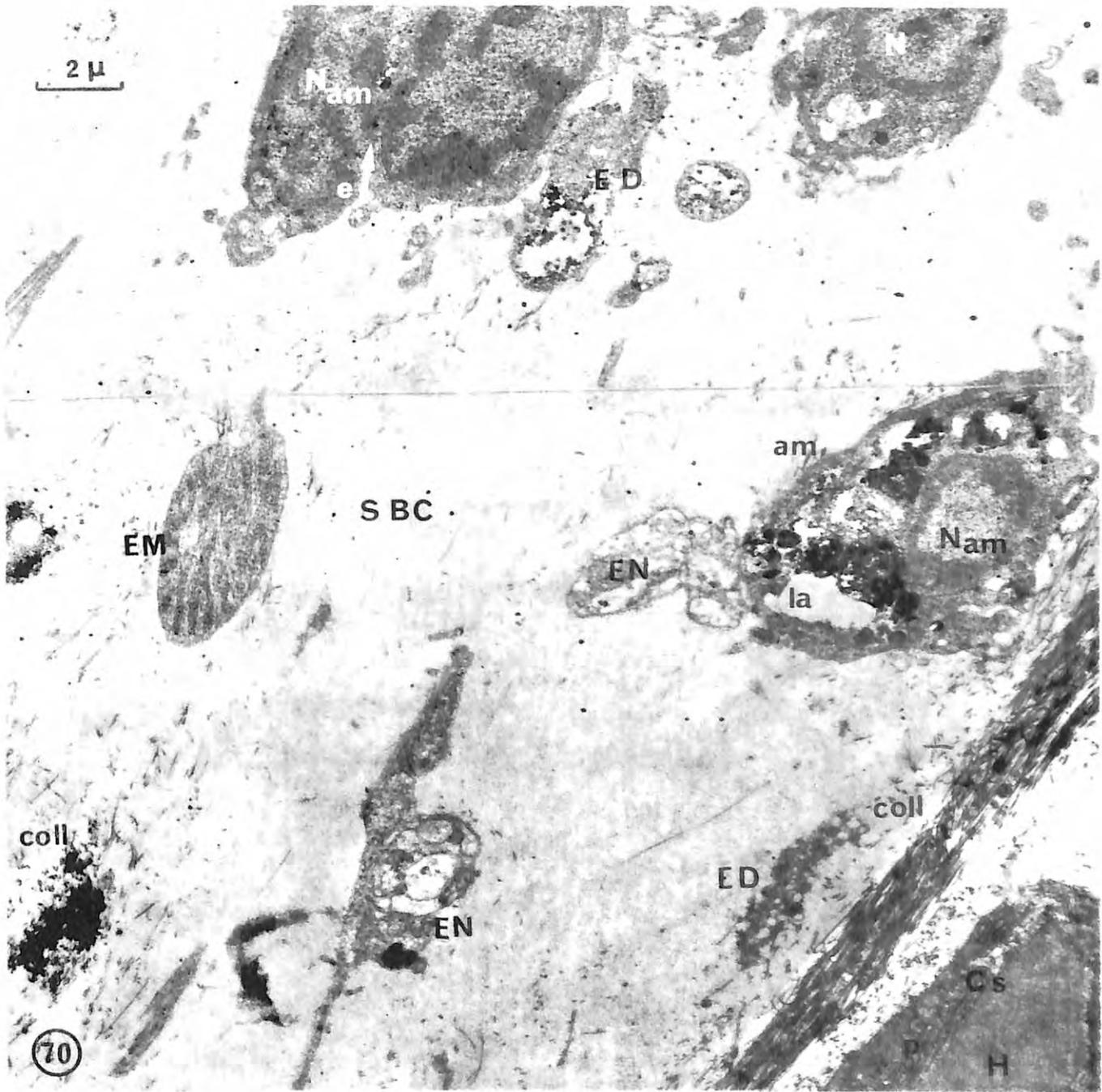


Figure 70 : Gt 6600

Le tissu cicatriciel, 20 heures après l'amputation, au niveau des tissus autre que le derme, contient très peu de collagène.

Des amœbocytes (am) reconnaissables à leur noyau (Nam) possédant souvent une encoche (e) migrent à l'intérieur. D'autres, arrivés dès les premières heures après l'opération, dégénèrent et présentent des lacunes (la). Dans la substance fondamentale du bouchon cicatriciel (SBC), des éléments musculaires (EM) et nerveux (EN), et d'autres, d'origine indéterminable (ED), sont en train d'être résorbés.



Dans le neuropile, ces faits se traduisent par l'apparition de nécroses. (Fig. 66). Ces lacunes sont dues à la dégénérescence d'éléments nerveux et à ceux de la névroglie. Mais la désintégration reste légère. Il faut noter une réaction hyperplastique des cellules de la névroglie qui a pour effet de contribuer au comblement des lacunes apparues dans le tissu nerveux. Il en résulte un gliome visible par la différence d'affinité tinctoriale de ses éléments par rapport au reste du tissu nerveux (Fig. 66 et 75).

## 2 - Le tissu musculaire

La musculature est atteinte par la dégénérescence, mais le phénomène reste localisé. Il est surtout visible dans les muscles longitudinaux. Les plus proches de la plaie perdent leur structure striée oblique (Fig. 72). Les cellules gonflent ou sont scindées en masses sphériques ou ovalaires (Fig. 65). Les fragments anucléés dégènèrent (Fig. 70). Les noyaux se rétractent et/ou se cassent. La plupart disparaissent. Les fibres ainsi touchées ne prennent plus les colorants. Certains fragments de noyau subsistent, entourés d'un peu de sarcoplasme.

Les cellules musculaires plus éloignées de la plaie, subissent aussi des transformations, mais moins poussées. Les fibres deviennent aussi turgescents. Les noyaux se fragmentent, mais il est toujours possible de reconnaître du tissu musculaire. Les affinités tinctoriales sont les mêmes que celles des cellules intactes.

A la limite de la zone de dégénérescence, les fibres ont un aspect normal. Elles sont nucléées et normalement striées.

La sarcolyse qui se traduit par une perte de la structure striée, est concomitante de la dégénérescence nerveuse, (Fig. 73) et de celle des vaisseaux et des capillaires (Fig. 74).

Figure 71 : (Gt 11 660)

Amoebocyte possédant un noyau ( $N_{am}$ ) à encoche (e) infiltré dans le tissu conjonctif. Des lacunes (la) sont visibles dans la cellule sanguine et dans les fibrocytes dont on peut voir les noyaux ( $N_f$ ). La quantité de collagène (coll) présente est importante.

Figure 72 : (Gt 11 660)

Dégénérescence musculaire. Les fibres perdent leur striation.  
(S : sarcolyse,  $N_m$  : noyau de cellule musculaire).

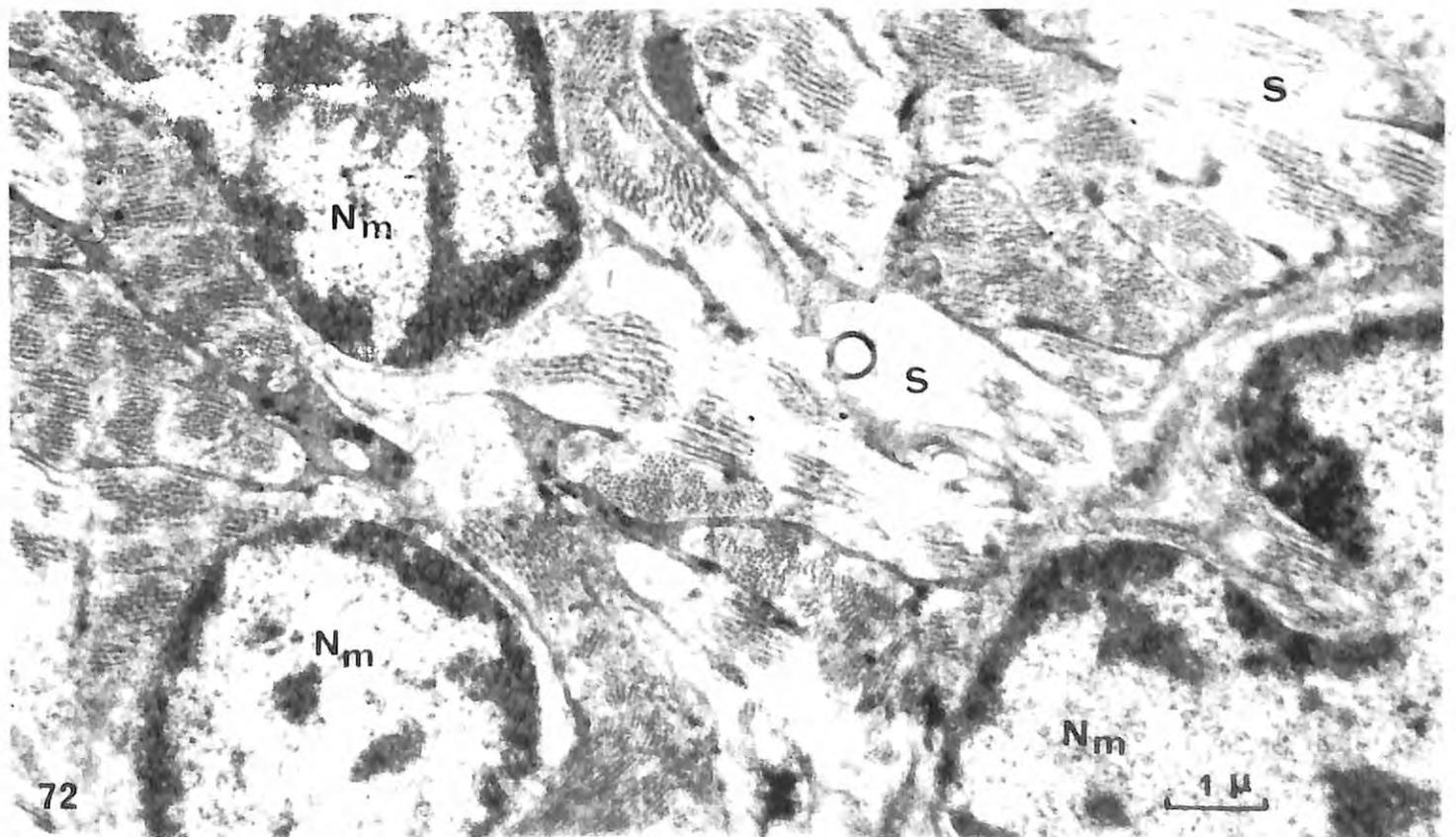
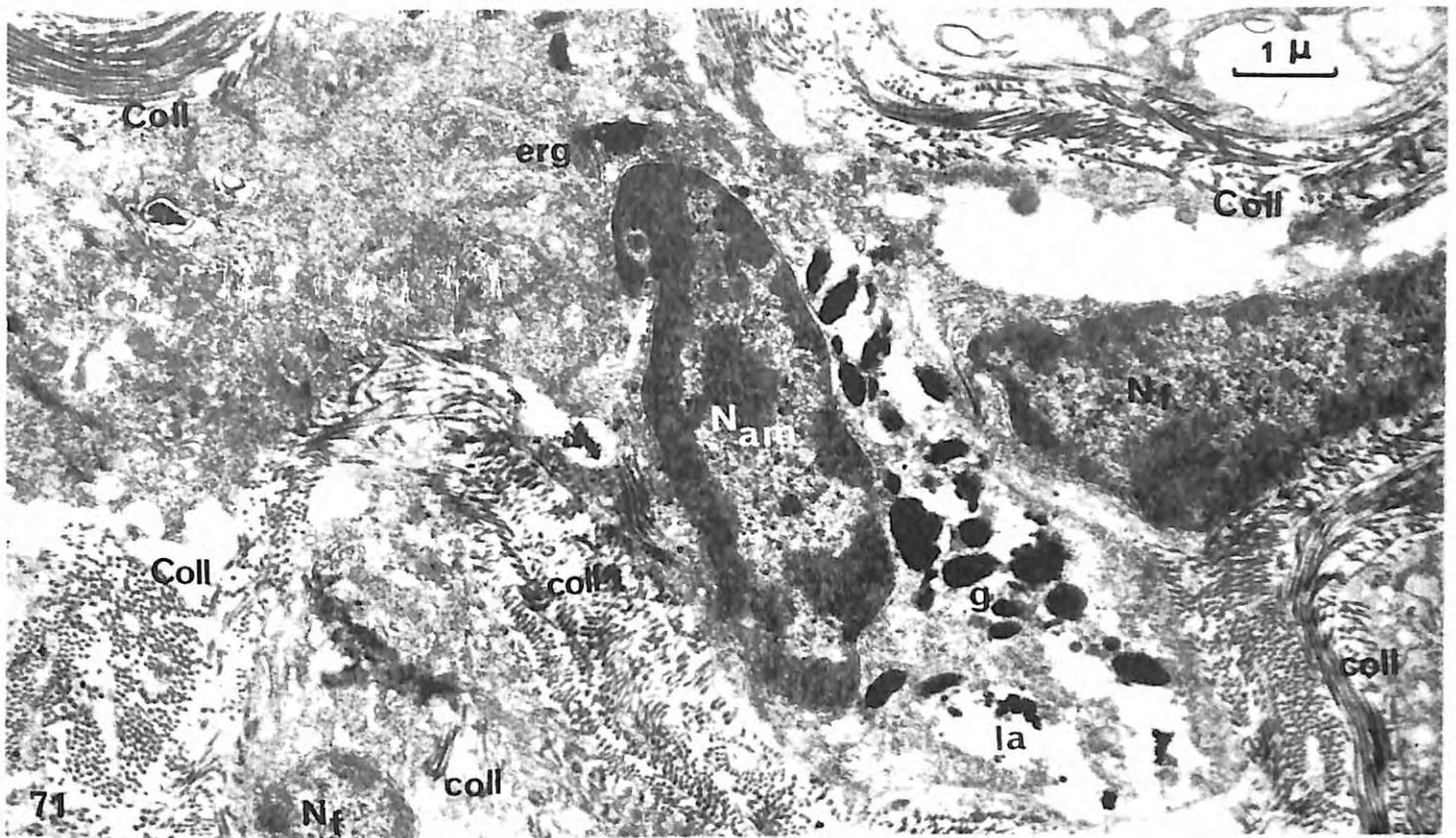
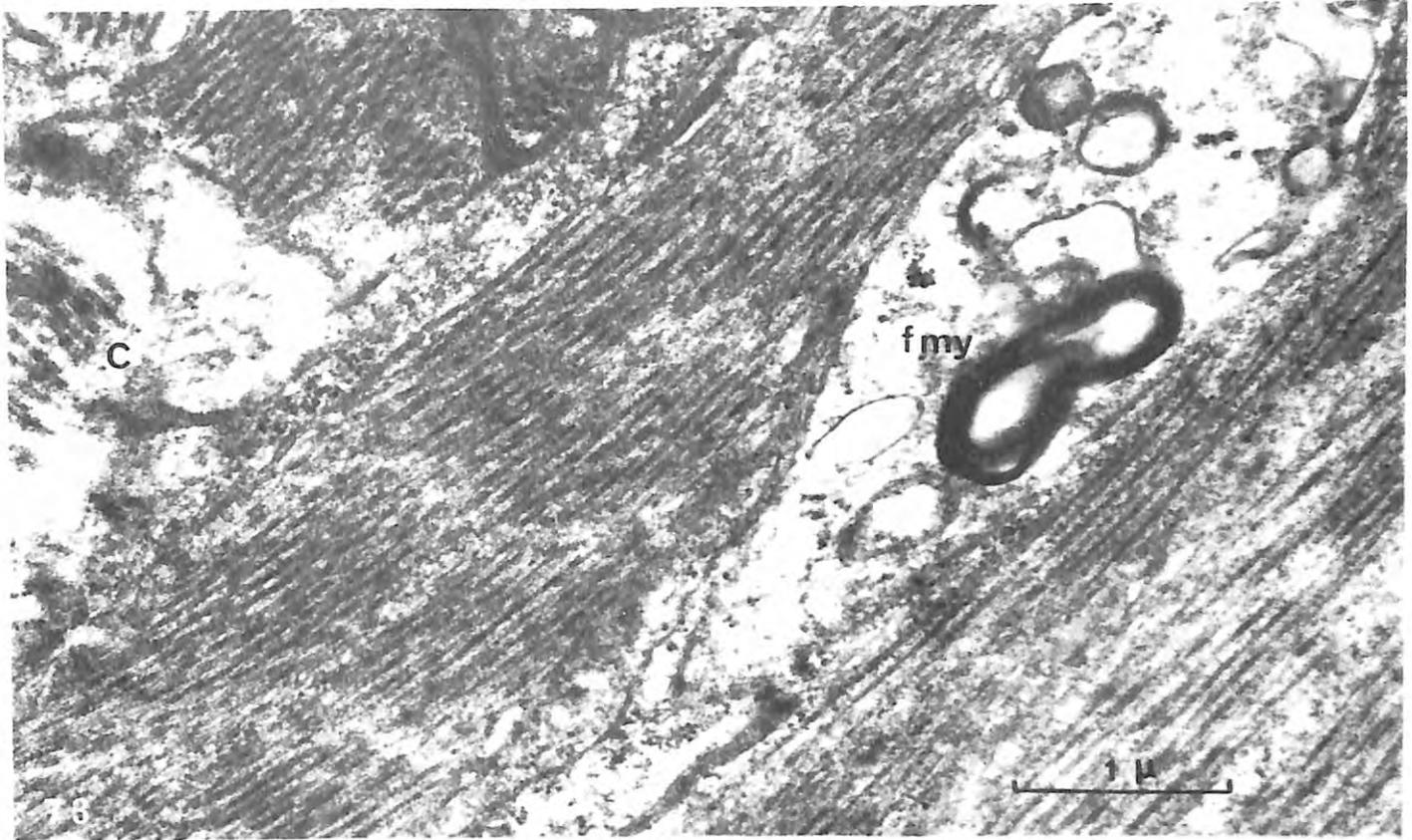


Figure 73 : (Gt 26 400)

La sarcolyse peut être la conséquence de la dégénérescence nerveuse. L'axoplasme de cette fibre présente des lacunes. Elle ne contient presque plus de vésicules et de tubules. La figure myélinique (fmy) est le stade ultime de dégénérescence d'organites cellulaires.

Figure 74 : (Gt 30 800)

La sarcolyse peut être également la conséquence d'une mauvaise irrigation. Ce capillaire de type 4, s'il présente une basale (b) continue qui semble en bon état, ne contient pas de sang. On ne voit que quelques traces d'hémocyanine (H). Les péricytes (p) ont perdu toute ultrastructure.



### 3 - Les amoebocytes

Une partie des cellules sanguines ayant participé à la construction du "pseudo-caillot" dégénèrent. Elles perdent leurs granulations. D'énormes vacuoles apparaissent dans un cytoplasme en complète dislocation (Fig. 71). Leur destruction se fait sans doute par autolyse.

Les amoebocytes détruits sont remplacés par d'autres qui arrivent pour compléter le tissu cicatriciel ou pour contribuer à la formation du blastème.

### 4 - Autres tissus

Les fibrocytes au voisinage de la plaie dégénèrent. Nous n'avons pas pu observer le comportement des autres, en raison du grand nombre de cellules sanguines infiltrées dans le tissu conjonctif.

On note aussi, et ce, jusqu'à un mois après l'amputation, l'existence de formations volumineuses de type myélinique. Ce sont des figures de digestion intracellulaire, le stade ultime de la dégénérescence d'organites cytoplasmiques. L'empilement correspond à l'arrangement des phospholipides.

Les vaisseaux sanguins se nécrosent aussi. Les organites des péricytes disparaissent, l'endothélium, quand il existe, se dilacère. Ces vaisseaux ne contiennent que peu ou pas de sang. Le manque d'irrigation des tissus est une des raisons de leur nécrose. (Fig. 74).

## C - Le blastème de régénération

### 1 - La formation (Fig. 75 et 76)

Quand elle a lieu, la régénération proprement dite, est précédée par une phase d'accumulation de matériel cellulaire ayant subi une différenciation plus ou moins poussée.

L'édification de ce massif d'allure syncytiale se fait en une dizaine de jours. Il est formé de noyaux de cellules qui ont migré vers l'extrémité du bras. En premier lieu, ce sont les amoebocytes. Mais des neurones, des cellules musculaires ou des fragments des fibrocytes du tissu conjonctif se sont aussi accumulés dans cette région.

Figure 75 : (BOUIN/Trichrome de MASSON)

7 jours après l'amputation, pour les animaux les plus rapides, l'accumulation du blastème commence. L'axe nerveux présente encore des différences d'affinités tinctoriales (⊕). Le neuropile est d'aspect normal.

Figure 76 : (BOUIN/Bleu alcian - Hématoxyline)

10 jours après l'amputation, le blastème gonfle l'extrémité du bras en demi-sphère.

Figure 77 : (BOUIN/P A S)

2 semaines après l'amputation, les cellules des tissus entrent en division. Le blastème a la forme d'un cône. Il est pénétré par le tissu nerveux (▲). L'épiderme semble pluristratifié (ep s).

Figure 78 : (BOUIN/Bleu alcian - Hématoxyline)

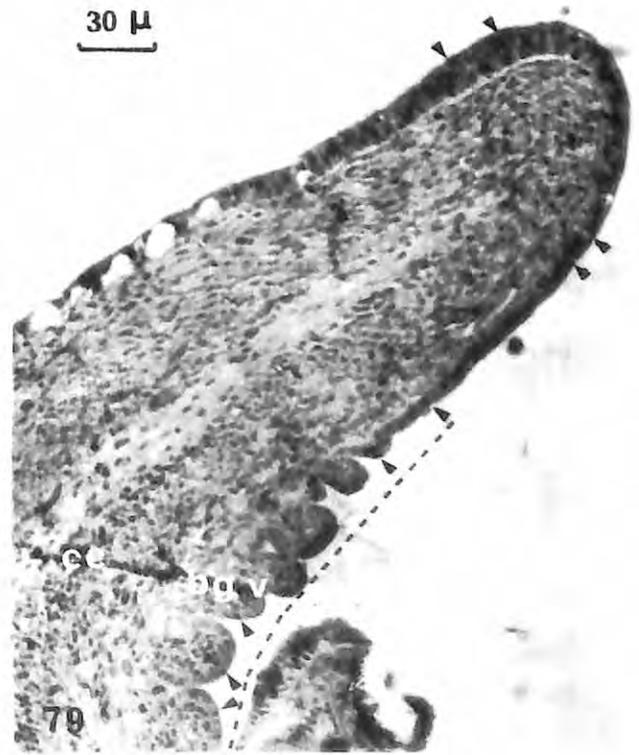
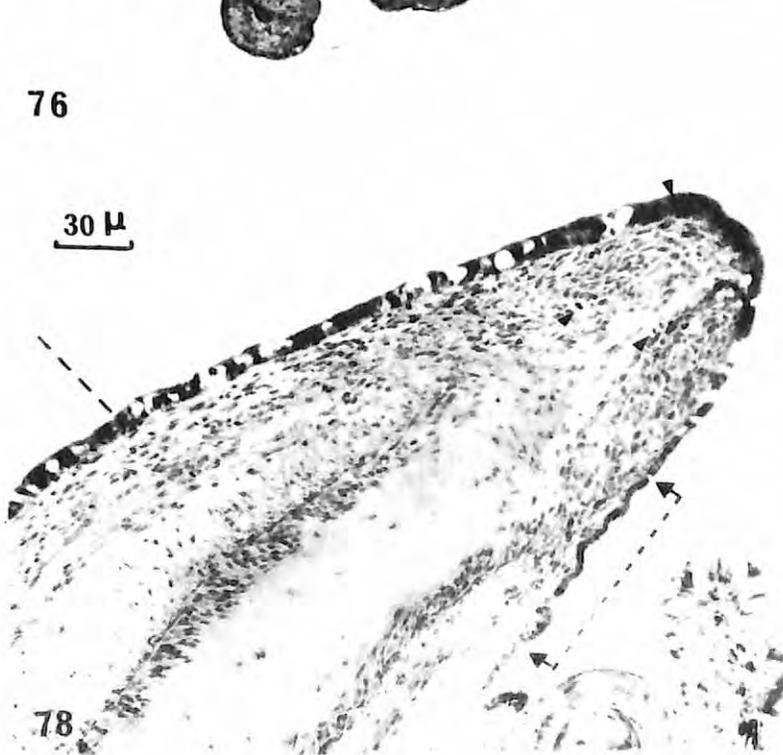
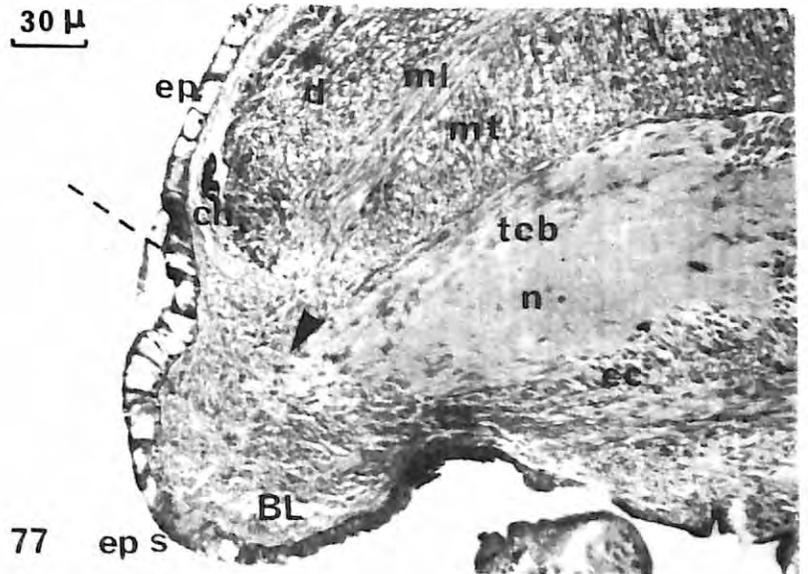
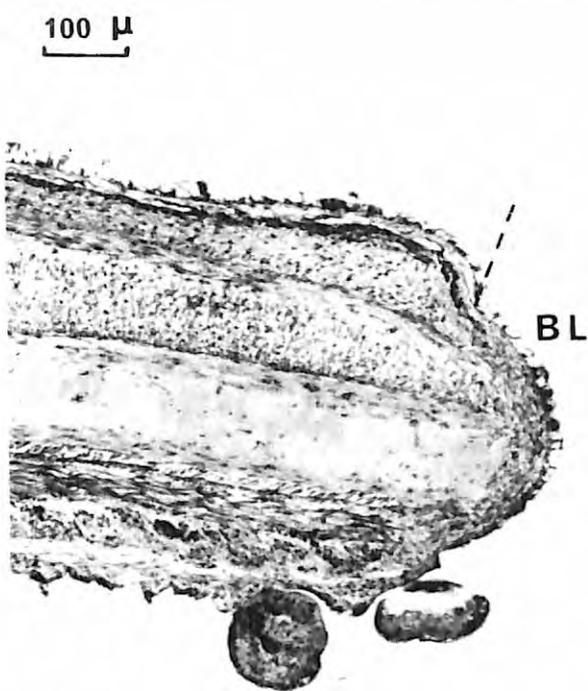
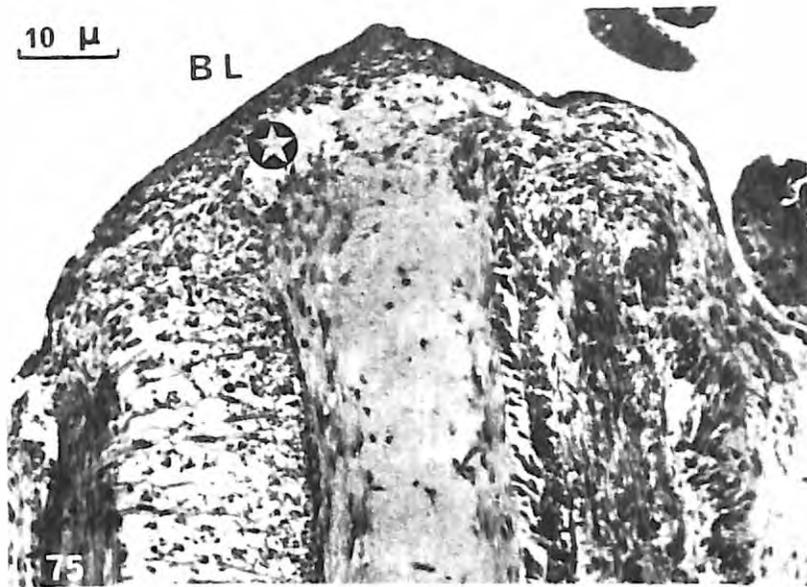
3 semaines après l'amputation, le blastème s'accroît et la différenciation commence (▲...▲). On note les ébauches des ventouses sur la face orale. L'axe nerveux est bien individualisé.

Figure 79 : (BOUIN/Trichrome de CAJAL)

Après 25 jours, le régénérat a encore grandi. Des ventouses ont évolué, d'autres ébauches sont visibles. La différenciation est centrifuge.

(BL : blastème, bg v : bourgeons de ventouses, cc : couche cellulaire, ch : chromatophore, de : derme, ep : épiderme, ml : musculature longitudinale, mt : musculature transversale, n : neuropile, tcb : tractus cérébro-brachial).

----, niveau de l'amputation.



Pendant tout ce temps, aucune mitose n'a pu être observée, et bien que les amœbocytes ne migrent pas, le nombre des cellules semble augmenter. Les fixations ont toujours été faites entre 10 et 11 heures le matin. Il est possible que nous soyons passés à côté de crises mitotiques rapides.

## 2 - L'activation

Cette période d'accumulation est suivie d'une période d'activation. Le noyau s'arrondit. Le cytoplasme des cellules du blastème et celles de l'épiderme deviennent basophiles ainsi que leurs nucléoles, (coloration rouge au trichrome de RAMON Y CAJAL). Ceci est l'indice de synthèse d'acides nucléiques, prémice nécessaire à la division cellulaire.

Bien que, macroscopiquement aucun changement n'intervient depuis la fin de l'étalement de l'épiderme, on s'aperçoit qu'il est abusif d'appeler cette période du 5ème au 10ème jour : temps de latence. Le terrain est préparé pour la régénération. Elle va débiter par prolifération du blastème et de l'épiderme.

## D - La régénération

### 1 - L'épiderme

Les cellules activées se divisent aux environs de la 2ème semaine. (Fig. 80). L'épiderme devient très épais. A la pointe du bras, il semble pluristratifié, mais il n'y a pas de limites cellulaires visibles. Au 25ème jour, il est de nouveau simple, il évolue de cubique à palissadique. Les mitoses se poursuivent encore jusqu'à environ un mois et demi, mais elles sont moins fréquentes.

Sur la face interne du bras, les ventouses ont commencé à se différencier vers le 20ème jour. Elles apparaissent d'abord sur le moignon, puis la différenciation progresse vers l'extrémité du bras et à mesure que celui-ci croît. L'épiderme de chaque ventouse prolifère.

Figure 80 : (BOUIN/Trichrome de MASSON)

Après 14 jours, la membrane basale de l'épiderme n'est pas très nette et même n'existe pas encore à la pointe du régénérat. A cet endroit, l'épiderme est syncytial (★). Il se divise abondamment. Deux mitoses sont visibles (▲). On note que la bordure en brosse existe toujours.

Figure 81 : (BOUIN/P A S)

A ce stade de 20 jours, l'axe nerveux est déjà bien individualisé à la périphérie. La mitose encerclée doit correspondre à la division d'une cellule gliale.

Vers l'avant, des fibres nerveuses pénètrent le blastème. Il est possible de distinguer aussi les cellules qui évolueront en fibrocytes et celles qui évolueront en fibres musculaires.

La seconde mitose (▲) se trouve dans le futur muscle.

Figure 82 : (BOUIN/Bleu alcian - Hématoxyline)

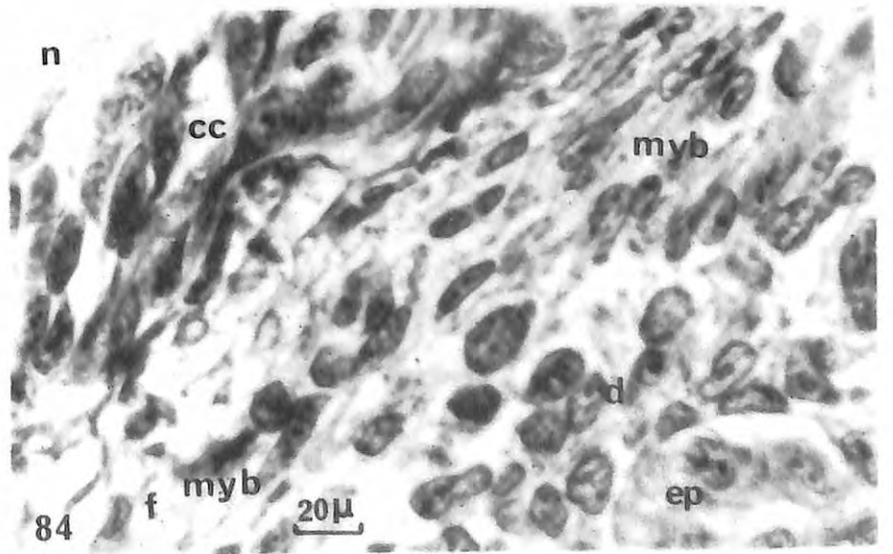
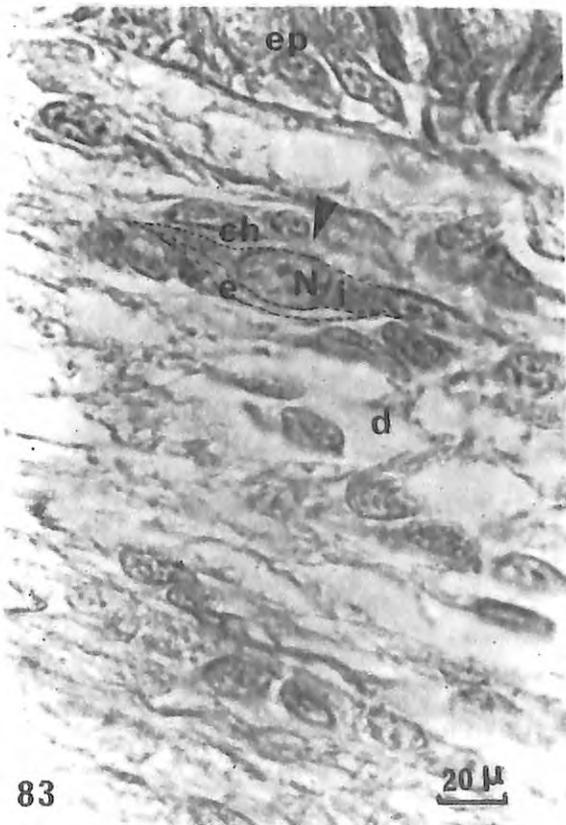
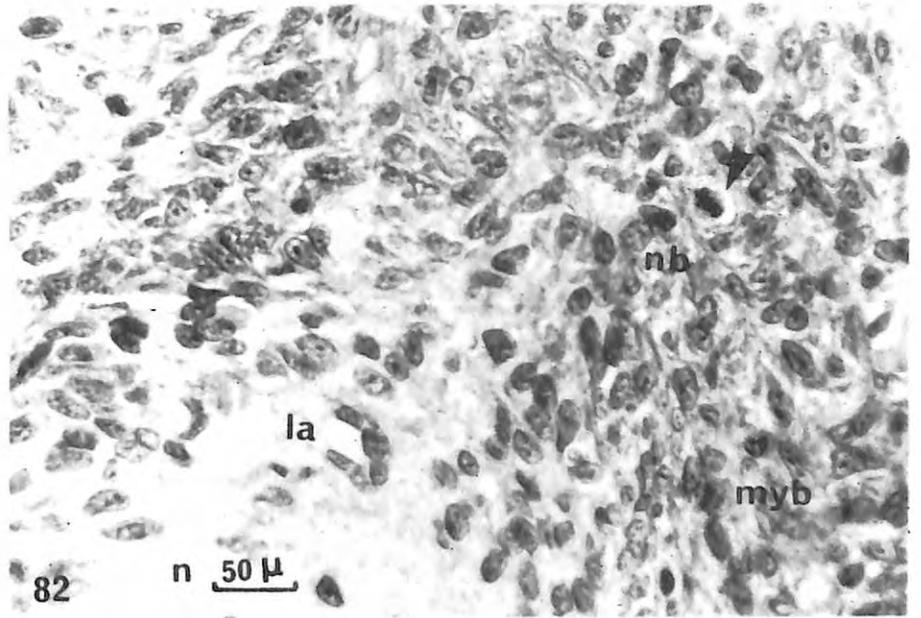
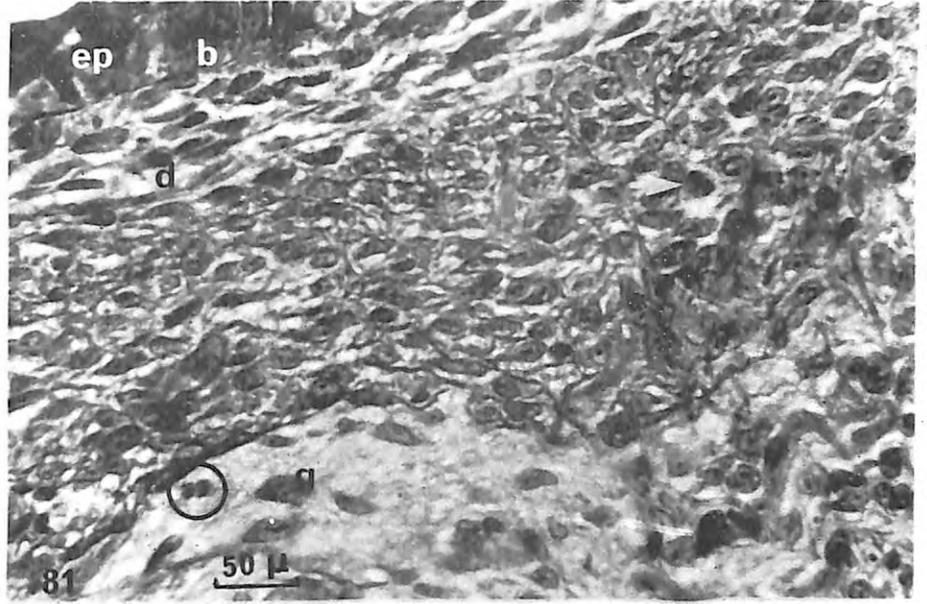
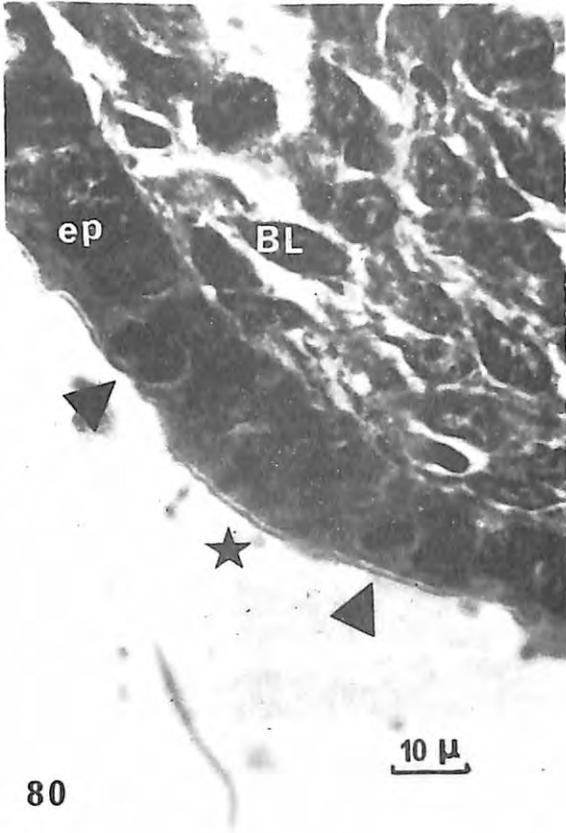
Coupe passant par la couche cellulaire en train de s'individualiser. On note une figure de mitose (métaphase) d'un neuroblaste (nb). Une lacune (la) du neuropile (n) est entourée d'amoebocytes. Les myoblastes (myb) se rangent en files parallèles à l'axe nerveux. Ils vont donner la musculature longitudinale.

Figure 83 : (BOUIN/AZAN)

Au 20<sup>ème</sup> jour aussi, les chromatophores (ch) s'individualisent à partir d'une cellule du derme (d) en formation (fibroblaste). Sur ce cliché, on distingue le plasme externe (e) et le plasme interne (i) qui contient déjà des grains de pigment clair. Le noyau (N) est volumineux.

Figure 84 : (BOUIN/AZAN)

Arrangement des myoblastes (myb) entre le derme (d) et la couche cellulaire (cc) de l'axe nerveux dont on voit également le neuropile (n). Des fibres musculaires (f) sont déjà visibles.



De ce fait, les mitoses sont visibles plus longtemps de ce côté du bras. Vers le 2ème mois, les cellules épithéliales des ventouses sécrètent leur anneau corné. Les cellules à mucus, nombreuses sur cette face, se différencient et sont fonctionnelles très tôt.

L'épithélium de l'extrémité du bras normal a les caractères de l'épithélium en train de régénérer. Les cellules ont un gros noyau sphérique et un nucléole volumineux, alors que le cytoplasme est peu abondant.

L'épiderme régénère par épimorphose, c'est-à-dire avec la participation d'un petit nombre de cellules voisines et sans différenciation complète. Ces cellules sont en contact avec les tissus sous-jacents, jusqu'à la formation de la membrane basale au moment de la différenciation.

## 2 - Le derme

Il est formé à partir de cellules du tissu cicatriciel et du blastème, c'est-à-dire, surtout d'amoébocytes.

### a) Le tissu conjonctif

Il sera toujours formé d'un seul type de cellules fixes noyées dans une substance fondamentale hyaline, contenant des fibres de collagène.

Le tissu cicatriciel est rejeté à la périphérie par la croissance du cordon nerveux axial qui pénètre le blastème.

Le tissu conjonctif est d'abord (20-25ème jour) composé de cellules indifférenciées arrangées en couches à peu près parallèles - (Fig. 81), qui étaient pour la plupart des amoébocytes. Ceux-ci, après s'être divisés, expriment une nouvelle potentialité en se différenciant en fibrocytes et en synthétisant du collagène. (Fig. 85 et 86).

### b) Les chromatophores et les iridophores

On décèle les chromatophores par la présence de pigment. Vers le 20ème jour, une cellule se différencie dans le derme en formation, près de l'épiderme (Fig. 83). Le cytoplasme se divise en plasmés

Figure 85 : (Gt 14 300)

Image d'un fibrocyte d'un régénérat de 27 jours. Le noyau ( $N_f$ ) est granuleux. Il possède un gros nucléole (n). Le réticulum endoplasmique ( $\blacktriangle$ ) est très développé. Cette cellule semble responsable de la synthèse de collagène(coll). Des myofilaments commencent à être visibles dans les myoblastes (m).

Figure 86 : (Gt 48 400)

Détail de la figure 85. On notera les énormes cavités du réticulum (cav. rét. end). Le collagène (coll) possède une striation périodique.

( $N_f$  : noyau du fibrocyte, r : ribosomes).

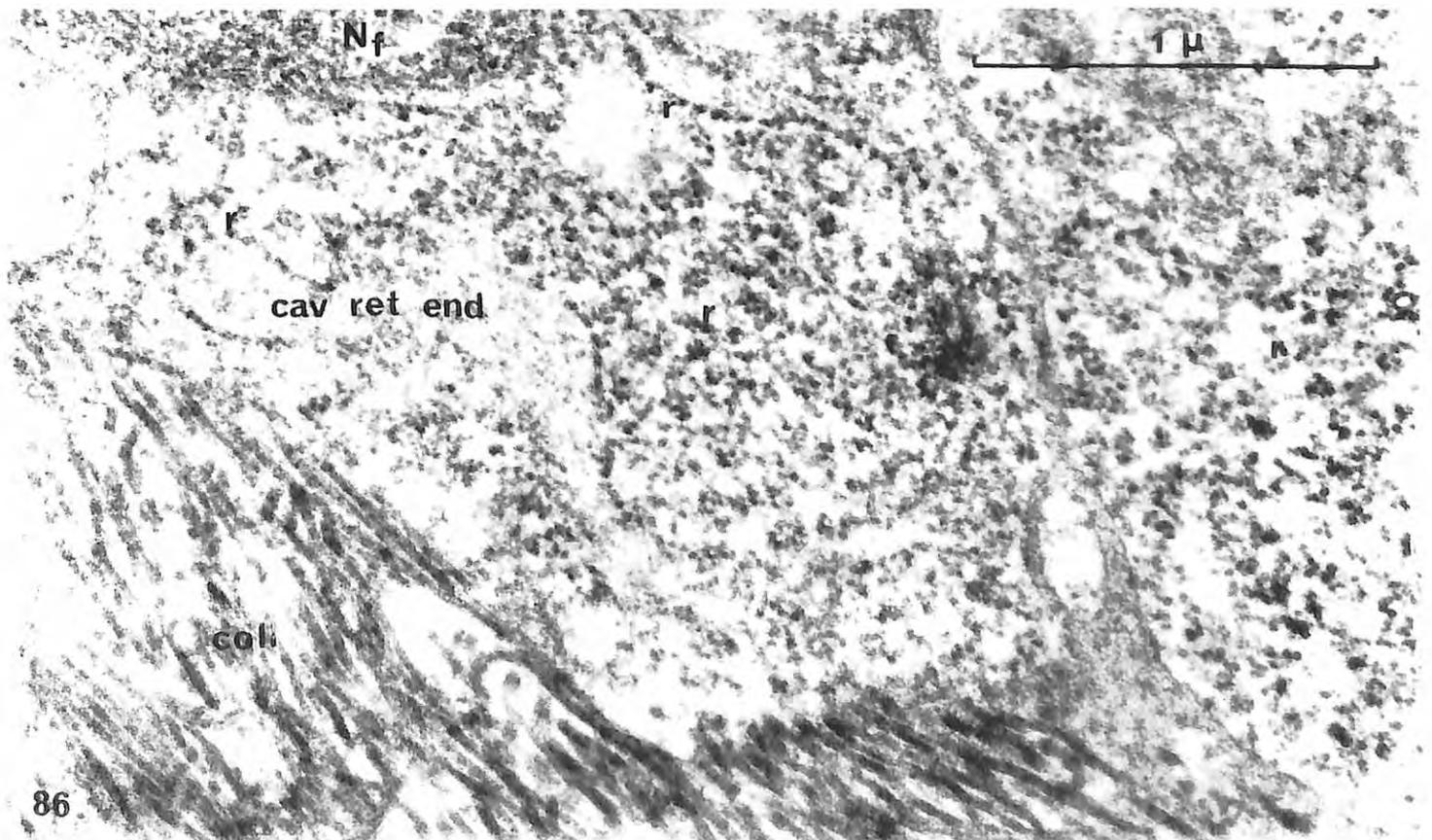
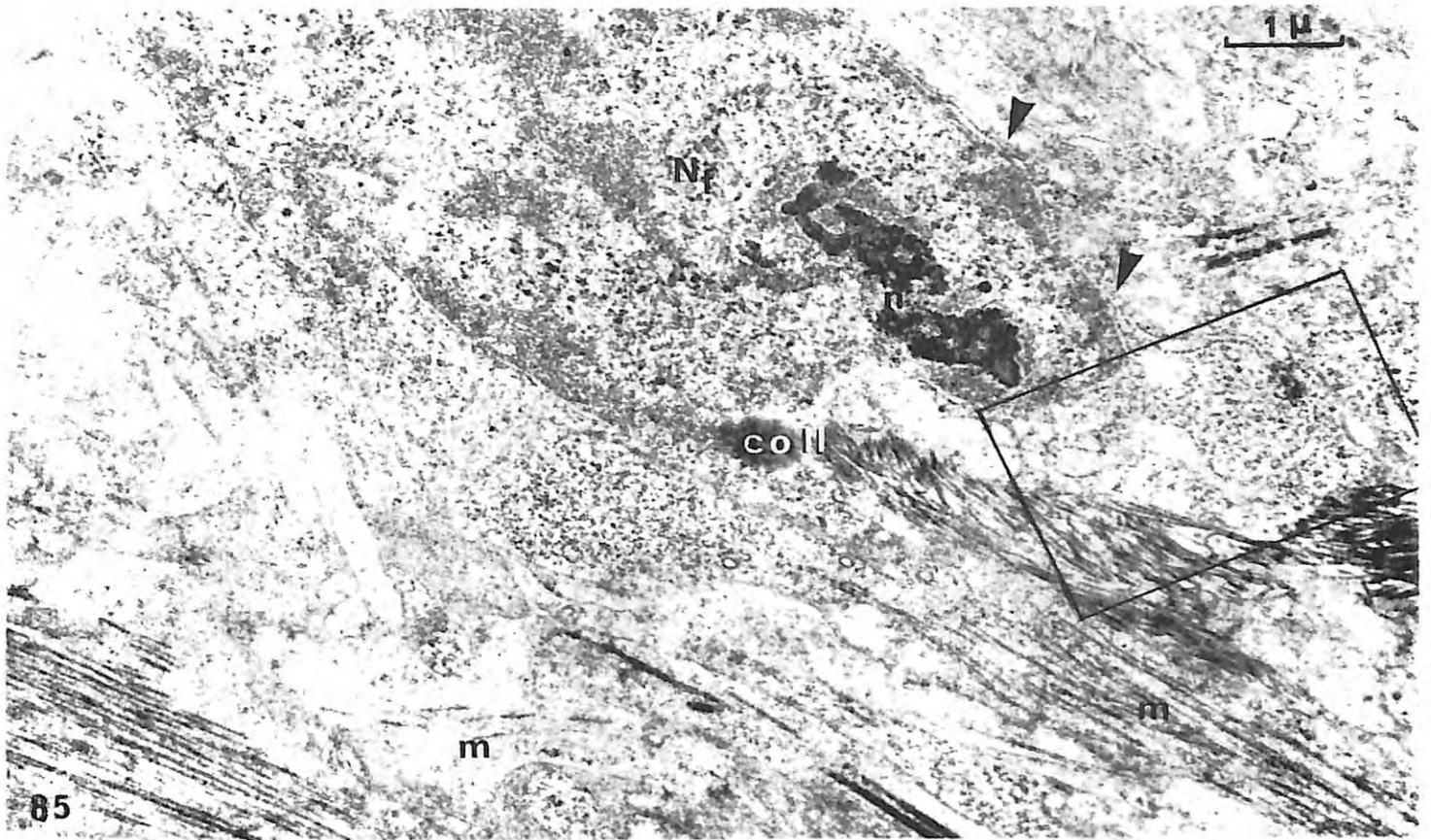


Figure 87 : (BOUIN/P A S)

Après 40 jours de régénération, les tissus sont bien individualisés. La musculature transversale s'est développée entre la musculature longitudinale et l'axe nerveux.

On note sur ce cliché une mitose au niveau de la couche cellulaire.

Figure 88 : (BOUIN/Bleu alcian - Hématoxyline)

Même stade que précédemment. La musculature transversale s'épaissit par prolifération de myoblaste (▼).

Figure 89 : (BOUIN/P A S)

Détail de la figure 87, montrant la division d'un neuroblaste de la couche cellulaire. Les noyaux des autres cellules de cette couche sont activés. On peut les distinguer de ceux des cellules gliales (g)

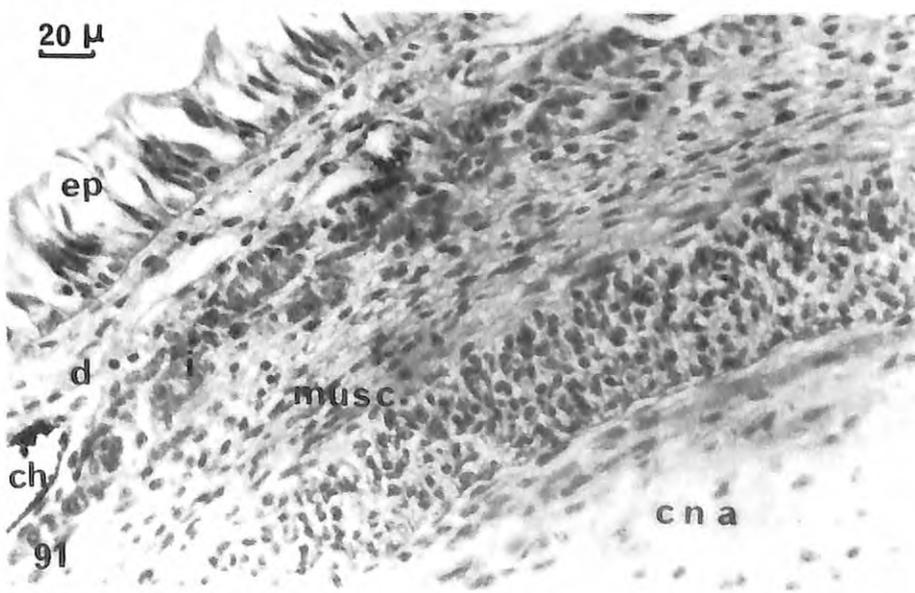
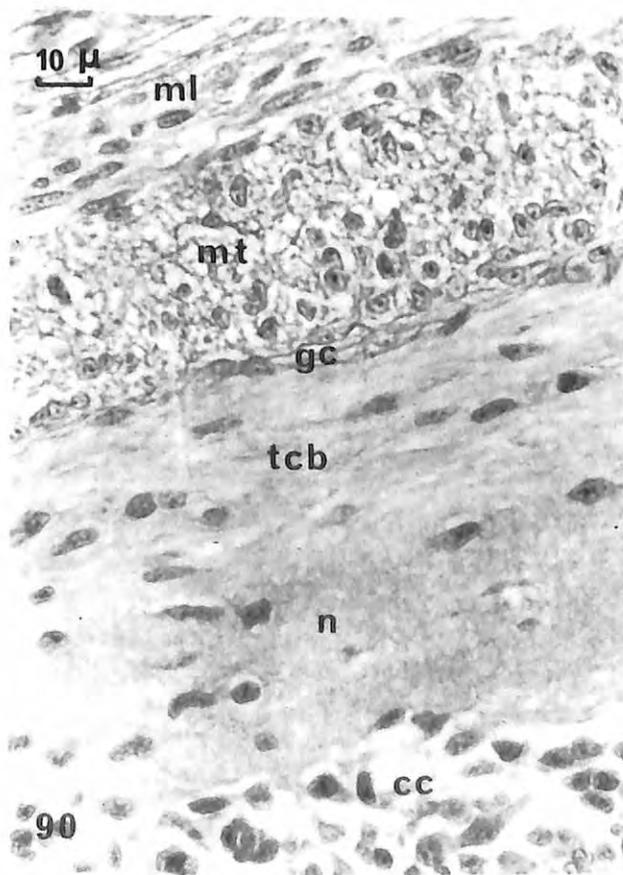
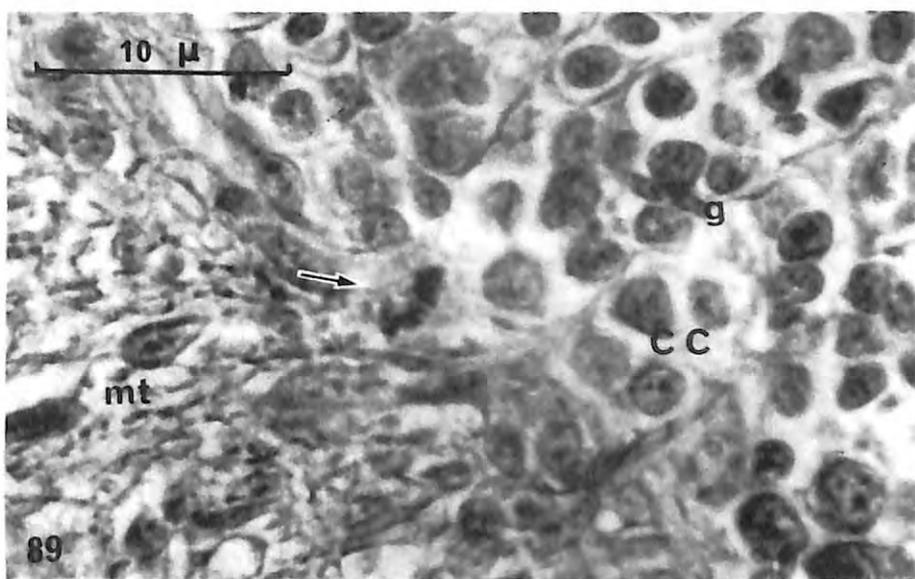
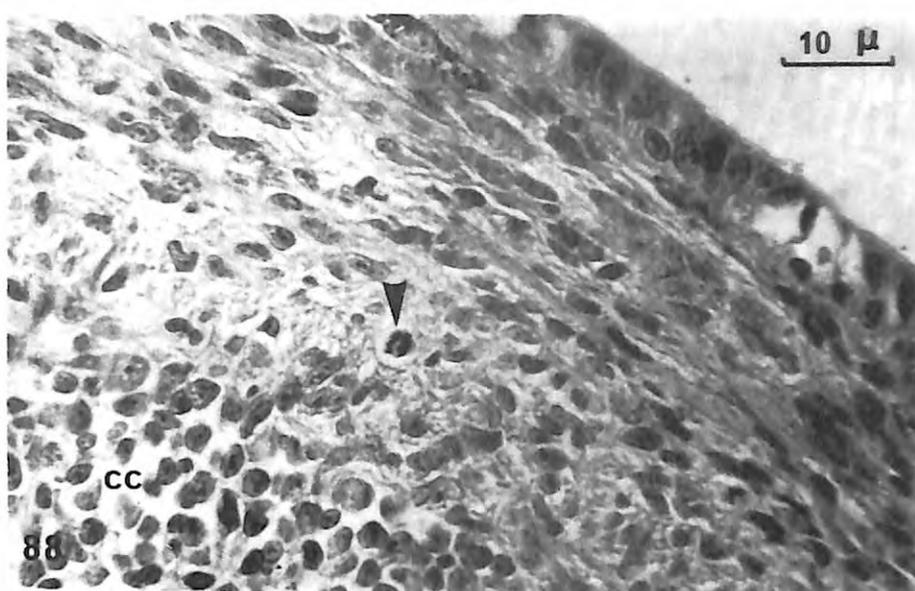
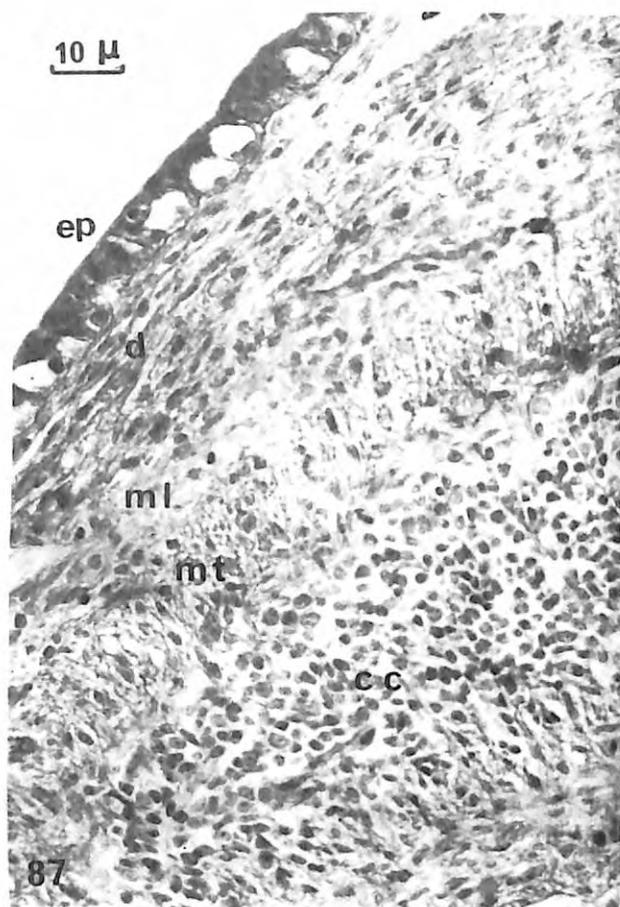
Figure 90 : (BOUIN/Bleu alcian)

Après 60 jours, les divisions cellulaires sont plus rares. Le bras a un aspect cytologique quasi normal.

Figure 91 : (BOUIN/Coloration de VAN GIENSON)

Après 4 mois, le régénérat est mobile depuis quelques semaines. Sa structure est comparable à celle d'un bras normal. (voir figure 13)

(cc : couche cellulaire, ch : chromatophore, cna : cordon nerveux axial, d : derme, ep : épiderme, g : cellule gliale, gc : gaine conjonctive, i : iridophore, ml : musculature longitudinale, mt : musculature transversale, musc : musculature, n : neuropile, tcb : tractus cérébro-brachial).



externe et interne. Ce dernier contient les grains de pigment. Le 1er type de cellule à apparaître, est le chromatophore jaune.

Les iridophores apparaissent plus tard (25ème-27ème jour) assez brusquement. Leur structure est définitive, dès qu'ils deviennent visibles. Au début, ils présentent de nombreuses orientations puis ils prennent une position plus fonctionnelle.

Pour les deux organes, les fibres radiales se différencient sur place, au moment de leur propre formation. L'innervation est plus tardive. Il faudra attendre près de 3 mois.

### 3 - Le système musculaire

#### a) Les musculatures intrinsèque et extrinsèque

Des éléments fusiformes sont disposés en ligne, parallèlement à l'axe (Fig. 84). Ils évoluent en myoblastes. Ils apparaissent dans la région correspondant au muscle dégénéré, ils progressent distalement. La plupart proviennent sûrement d'anciens éléments musculaires qui se sont divisés, puis redifférenciés.

Vers le 20ème jour, on commence à reconnaître les premières fibres de la musculature longitudinale intrinsèque (Fig. 82). La gaine de collagène qui la limite à l'extérieur progresse à peu près à la même vitesse. La musculature longitudinale extrinsèque apparaît légèrement en retard ; avant la musculature transversale (Fig. 87). La musculature longitudinale s'éloigne peu à peu du cordon nerveux et laisse place à la musculature transversale qui n'occupe d'abord qu'une faible épaisseur. Elle est encore formée de myoblastes, alors que les cellules longitudinales du même niveau, possèdent leurs fibres. Au 2ème mois, cette couche musculaire s'épaissit encore en se divisant (Fig. 88). Puis la disposition des éléments du bras est normale (Fig. 90 et 91).

#### b) La musculature acétabulaire

La musculature des ventouses est formée par prolifération des faisceaux centraux. Les bourgeons sont isolés par du tissu conjonctif. Au cours de l'invagination qui va former sa cavité, les cellules musculaires s'arrangent d'abord en une couche, puis en deux couches parallèles. Elles donneront les muscles radiaux et les sphincters. (Fig. 92 à 97 ).

Il faut environ 2 mois pour avoir une ventouse complète, fonctionnelle, c'est-à-dire innervée. La ventouse est formée avant d'être innervée. La différenciation est centrifuge. Elle commence sur le moignon et progresse vers l'extrémité. Après 4 mois, la ventouse la plus avancée est 3 fois plus petite qu'elle ne devrait l'être, mais elle est parfaite (Fig. 97).

La musculature acétabulo-brachiale se différencie à peu près au même moment que la ventouse. Elle semble d'abord isolée, puis le raccordement à l'axe musculaire médian est visible, de même que la progression dans le pédoncule quand celui-ci se forme.

La formation des lames latérales n'a pas été suivie.

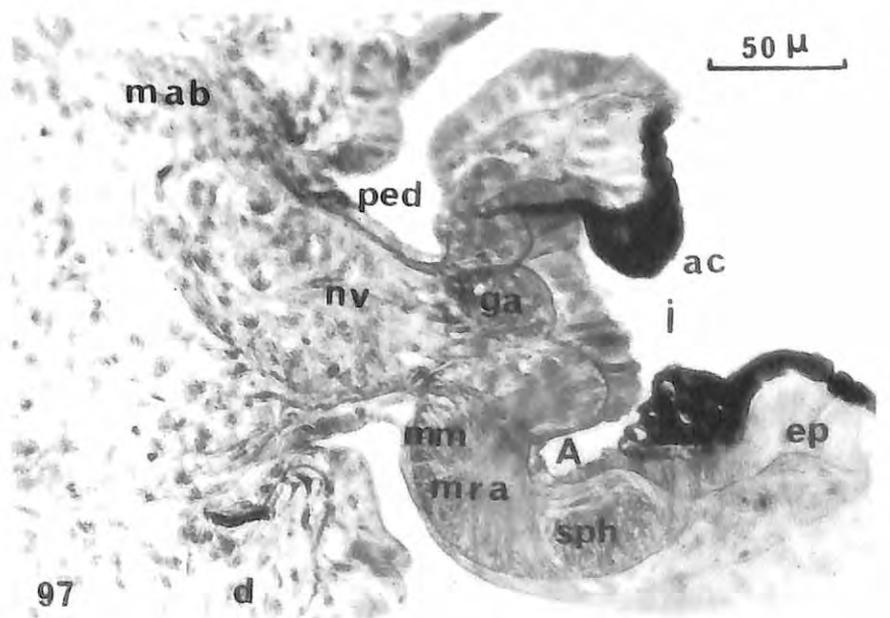
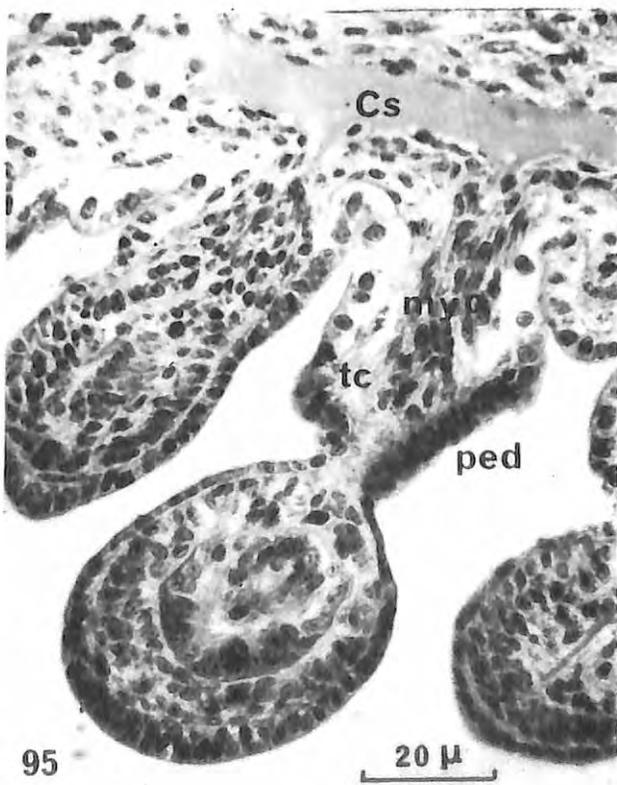
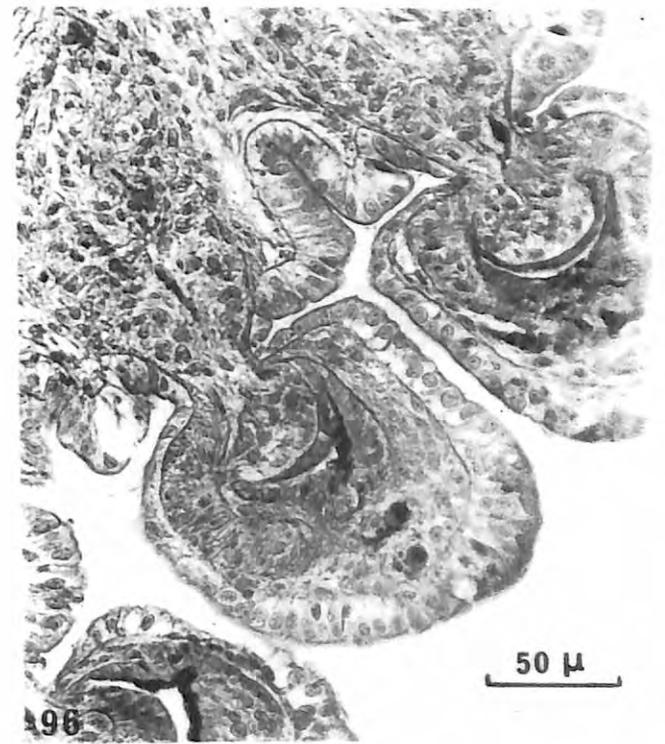
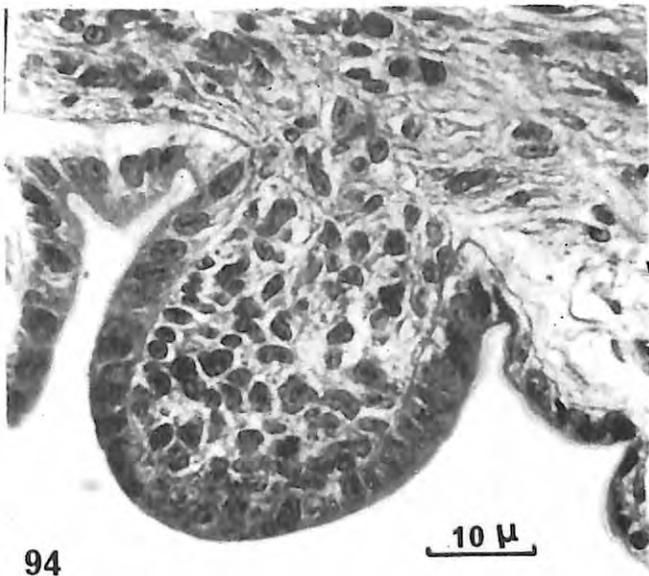
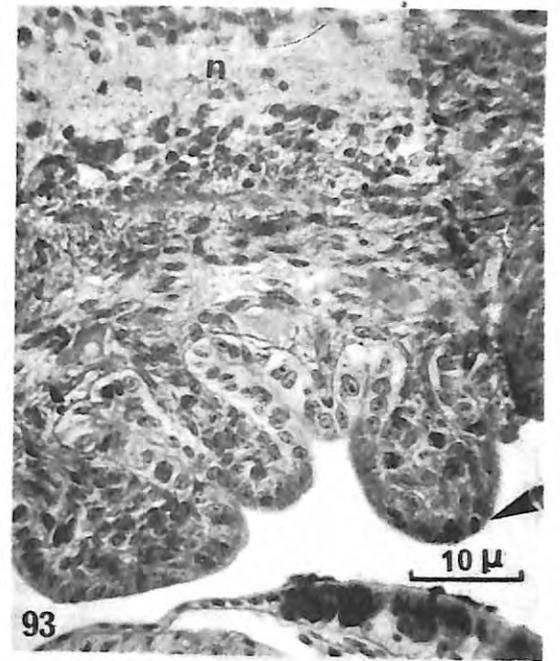
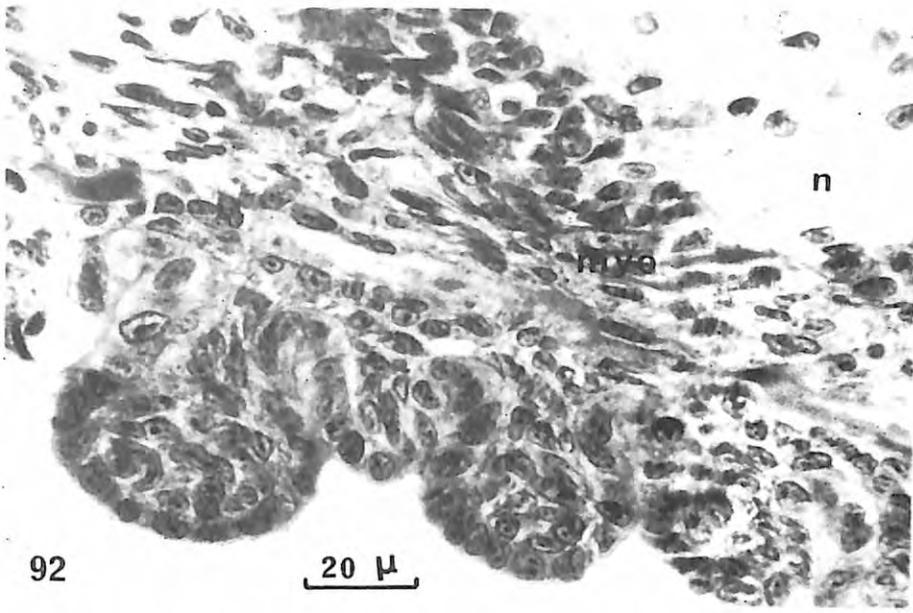
#### 4 - Le système nerveux et la névroglie

Le régénérat s'organise autour du tissu nerveux. Le cordon nerveux axial y apparaît tout de suite différencié en tractus cérébro-brachial, couche cellulaire et neuropile. Il est accompagné de l'artère brachiale (Fig. 98) et de muscles épineuraux qui sont déjà très différenciés (Fig. 101).

La croissance débute par les fibres du tractus cérébro-brachial. Leurs terminaisons progressent à l'intérieur du blastème. La couche cellulaire progresse assez vite aussi. L'axe nerveux ainsi reconstitué est nettement séparé du reste du blastème par une gaine contenant du collagène. (Fig. 81). Les cellules nerveuses ont sans doute pour origine des neurones émigrés dans le blastème au moment de la dégénérescence. Dédifférenciés, ils se divisent pour former une nouvelle couche cellulaire (Fig. 82 et 89).

### Différenciation des ventouses du bras de *Sepia officinalis*

La différenciation des ventouses est centrifuge. Elle est contemporaine de l'irrigation (Fig. 92). Elles se forment par prolifération et migration de myoblastes qui s'arrangent en une, (Fig. 92) puis, plusieurs couches (Fig. 93 et 94). L'épiderme se divise (Fig. 93) et s'invagine pour former l'acetabulum et l'infundibulum (Fig. 95). Le pédoncule apparaît (Fig. 95 - 96). Les ventouses continuent de se différencier, acquièrent leur musculature spécifique, leur anneau corné. Elles sont innervées secondairement et deviennent fonctionnelles (Fig. 97) bien que restant toujours plus petites qu'elles ne devraient l'être.



Le neuropile est formé par les fibres émises par les ganglions et le tractus. Il est pratiquement inexistant à l'extrémité du cordon nerveux en train de régénérer. Il gagne en épaisseur au fur et à mesure de la croissance.

Le tissu hétérogène et indifférencié qui constitue le régénérat jusqu'au 20ème jour, est repoussé à la périphérie par la progression de l'axe nerveux. (Fig. 98).

Les cellules gliales soutiennent les fibres nerveuses en train de régénérer. Il s'agit surtout de glie fibreuse. Ces cellules sont très développées et contiennent des mitochondries très grosses qui semblent se diviser (Fig. 99 et 100). La névroglie suit la progression du nerf, Les cellules qui la composent se divisent dès le 20ème jour (Fig. 81). Les cordons périphériques se développent plus tard, quand la musculature brachiale est plus avancée.

Les nerfs des chromatophores et des iridophores, sont émis vers le 20ème jour. La connection se fait environ le 2ème mois, quand ces organes sont eux-mêmes différenciés. Il en est de même pour les ventouses ; les premières, sur le moignon, commencent à être innervées vers le 40ème jour.

Organes chromatophores et iridophores d'une part, et ventouses d'autre part, sont innervés secondairement après leur différenciation. Les nerfs peauciers sont également émis durant la progression (Fig.98).

Nous n'avons pas observé la formation des voies sensibles. Elle doit être tardive et n'intervenir que vers le 3ème mois, quand le régénérat est mobile.

##### 5 - Le système sanguin

L'irrigation du blastème est permanente à partir du moment où il prolifère. Le sang baigne les cellules directement. Il n'y a d'abord pas de vaisseaux visibles, mais très tôt, on peut observer la veine brachiale. La différenciation se fait en même temps que celle des ventouses. Elle commence vers le 20ème jour (Fig. 92). L'artère brachiale suit la progression de l'axe nerveux. Le tissu conjonctif est rapidement envahi par des capillaires (Fig. 98).

Figure 98 : (Glutaraldhyde 3% - acide osmique/bleu de toluidine, 0,5  $\mu$ )

Coupe parasagittale d'un régénérat de 27 jours montrant la progression de l'axe nerveux (CNA) dans le blastème en train de se différencier. Les cellules épidermiques sont encore activées. Sur la face apicale, il y a des microvillosités, une membrane base (mb) limite l'autre face des cellules. Les constituants du bras sont en place, les fibres du tractus cérébro-brachial (tcb) sont guidées par les cellules gliales dont on voit le noyau (Ng). Il émet des nerfs (n et np). Les ganglions (gg) formant la couche cellulaire et l'artère brachiale (ab), avancent dans le blastème de la même manière. Les myoblastes (my b) édifient les musculatures longitudinale (ml) et transversale (mt). Le derme (d) est formé de fibrocytes (f) qui évoluent à partir de fibroblaste (fb). Le blastème est irrigué par des capillaires (cv).

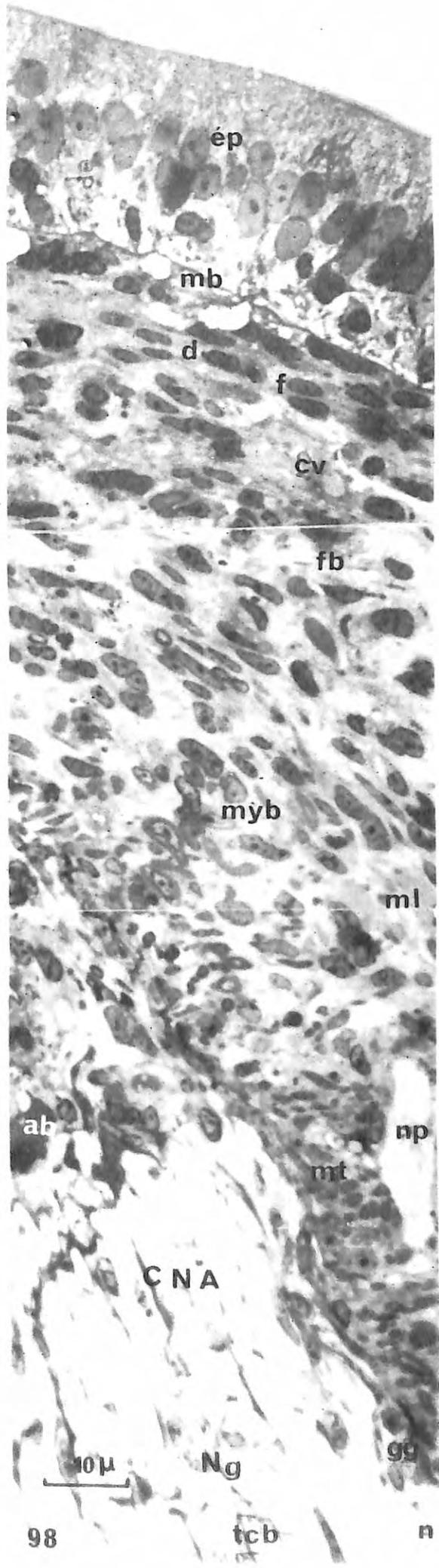


Figure 99 : Gt 16 720

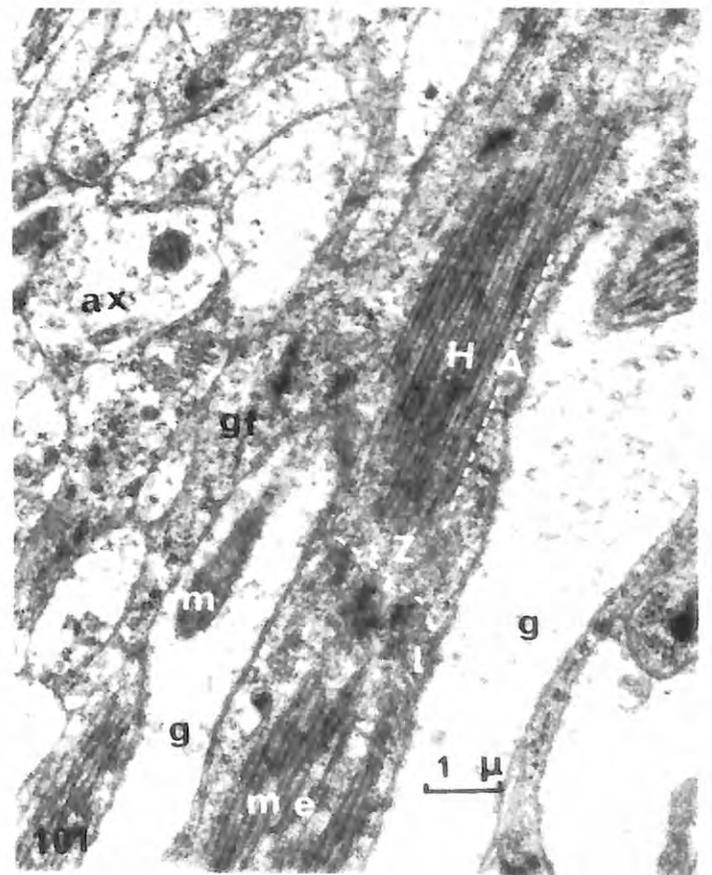
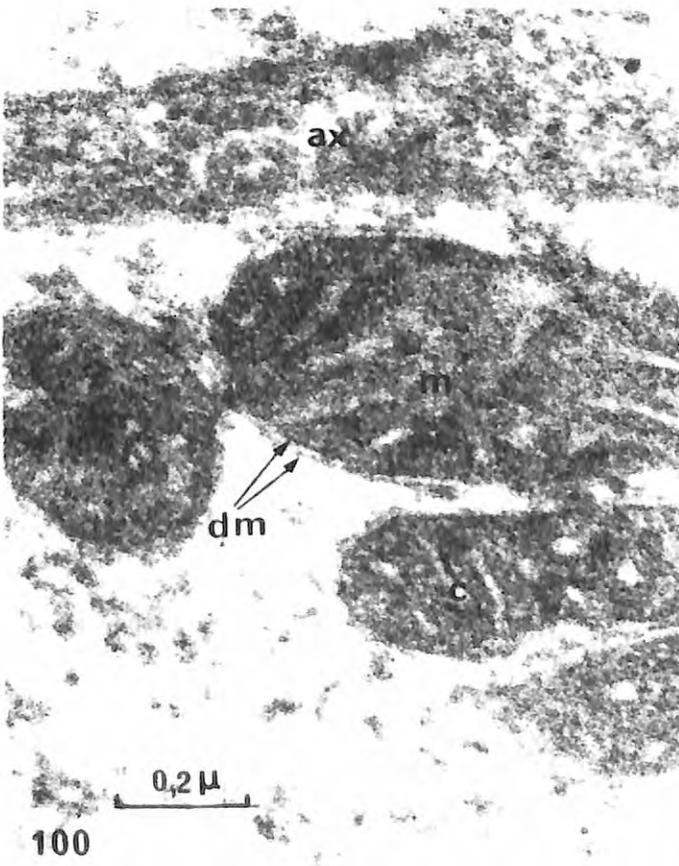
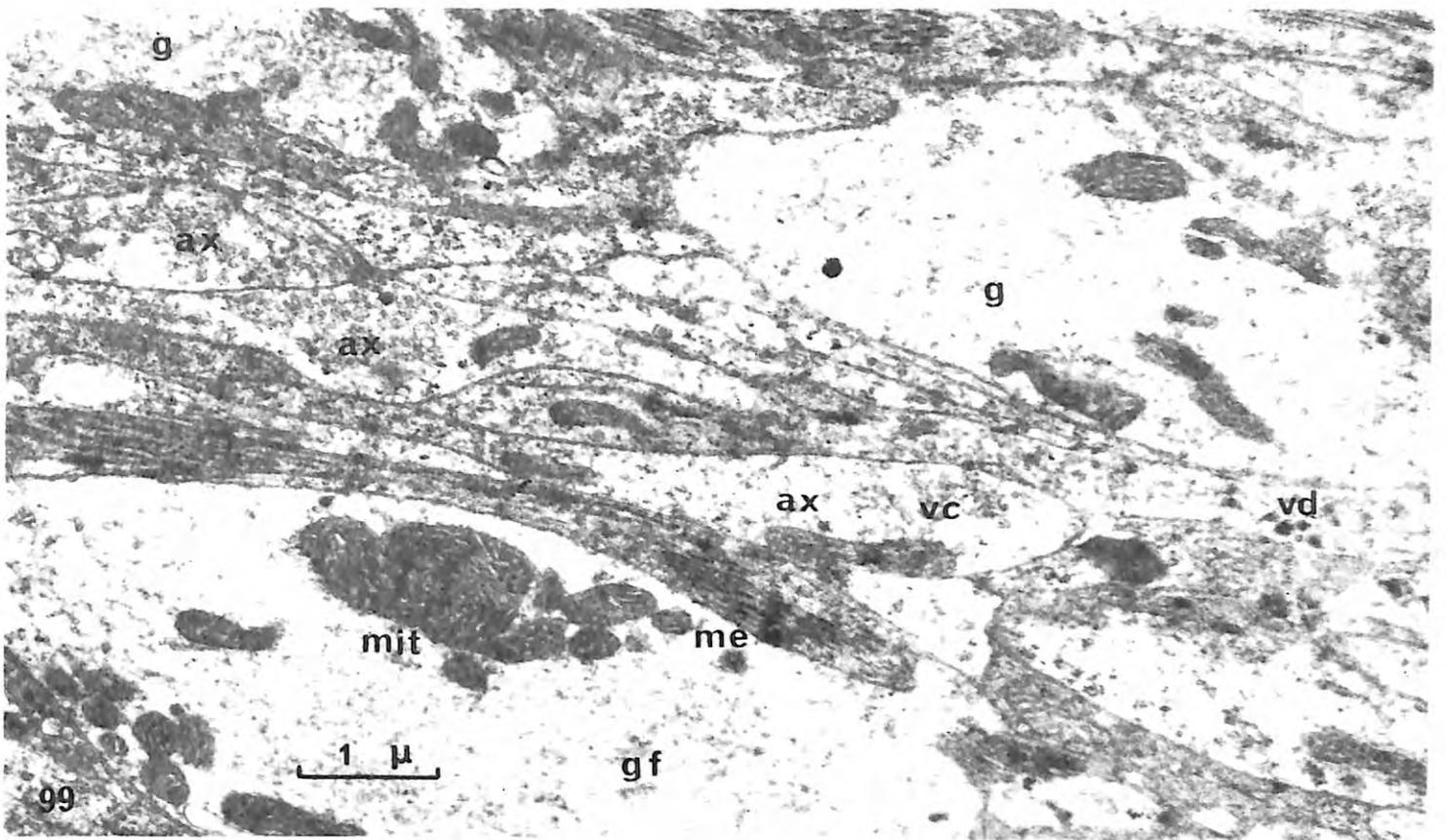
Tractus cérébro-brachial pénétrant dans un régénérat de 1 mois. Les axones (ax) contiennent 2 types de vésicules, claires (v c) et denses (v d) de 300 A et 900 A environ de diamètre. Les fibres nerveuses sont entourées de glie fibreuse (gf) contenant d'énormes mitochondries (mit). Une musculature épineurale (m é) bien différenciée se développe en même temps que les nerfs progressent.

Figure 100 : Gt 77 000

Mitochondries des cellules gliales. Elles ont des crêtes (c) nettes et une matrice (m) sombre. Elles sont limitées par une double membrane (dm).  
(ax : axone).

Figure 101 : Gt 9 100

Détail de la musculature épineurale.



Nous n'avons pas suivi de près la régénération proprement dite des vaisseaux sanguins. Ils peuvent être le résultat de la prolifération distale de l'endothélium ou bien des péricytes.

Le bras régénère en utilisant des éléments histologiques plus ou moins dégradés (morphallaxie). Chaque type cellulaire semble redonner des cellules du même type, à l'exception du tissu conjonctif dont la majeure partie est formée à partir d'amœbocytes.

On peut résumer les événements de la manière suivante :

A 16°C, la cicatrisation et la dégénérescence ont lieu du jour zéro au 5ème jour. Le blastème se forme jusqu'au 10ème jour (stade demi-sphère). Puis, il y a prolifération de l'épiderme et du blastème quand le nerf commence à croître (stade cône). La différenciation débute dans la 3ème semaine en même temps que l'irrigation. Elle commence par l'invagination des ventouses sur la face orale (stade 4) et la formation des chromatophores. Il faut noter qu'ils se différencient avant d'être visibles de l'extérieur. Le stade 6 correspond à l'innervation des tissus, qui a lieu vers le 3ème mois.

Donc 3 phases :

- Cicatrisation et dédifférenciation.
- Formation d'un blastème et croissance.
- Différenciation et morphogénèse.

### III - VARIATIONS DE LA TENEUR EN COLLAGENE DU BRAS ET DES PROTEINES SERIQUES AU COURS DE LA CICATRISATION ET DE LA REGENERATION

#### A - Dosage du collagène (Fraction TCA chaud soluble)

##### 1 - Expérience à 14°C

Comme l'a montré l'étude histologique, le collagène est une protéine de structure importante dans les tissus de *Sepia officinalis*. De plus, il a un rôle essentiel dans la cicatrisation. Nous avons vu qu'une sorte de bouchon se forme au niveau du derme dès le 1er jour après l'amputation. Nous avons dosé le collagène par la méthode de LOWRY (1951) après l'avoir isolé. Les résultats, ramenés à l'unité de poids frais, sont consignés dans le tableau 4 et la figure 102.

Pour le bras opéré, le taux de collagène augmente le 1er jour pour atteindre un maximum le 2ème jour. Cette période correspond au début de la cicatrisation. Le pic est significatif au coefficient de sécurité de 99% (voir note page 107).

Le bras symétrique, non amputé, est pris comme point de comparaison. On voit apparaître un "puits" significatif dans la courbe de dosage. Cette chute de la teneur en collagène se produit également au début de la cicatrisation.

Les deux courbes évoluent ensuite sensiblement de la même manière. Il y a une nette remontée au moment de la croissance du blastème de régénération. (fin de la 2ème semaine).

##### 2 - Expérience à 10°C

Nous n'avons retenu que les résultats portant sur les premiers jours, car il restait moins de 3 animaux dans les lots concernant la période allant de la fin de la 1ère semaine jusqu'à la fin de la 2ème semaine. (Tableau 5).

Il est tout de même intéressant de comparer les résultats avec ceux de l'expérience faite à 14°C. (Fig. 103). On voit que, dans les bras opérés et non opérés des animaux élevés à 10°C, les variations du taux de

Nombre de jours après l'opération	Nombre d'animaux par lot	BRAS OPERES				BRAS NON OPERES			
		Poids des bras (mg)	Collagène ug/mg P.F.	<sup>14</sup> C pro.Collagène cpm/mg P.F.	<sup>14</sup> C pro.protéines cpm/mg P.F.	Poids des bras (mg)	Collagène ug/mg P.F.	<sup>14</sup> C pro.Collagène cpm/mg P.F.	<sup>14</sup> C pro.protéines cpm/mg P.F.
0	9	117	13,3	154	557	161	13,3	107	579
1	5	94	15,6	242	1077	125	8,5	134	1170
2	6	85	21,7	322	1386	117	9,1	173	1128
3	9	187	17,3	201	560	243	14,3	72	486
6	9	163	15,3	138	1076	244	12,3	123	1076
10	7	235	11,8	105	642	298	11,2	56	485
17	9	42	18,4	297	1533	61	19,4	237	1728
23	5	87	15	89	646	140	18,5	103	933

TABLEAU 4 : Résultats des dosages et des comptages des fractions TCA chaud soluble et TCA chaud insoluble dans l'expérience à 14°C.

$\mu\text{g}/\text{mg PF}$

Fraction TCA chaud soluble

$\text{cpm}/\text{mg PF}$

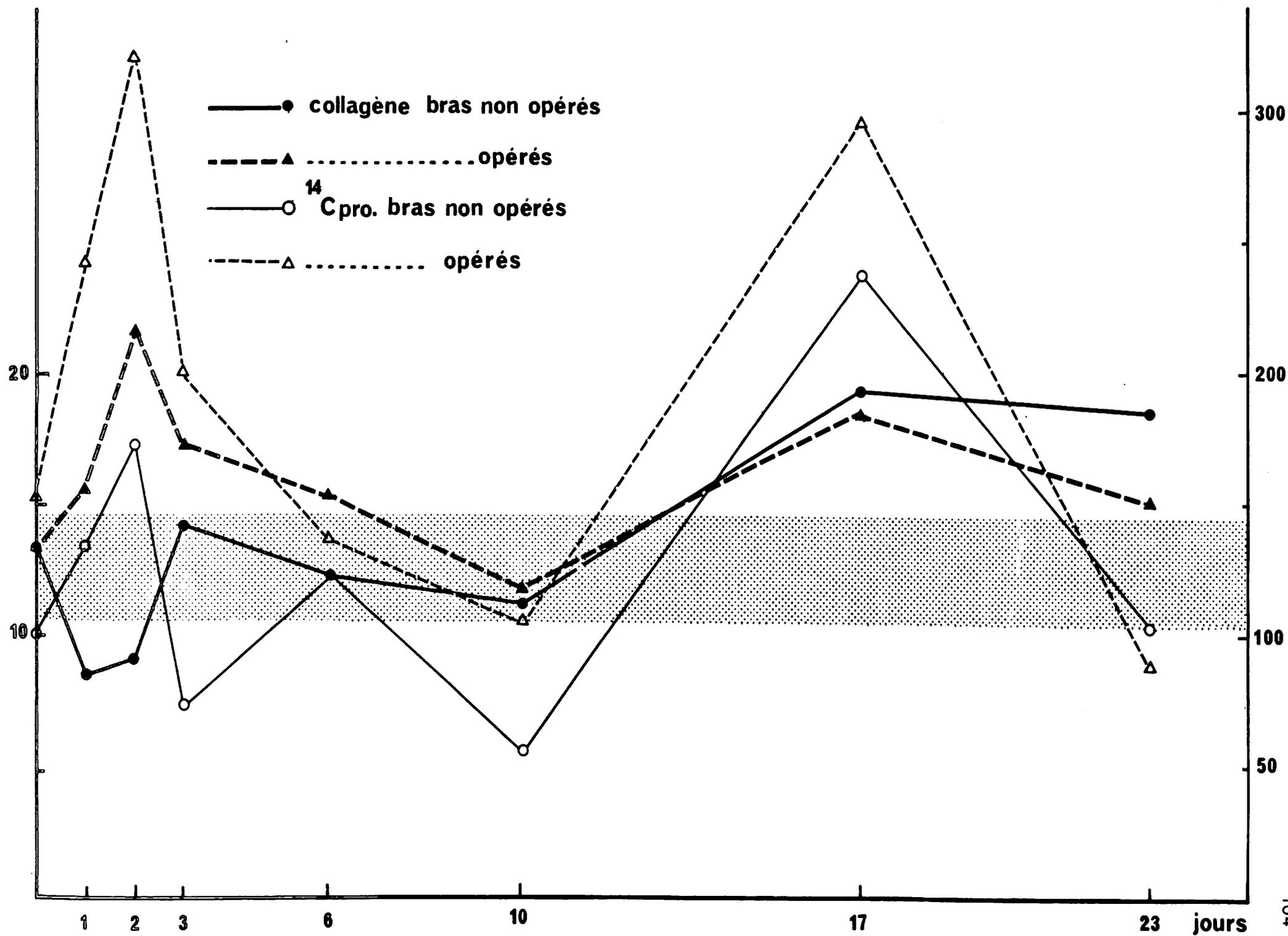


figure 102

Nombre de jours après l'opération	Nombre d'animaux par lot	BRAS OPERES		BRAS NON OPERES	
		Poids des bras (mg)	Collagène ug/mg P.F.	Poids des bras (mg)	Collagène ug/mg P.F.
0	3	52	12,7	73	10,6
1	3	54	13,2	56	10,2
2	3	46	12,2	68	14,1
3	3	90	10,2	130	9,9 (?)

TABLEAU 5 : Résultats des dosages de collagène extrait des bras d'animaux élevés à 10°C.

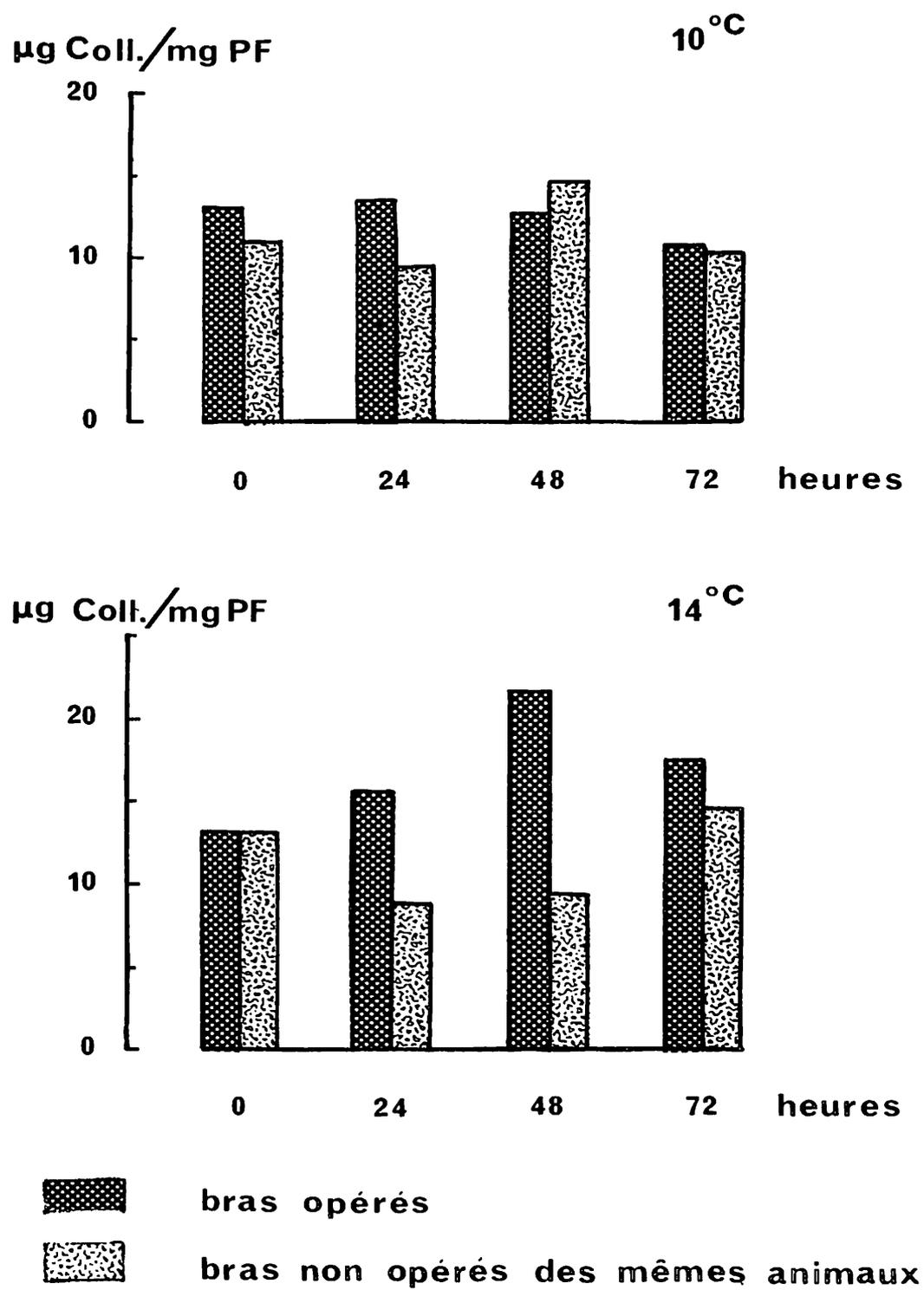


figure 103

collagène sont moins importantes que celles que l'on peut observer chez les animaux élevés à 14°C, et que les différences pour un même stade ne sont jamais aussi élevées.

Note : Pour évaluer dans quelle mesure les différences trouvées au cours des dosages de collagène sont significatives, nous avons pris les valeurs de la teneur en collagène (fraction TCA chaud soluble) des bras témoins de tous les dosages effectués. Nous avons pu faire la moyenne de 12 valeurs:

µg/mg P F	8,3	10,6	12,6	12,7	15,5	13	14,4	15,4	12,9	13,5	10,6	10,1
-----------	-----	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------

$$n = 12$$

$$\bar{x} = 12,5 \text{ µg de collagène/mg de poids frais}$$

La variance, qui représente les écarts à la moyenne est :

$$\text{var} = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1} = 4,8$$

L'échantillon étant petit, on n'a que 11 degrés de liberté.

$$\text{L'écart type est : } \sigma = \sqrt{\text{var}} = 2,2$$

$$\text{L'écart standard à la moyenne est } S_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} = 0,67$$

La table du paramètre t de Student donne :

$$t_{0,01} = 3,11 \text{ pour 11 degrés de liberté.}$$

L'intervalle de confiance sera :

$$\bar{x} \pm (t_{0,01} \cdot S_m) = 12,5 \pm (3,11 \times 0,67) = 12,5 \pm 2,1$$

au coefficient de 99% de sécurité.

Le bras contient de 10,4 à 14,6 µg de collagène par mg de poids frais. (bande en pointillé sur la figure 102).

## B - Comptage en scintillation liquide

Nous avons mesuré la radioactivité liée à la  $^{14}\text{C}$ -proline dans les fractions TCA chaud soluble (collagène) et TCA chaud insoluble (les autres protéines). Nous n'avons retenu que les extraits des expériences à  $14^\circ\text{C}$ . Celles à  $10^\circ\text{C}$  ont donné des résultats non significatifs. Le taux de comptage était inférieur au bruit de fond (appareil + mélange scintillant).

### 1 - La radioactivité liée au collagène (Fig. 102)

Dans le cas des bras opérés, on observe 2 pics qui correspondent à ceux des dosages. L'augmentation de l'incorporation de  $^{14}\text{C}$ -proline par cette fraction semble indiquer 2 périodes de synthèse accrues de collagène, au moment de la cicatrisation et au début de la croissance du blastème.

En ce qui concerne les bras symétriques, pris en référence, on voit une augmentation de l'incorporation de proline qui semble en rapport avec la remontée à un taux de collagène normal au 3ème jour. Un pic, le 6ème jour, semble sans rapport avec une variation du collagène. Par contre, on retrouve un pic à la fin de la 2ème semaine, analogue à celui des bras opérés. Le phénomène de synthèse à ce moment-là semble intervenir au niveau de tout l'organisme.

### 2 - La radioactivité liée aux autres protéines (Fig. 104)

Elle est beaucoup plus élevée (environ 5 à 6 fois). Il faut remarquer qu'au moment du 1er pic (1 à 2 jours), la radioactivité  $^{14}\text{C}$ -proline liée aux protéines des bras opérés atteint des valeurs plus élevées que dans les bras non opérés. Il est possible que des synthèses de protéines (enzymes) spéciales aient lieu dans les bras amputés.

Ensuite la radioactivité des 2 fractions varie de manière semblable. On repère un 2ème pic à la fin de la cicatrisation, au moment de la période d'activation. Un 3ème pic correspond à la croissance du blastème. A nouveau, les phénomènes de synthèse concernent tout l'organisme.

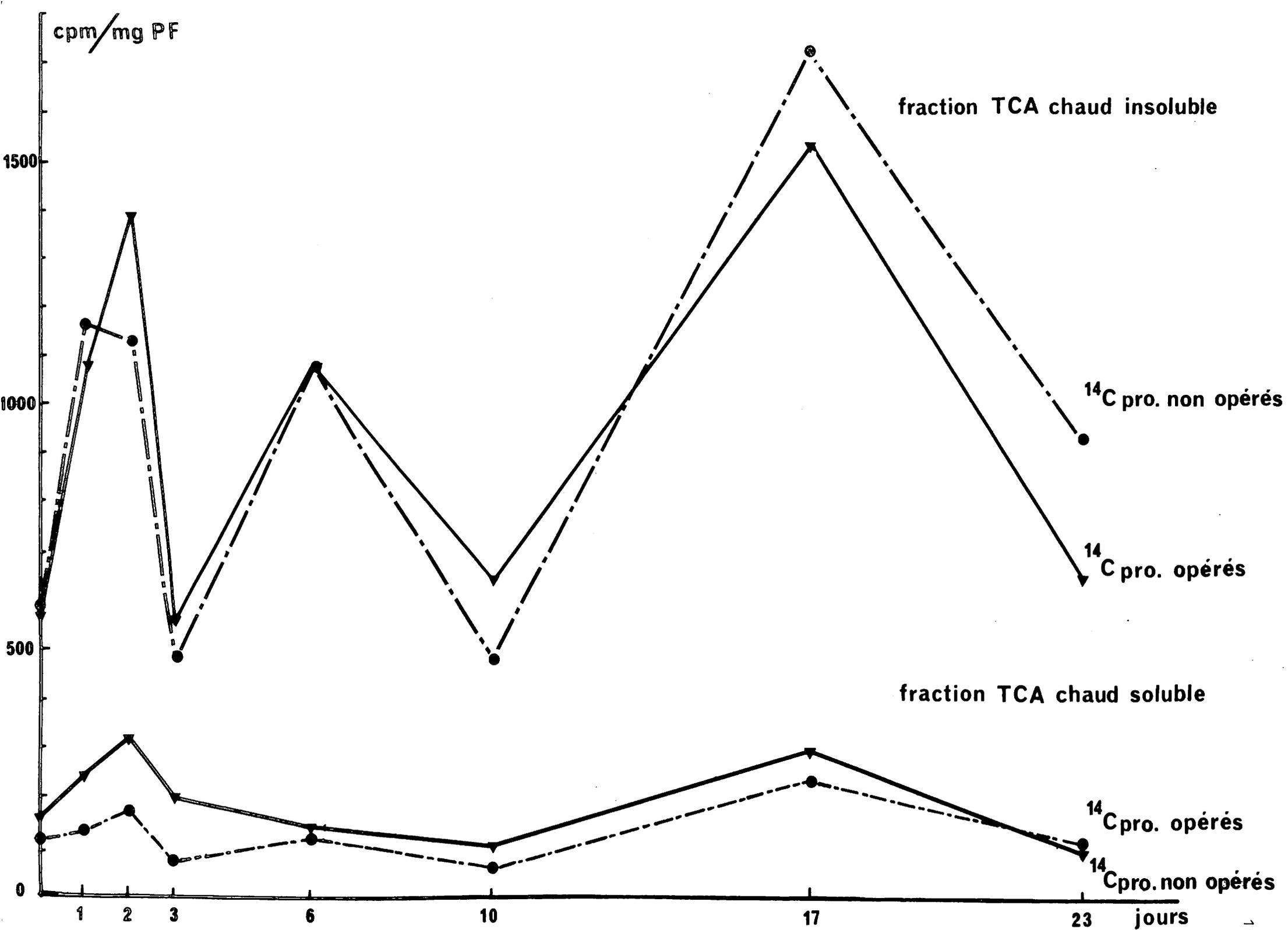


figure 104

### C - Electrophorèses du sang de *Sepia officinalis*

Nous avons d'abord dû mettre la technique au point. L'utilisation de gel de polyacrylamide à 7% n'a pas donné une séparation convenable des fractions les plus lentes. (Fig. 105), 90 à 95% des protéines sériques sont représentés par des chaînes d'hémocyanine. Celle-ci est mise en évidence par ses réactions positives au Schiff et à l'acide rubéanique (Fig. 105), qui indiquent la présence de glucides et de cuivre dans cette molécule. Il est à remarquer qu'il existe une autre glycoprotéine, non cuprique, plus lourde que l'hémocyanine.

La technique au S D S a donné une meilleure séparation (Fig. 106), Mais l'énorme quantité d'hémocyanine empêche encore de bien distinguer les fractions lentes. On voit que les fractions rapides sont beaucoup mieux individualisées.

La meilleure technique de séparation s'est révélée être celle sur gel à gradient de polyacrylamide. Nous avons essayé les gels à 4 - 30% et 2 - 16%. Le second espace mieux les bandes. On a l'apparition de 2 nouvelles fractions (Fig. 108).

Grâce au gel à 4 - 30%, nous avons pu estimer le poids moléculaire de ces protéines les plus lourdes (exclusion 2 000 000 - 50 000), en utilisant la courbe étalon de la figure 109. Ces protéines standards ont migré dans le même gel (Lot BL 6471 Pharmacia). Le tableau 6 donne les valeurs de ces poids moléculaires.

Au pH de 7,2, l'hémocyanine est présente sous forme d'agrégats de p.m. allant de 660 000 à 370 000 environ.

La figure 107 montre l'électrophorèse de deux sérums d'animaux en train de régénérer (1 et 2) comparés à ceux de femelles immatures non opérées (3 et 4).

Une bande (n° 2) n'existe plus chez les animaux en régénération. Par contre, la bande n° 4 est nettement plus intense. Ces résultats concernent des animaux adultes déjà en état de régénération avancée et leurs protéines sériques les plus lourdes ( 50 000 daltons).



Figure 105 : Disc électrophorèse de sang de *Sepia* sur gel de polyacrylamide 7%

- 1 - Coloration des protéines totales (bleu de coomassie G 250)
- 2 - Coloration des glycoprotéines rouge ◀
- 3 - Coloration des cuproprotéines (vert bouteille) remarquer la coloration secondaire jaune ◀



Figure 106 :: Disc électrophorèse de sang de *Sepia* en gel de S D S polyacrylamide

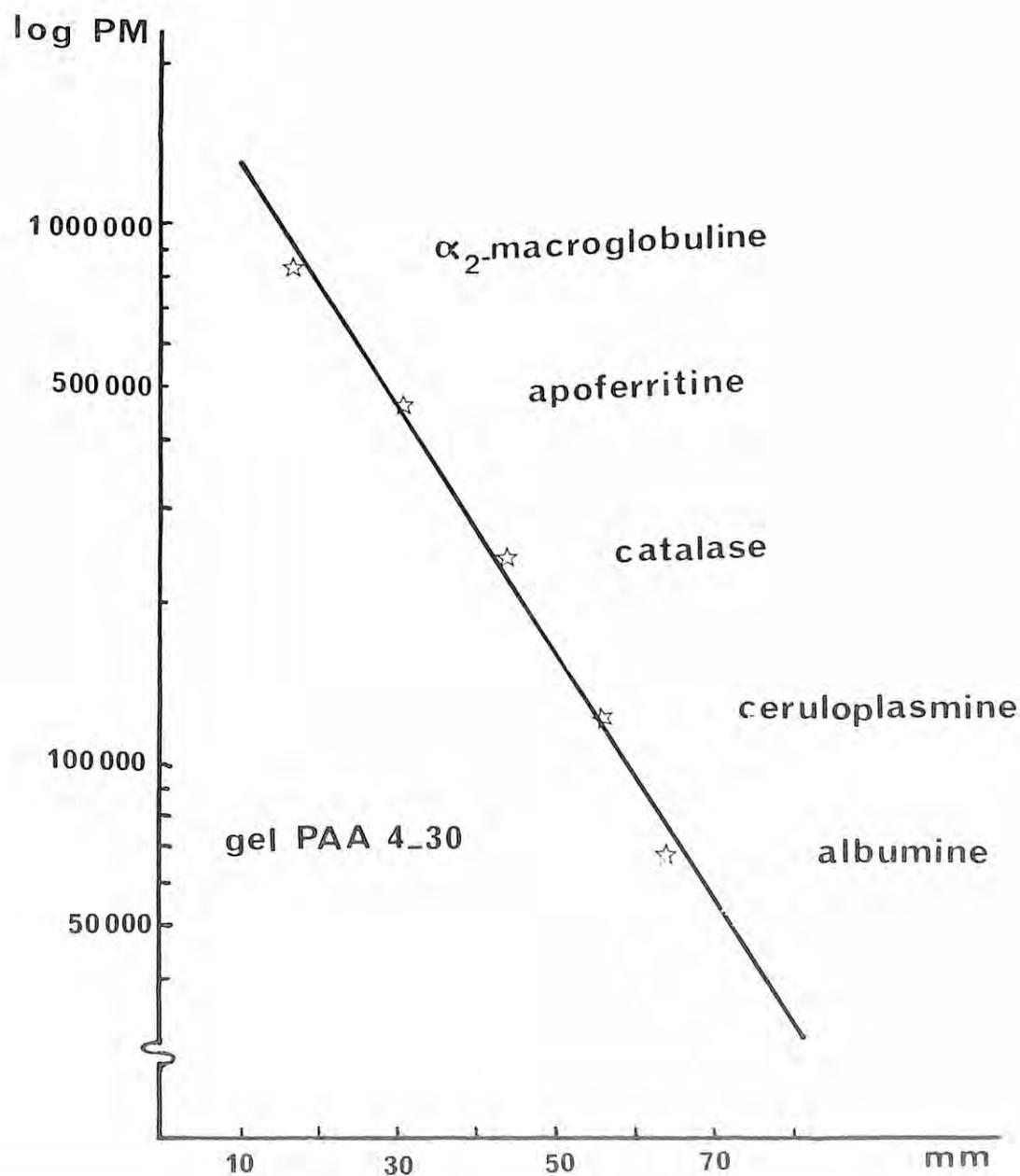
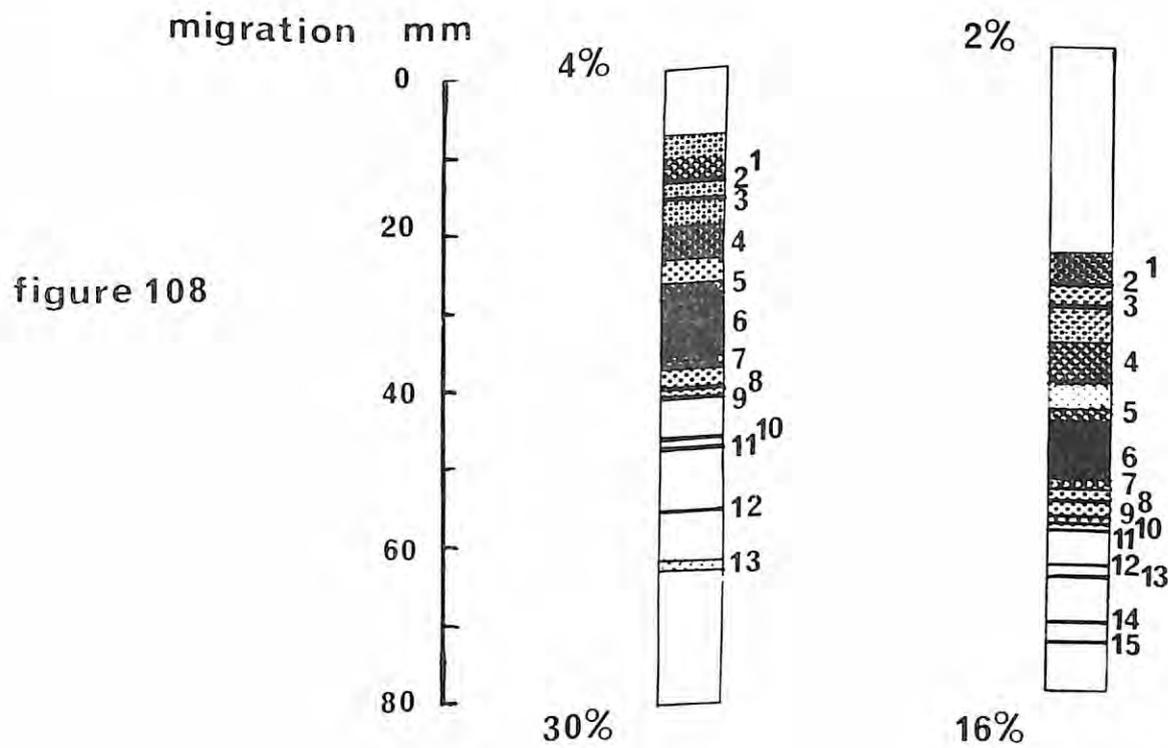
Coloration au bleu de coomassie G 250

On remarque une meilleure séparation, mais les fractions lentes ( $PM > 400\ 000$ ) restent tassées au sommet du gel.



Figure 107 : Electrophorèse de sang de *Sepia* sur plaque de gel à gradient 4% - 30% de polyacrylamide

- 1 & 2 : animaux en régénération depuis 1 et 2 mois. On remarque la disparition de la bande 2 (voir fig. 108) et l'intensification de la bande 4.
- 3 & 4 : animaux témoins (femelles immatures) (voir le diagramme 4 - 30, fig. 108)



N° de la bande	Distance de migration (mm)	Poids moléculaire estimé (daltons)
1	14	1 030 000
2	14,5	1 000 000
3	17	890 000
4	24,5	580 000
5	29	480 000
6	31,5	440 000
7	33,5	370 000
8	41	250 000
9	42,5	230 000
10	47,5	180 000
11	49	165 000
12	52	140 000
13	64,5	78 000

Tableau 6

#### IV - ETUDE DE LA CROISSANCE DU REGENERAT D'UN BRAS DE *SEPIA OFFICINALIS*

Pour évaluer la croissance du régénérat, nous pouvons comparer la longueur, atteinte à chaque stade, avec la longueur du bras symétrique non amputé qui sert de témoin. Sur les jeunes individus, même anesthésiés, la mesure est difficile en raison de la faible taille du régénérat, surtout au début de son évolution.

Nous avons donc choisi de faire les mesures sur coupes dessinées à la chambre claire, toujours au même grossissement. Les bras ont tous été fixés au liquide de BOUIN, pendant la même durée, de manière à avoir le même coefficient de rétraction des tissus. Les coupes, pour chaque stade, ont été choisies passant par l'axe médian, c'est-à-dire que les deux paquets de fibres des tractus cérébro-brachiaux, l'artère brachiale et la veine brachiale étaient visibles en même temps.

##### A -. Définition du bras de référence

Nous avons utilisé le fait que les bras sessiles de *Sepia officinalis* sont assimilables à des cônes. Ils sont donc définissables par leur hauteur (longueur médiane du bras) et par leur rayon - ou leur diamètre - (épaisseur du bras). Ces deux paramètres contiennent 100% de l'information.

Nous avons cherché la relation entre le diamètre du bras en un point et la longueur entre ce point et l'extrémité. Pour cela, nous avons mesuré ces grandeurs sur des coupes dessinées de bras, de 9 animaux, à des niveaux différents. Les résultats sont consignés dans le tableau 7. Nous avons fait la moyenne des valeurs trouvées à chaque niveau et nous en avons calculé l'intervalle de confiance. (Tableau 8).

A partir de ces données, nous avons pu construire un abaque (Fig. 110) donnant chacun de ces paramètres en fonction de l'autre. Nous avons appelé L la longueur que devrait avoir un bras pour un diamètre donné.

Longueur (L) (unités arbitraires)	diamètre correspondant (unités arbitraires)									Nombre de mesures (n)
10	6	6	7	6	6	5	6	11	10	9
20	13	10	11	11	12	11	11	17	18	9
30	17	14	15	16	17	18	16	20	22	9
40	23	17	20	21	20	22	20	24	24	9
50	25	20	25	25	24	24	23	25	25	9
60	28	24	28	28	26	27	27	25	26	9
70	29	26	28	28	27	28	30	26	28	9
80	29	28	33	28	30	29	32	28	29	9
90	31	33	-	32	34	33	32	29	-	7

TABLEAU 7

L	n	$\nu$	$\bar{x}$	$\sigma^2$	$\sigma$	Sm	$t_{0,01}$	Sm. $t_{0,01}$
10	9	8	7	4,25	2,1	0,73	3,36	2,4
20	9	8	12,7	8,25	2,9	1,01	-	3,4
30	9	8	17,2	6,19	2,5	0,88	-	3
40	9	8	21,2	5,19	2,3	0,81	-	2,8
50	9	8	24	2,75	1,7	0,59	-	2
60	9	8	26,5	2,03	1,4	0,50	-	1,7
70	9	8	27,8	1,69	1,3	0,46	-	1,5
80	9	8	29,6	3,27	1,8	0,64	-	2,1
90	7	6	32	2,66	1,6	0,65	3,71	2,4

TABLEAU 8

stade (jours)	diamètre	longueur mesurée (l)	longueur théorique (L)	$\frac{l}{L} \times 100$
10	20	6,5	37,5	17,3
14	20	14	37,5	37,3
20	22	23	42,5	54,1
25	30	45	77,5	58,4
40	27	46	62,5	73,3
60	33	75	95	78,9

TABLEAU 9

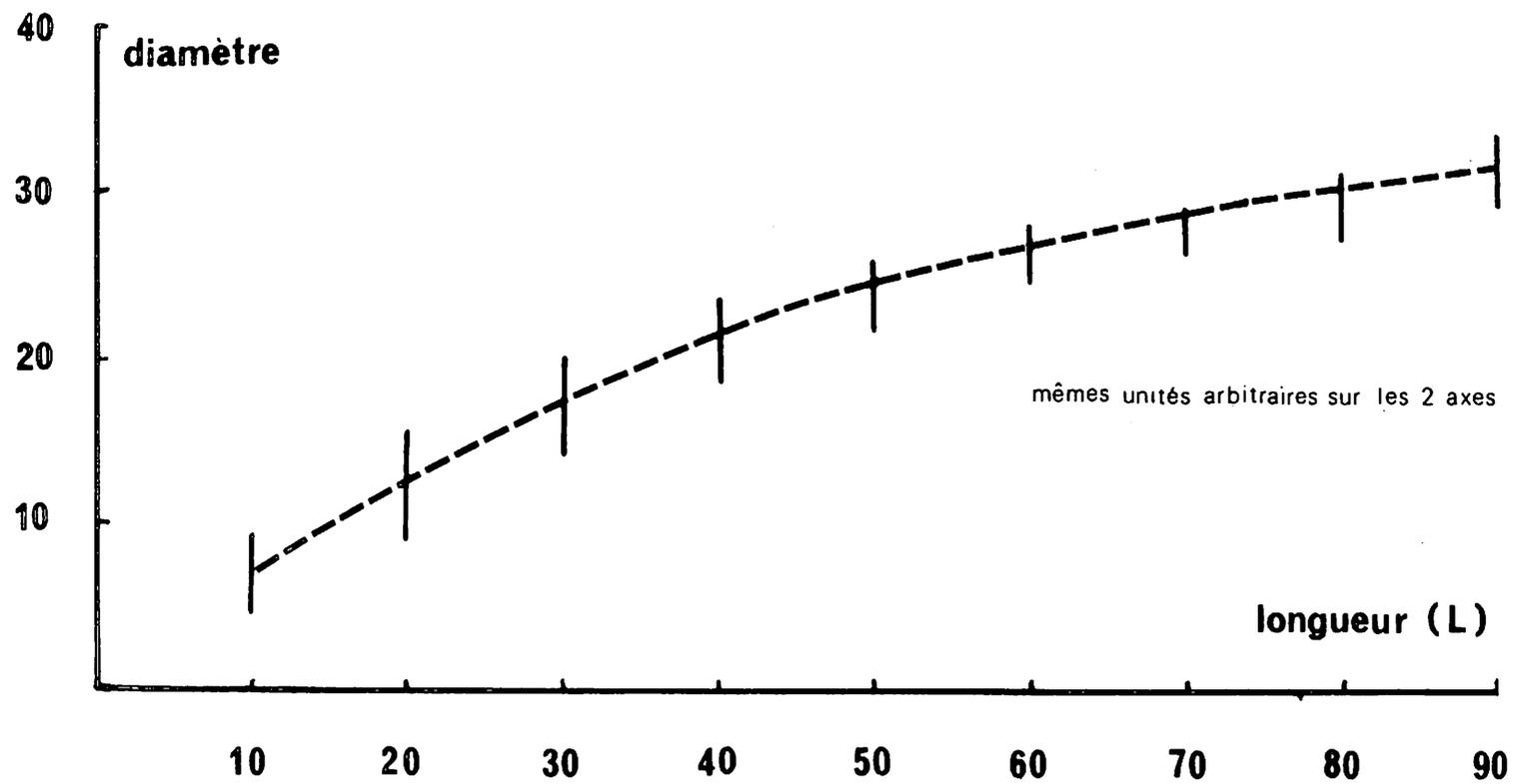


figure 110

## B - Croissance du régénérat pendant les deux premiers mois

Nous avons opéré de la même manière sur des dessins faits à partir de coupes de bras de juvéniles, à différents stades de régénération (10, 14, 20, 25, 40, 60 jours). Le diamètre est pris au niveau de la coupure et la longueur est mesurée selon l'axe nerveux. C'est la plus grande valeur qui a été retenue entre plusieurs coupes du même bras.

Pour avoir une idée de la croissance relative du bras, nous nous sommes reporté à l'abaque donnant la "longueur théorique" que devrait avoir un bras pour un diamètre donné. (Tableau 9). Il a ainsi été possible de calculer la croissance du bras amputé en pourcentage de la longueur initiale. La figure 111 montre que cette croissance se fait en deux phases.

Après un temps de "latence" d'environ une semaine, elle est d'abord rapide, jusqu'à la fin de la 3ème semaine, puis plus lente. La première phase correspond à l'accumulation de matériel cellulaire qui va former le blastème au début de la croissance de ce dernier. La deuxième phase, plus lente, correspond à la différenciation et à la morphogénèse du régénérat.

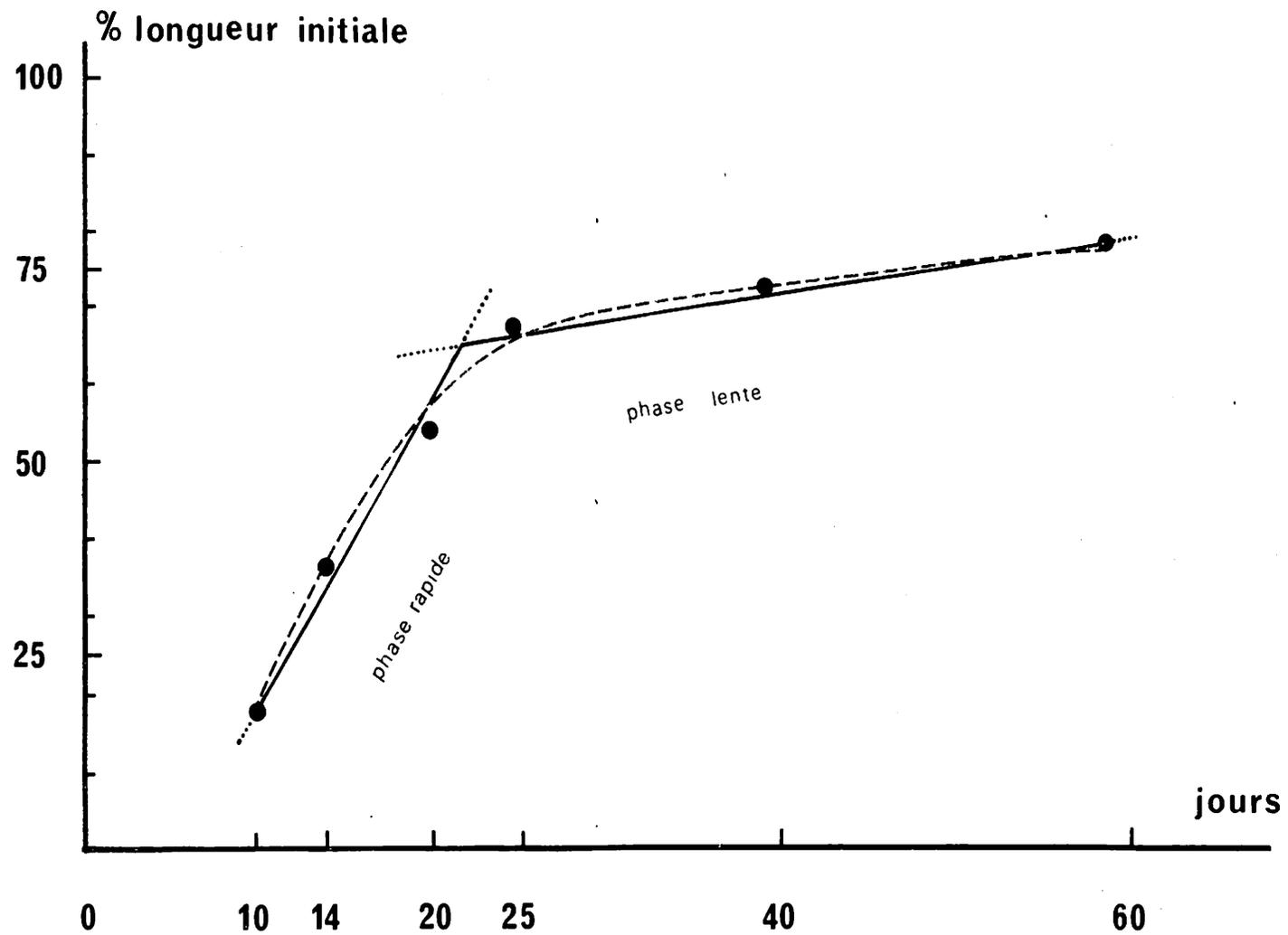


figure 111: croissance relative du régénérat de juvéniles de Sepia

DISCUSSION ET CONCLUSION

## LES MODALITES DE LA REGENERATION

La capacité de régénération des bras de Céphalopodes Décapodes (*Sepia officinalis*, *Sepioloatlantica*), vient d'être démontrée expérimentalement. A part LANGE (1920) sur *Octopus vulgaris*, aucun auteur n'avait essayé de définir les principales étapes de ce phénomène dans cette classe de Mollusques. Nous avons retrouvé les trois phases qui semblent communes à la plupart des espèces capables de régénérer, c'est-à-dire : cicatrisation, dégénérescence et dédifférenciation ; formation du blastème et croissance ; différenciation et morphogénèse.

### Première phase

Les phénomènes de cicatrisation, de dégénérescence et de dédifférenciation sont contemporains. La cicatrisation est le fait d'abord des amœbocytes, puis de l'épiderme qui s'étale et recouvre toute la plaie. Celui-ci ne se dédifférencie pas complètement et conserve son individualité malgré l'absence temporaire de membrane basale. La dédifférenciation atteint les tissus voisins de la plaie. Les cellules trop endommagées dégèrent.

### A - La cicatrisation

Après la coupure du bras, les tissus sont en contact direct avec le milieu extérieur. Les contractions musculaires qui surviennent tendent à rapprocher les lèvres de la plaie, ce qui a pour effet de la recouvrir partiellement. L'axe nerveux et une partie de la musculature sont toujours en contact avec l'eau de mer. Il n'y a pas d'hémorragie. Il y a une hémostase spontanée par vaso-constriction des vaisseaux, ce qui aboutit au ralentissement, voire à l'arrêt de la circulation (vaisseaux vides). Chez *Sepia*, comme chez *Octopus*, (LANGE 1920), la cicatrisation débute par la migration de cellules sanguines au niveau de la blessure. Elle est déclenchée, d'une part, par la coupure, d'autre part, par le choc osmotique que représente la remise de l'animal dans l'eau de mer. L'irritation provoque l'agglutination des amœbocytes qui finissent par recouvrir totalement la plaie de plusieurs

couches. Cet édifice cicatriciel est renforcé par du matériel fibreux de nature collagène seulement au niveau du derme. La reprise de la circulation (vaisseaux pleins) coïncide avec la couverture, par les amoebocytes, du cordon nerveux axial et des muscles qui étaient protubérants.

Chez *Sepia officinalis*, ce matériel fibreux semble de deux sortes. Il faut distinguer celui qui se trouve parmi les amoebocytes du tissu cicatriciel, sur toute la surface de la plaie, et celui qui est limité à la région du derme et dont la nature collagène est révélée par des colorations histochimiques et par son ultrastructure.

Les dosages de collagène (chapitre 3-III) ont montré une nette augmentation de cette protéine au début de la cicatrisation, dans les bras opérés. Ce pic est confirmé par celui de la radioactivité de cette même fraction (TCA chaud soluble). Il correspond à l'incorporation de  $^{14}\text{C}$  proline dans le collagène.

Une synthèse existe aussi au niveau des bras symétriques, non amputés, pris comme référence. Mais la relation n'est pas la même. Le "puits" observé dans la courbe de dosage du collagène, indiquerait la participation de l'organisme entier au processus de défense qu'est la cicatrisation. Il fournirait des précurseurs (acides aminés) à partir de sa propre substance. Le pic, dans la courbe de radioactivité correspondant aux bras non opérés, indiquerait une synthèse de collagène visant à combler les pertes et à retrouver un équilibre rompu, ce qui est fait dès le 3ème jour après l'amputation. Les courbes des 2 lots évoluent ensuite de la même manière (Fig. 102).

L'agglutination est une fonction cellulaire qui est normale pour les amoebocytes des Céphalopodes. Il est possible de rapprocher leur rôle dans la cicatrisation et celui qu'ils ont dans des réactions inflammatoires (naturelles ou expérimentales) décrites par JULLIEN et al. (1951-2, 1952, 1953, 1956) chez *Sepia officinalis* et *Octopus vulgaris*. Ces auteurs ont provoqué de telles réactions par injection de substances irritantes dans le manteau ou le foie de ces Céphalopodes. Le plus souvent, il y a formation d'un escarre et rejet. La vitesse du processus est plus grande chez *Octopus* que chez *Sepia*. Un seul type de cellules intervient, ce sont les amoebocytes. Ils entourent le matériel atteint en formant une ou plusieurs couches. La partie lésée, ainsi enkystée, est rejetée après histolyse et rupture des

fibres conjonctives et musculaires. Les cellules sanguines s'ordonnent et évoluent en tissu cicatriciel. Les granulations éosinophiles, qui n'existent que chez *Sepia*, fusionnent et s'atténuent pour finir par disparaître. L'encoche nucléaire disparaît aussi. Les amoebocytes évolueraient ensuite en fibroblastes.

Des expériences semblables ont été faites sur les Lamellibranches. Chez *Pecten maximus*, DREW et al., (1910) ont observé de façon similaire, la formation d'un tissu fibreux après l'implantation de tissu branchial dans le muscle adducteur. Celui-ci a été envahi par des amoebocytes, ovoïdes ou sphériques, à granules éosinophiles qui ont entouré la partie dégénérante (perte de striation et de colorabilité). Ces auteurs ont remarqué qu'il n'y avait pas d'agglutination autour d'un implantat d'agar (agent non irritant).

Un phénomène d'adaptation est à rapprocher de ce fait. TRIPP (1970) a fait observer que les parasites "naturels", en bonne santé, ne provoquent aucune réaction de rejet, alors que le processus d'encapsulation survient dès qu'ils faiblissent ou s'il s'agit d'un parasite "non naturel", implanté expérimentalement par exemple, RIFKIN et al., (1969) ont étudié ces phénomènes sur *Crassostrea virginica* parasitée par *Tylocephalum sp.*. Un matériel fibreux est fabriqué par les cellules qui ont entouré le Métacestode. Des glycoprotéines, des mucoprotéines, des mucopolysaccharides neutres, qui pourraient être des agents antitumoraux et antiviraux (TRIPP 1970), sont détectés dans la capsule. L'infiltration fibreuse qui suit l'action des amoebocytes a été décrite par PAULEY et al., (1967) après injection de talc dans le muscle adducteur de *Crassostrea gigas*.

Chez les Gastéropodes, ABOLINŠ-KROGIS (1976) a observé la sécrétion, par les amoebocytes, de matériel fibrillaire "peut-être de nature collagène", au cours de la formation de la membrane de régénération de la coquille d'*Helix pomatia*. Cette possibilité de synthèse par ces cellules a déjà été montré par SMINIA et al., (1973) sur *Lymnaea stagnalis*. Il s'agissait de collagène immature sans structure périodique.

Nous voyons que la cicatrisation chez les Céphalopodes fait appel aux moyens classiques de défense des Mollusques, avec migration cellulaire et production de matériel fibreux. Remarquons que la formation du

caillot des êtres dont le sang coagule, repose sur le même principe, il se compose de cellules sanguines et d'un réseau de fibrine. Puis la plaie est envahie par des fibroblastes et du collagène est synthétisé (ROSS et al., 1961).

#### B - La dégénérescence et la dédifférenciation

Ces phénomènes commencent immédiatement après l'opération.

*Les processus de dégénérescence* concernent les cellules des tissus en contact avec l'eau de mer ou celles atteintes par la coupure. Au cours de la dégénérescence, nous n'avons pas repéré de figure typique de phagocytose.

LANGE (1920), en étudiant la régénération des bras d'*Octopus vulgaris*, précise qu'elle n'a pas observé de phagocyte. Après des injections de grains de colorant dans les téguments d'Octopodes, BAGINSKI (1965), conclut que les amœbocytes de ces Céphalopodes sont dépourvus du pouvoir de phagocytose.

Cependant, MARTIN et al. (1975), en étudiant la dégénérescence des muscles et des cellules glandulaires de la glande salivaire postérieure d'*Octopus* après administration de 6-hydroxydopamine, ont montré que les amœbocytes, après avoir envahi les parties nécrosées de la glande, contenaient de grandes vacuoles renfermant des myofilaments encore identifiables et des masses osmiophiles.

A la lumière de ces derniers résultats, nous pouvons interpréter certaines inclusions des amœbocytes trouvés dans la cicatrice des bras amputés de *Sepia* comme étant des figures de phagocytose. (Fig. 70). La résorption des déchets des cellules dégénérées se ferait par autolyse (les inclusions éosinophiles qui disparaissent, contiendraient des enzymes protéolytiques) et par phagocytose.

Chez les autres Mollusques, DREW et al. (1910), travaillant sur *Pecten maximus* ont décrit la résorption de matériel cellulaire par phagocytose et par autolyse. ABOLINŠ-KROGIS (1976), sur *Helix pomatia* a rapporté la phagocytose de déchets par des amœbocytes à granulations éosinophiles qui ressemblent à ceux de *Sepia*.

*Les processus de dédifférenciation* affectent les cellules des tissus proches de la plaie et celles qui migrent vers l'extrémité du bras blessé.

La dédifférenciation peut être définie, de manière très générale, comme le processus selon lequel une cellule spécialisée perd ses caractères morphologiques et physiologiques pour revenir à un état d'aspect embryonnaire et qui peut se redifférencier en son type initial ou en un autre type. Cette nouvelle différenciation est la manifestation d'un état déterminé.

Chez *Sepia officinalis*, la dédifférenciation est rapide. Elle touche toutes les catégories cellulaires, mais si l'on suit la définition précédente, il faut dire que cette dédifférenciation n'est pas totale, en particulier en ce qui concerne les cellules épidermiques. Elles conservent toujours les caractères, décrits dans le premier chapitre, qui permettent de les identifier.

Les cellules musculaires perdent leurs striations (lyse des myofilaments). Dans les fibrocytes, nous avons trouvé d'énormes figures de types myéliniques, qui sont le dernier stade de la dégénérescence d'organites cellulaires. Elles peuvent persister plusieurs semaines. Les neurones et les cellules gliales, proches de la plaie se dédifférencient aussi.

Dans la plupart des cas, on observe la fragmentation, suivie de la disparition du reticulum endoplasmique, la vésiculation de l'appareil de Golgi. D'autres organites sont éliminés par digestion intracellulaire. (Action des lysosomes). (THOUVENY, 1967 - BOILLY, 1968 a - COULON et al., 1974).

Si nous nous rapportons à notre expérience d'incorporation de proline marquée, nous observons que la fraction TCA chaud insoluble (protéines autre que collagène) présente un pic très important qui se situe sur les 2 premiers jours après l'amputation (Fig. 104) pour les 2 catégories de bras normaux et amputés. En ce qui concerne la seconde, les valeurs trouvées sont supérieures, pour cette période, à celles comptées pour les bras normaux. Cette différence peut correspondre à la synthèse d'enzymes protéolytiques dans les bras opérés.

La dédifférenciation est obligatoire pour que la régénération ait lieu. Elle est la source unique de cellules de régénération, si on ne fait pas intervenir des cellules spécialisées (archéocytes, néoblastes),

dont l'action est d'ailleurs mise en doute par certains auteurs. La dédifférenciation a été observée dans les groupes zoologiques les plus variés comme les Eponges (*Polymastia mamillaris* - BOURY-ESNAULT, 1976), les Actinies (*Actinia equina* - VAN PRAET et al., 1975 ou *Metredium senile* - LENICQUE et al., 1977), les Annelides (*Syllis amica* - BOILY, 1968 a), les Gastéropodes (*Arion rufus* - CHETAIL, 1963 ou *Helix pomatia* - ABOLINŠ-KROGIS, 1976) ou les Batraciens (*Notophthalmus viridens* - ITEN et al., 1976).

### *Deuxième phase*

La formation du blastème et la croissance ont lieu à partir de la 2ème semaine chez les Seiches élevées à température moyenne.

#### A - La formation du blastème et son activation

Le blastème est composé des cellules qui ont subi la dédifférenciation (en majorité des amœbocytes). Elles sont toutes d'allure embryonnaire, elles sont sphériques et possèdent un gros noyau. Ces cellules ont migré et forment un massif cellulaire sous l'épiderme qui recouvre maintenant complètement la plaie.

L'épiderme et le blastème deviennent très basophiles. Le rapport nucléoplasmatique augmente. Ces processus métaboliques sont désignés sous le terme d'"activation". Une synthèse d'acides nucléiques explique la basophilie intense du noyau et du cytoplasme.

FONTES (1973) sur *Owenia fusiformis*, a montré qu'il existait une synthèse précoce d'ARN correspondant à la lyse des tissus lésés et à la dédifférenciation et une synthèse plus tardive correspondant à la fabrication de matériel protéique nécessaire à la différenciation et à la croissance. L'état activé du blastème est en rapport avec cette deuxième synthèse.

#### B - La croissance

L'activation est l'étape nécessaire qui précède la prolifération. L'épiderme du bras de *Sepia* semble devenir pluristratifié, à la suite des nombreuses divisions qui y ont lieu à partir de la 3ème semaine. Les cellules du blastème se divisent aussi et il évolue en cône. La croissance du blastème est contemporaine de son irrigation, d'une part, et de la poussée du cordon nerveux axial, d'autre part. Des lacunes

sanguines sont d'abord visibles dans le blastème, puis les veines sont bien individualisées. L'artère brachiale progresse en même temps que le système nerveux. Il existe un rapport, au moins temporel, entre les deux systèmes.

C'est à la fin de la 2ème semaine et au début de la 3ème, qu'un nouveau pic de synthèse protéique apparaît (Fig. 104). Il correspond au début de la croissance du blastème. Ce phénomène semble concerner tout l'organisme.

Les fibres du tractus cérébro-brachial pénètrent les premières dans le blastème. La régénération nerveuse des Céphalopodes a été étudiée par SERINI et al. (1932), ces auteurs donnent une vitesse de croissance de 7  $\mu$ /heure environ, en été, pour *Octopus vulgaris*. L'ordre de grandeur est comparable à ce que l'on observe chez les Vertébrés.

### *Troisième phase*

Elle consiste en la différenciation et la morphogénèse. Les cellules du blastème qui se sont divisées, expriment leur(s) potentialité(s). Les tissus et les organes reprennent leur place.

#### A - La différenciation cellulaire

Elle commence à la fin de la 3ème semaine. Les cellules se spécialisent en fonction de leurs potentialités histogénétiques et en fonction de leur place dans le blastème, et, les unes par rapport aux autres. Par sa pénétration dans le blastème, l'axe nerveux a repoussé les cellules à la périphérie. Il est intéressant de voir que la différenciation se produit par champs concentriques. Le derme sera formé par les cellules les plus éloignées du centre, c'est-à-dire du tissu nerveux. La musculature longitudinale intrinsèque et extrinsèque se différenciera entre les systèmes tégumentaire et nerveux. La musculature transversale se développe secondairement entre les muscles longitudinaux et les nerfs.

Les cellules de la couche ganglionnaire sont formées par des neuroblastes qui se divisent à mesure de la progression. Les fibres nerveuses des tractus cérébro-brachiaux, avancent dans des gaines de cellules gliales qui se divisent aussi. Le neuropile est formé par les fibres émises par les neurones en croissance.

Les muscles résultent des myoblastes qui s'alignent en rubans parallèles à l'axe nerveux. Les myofilaments apparaissent ensuite. Les cellules musculaires sont dans le prolongement des anciens champs musculaires.

Ces deux types sont issus de cellules dédifférenciées qui ont retrouvé leurs potentialités initiales. Mais cela n'explique pas ce que deviennent les amoebocytes qui composaient l'essentiel du blastème. Nous avons déjà parlé de leur transformation morphologique. Le tissu conjonctif ne contenant qu'un type cellulaire et les amoebocytes occupant la place de ce tissu, nous pensons que ce sont ces derniers qui évoluent en fibrocytes, d'une part, et en chromatophores et iridophores, d'autre part. Signalons que ces deux éléments ne migrent pas de l'arrière vers l'avant du bras. Ils sont différenciés sur place, dès la 3ème semaine pour les chromatophores (Fig. 83).

JULLIEN et al (1956), en se basant sur des critères morphologiques, ont émis l'hypothèse de ce passage de l'amoebocyte au fibrocyte chez *Octopus* et *Sepia*. RIFKIN et al. (1969), notent la similitude ultrastructurale entre fibroblastes et leucocytes de *Crassostrea virginica* (ergastoplasme granulaire, fibrilles intracytoplasmiques). Les différences de structures s'expliqueraient par les différences de fonctions. Ils ont émis deux hypothèses : les deux types dériveraient d'un précurseur commun ou bien l'amoebocyte évoluerait en fibrocyte. Cette dernière hypothèse est soutenue par le fait que TRIPP et al. (1966), ont cultivé *in vitro* des leucocytes d'huîtres matures et que ceux-ci ont évolué en fibrocytes, et par le fait que RIFKIN et al. (1968), ont montré que la capsule de fibrocytes n'apparaît qu'après l'infiltration de leucocytes.

Les amoebocytes de *Sepia*, pendant la croissance du blastème, et avant de se redifférencier se sont divisés. Or, ils ne se divisent pas sous forme circulante. Ils sont en phase  $G_0$  du cycle cellulaire (stade de repos). Ils passent en phase  $G_+$  avant de se différencier. Ils expriment une nouvelle potentialité en évoluant en fibrocytes et en étant capables, ensuite, de synthétiser du collagène.

## B - Histogénèse et morphogénèse

Avant de parler de quelques aspects de l'histogénèse et de la morphogénèse au cours de la régénération des bras de *Sepia officinalis*, il est intéressant de résumer ce qui est connu de son développement embryonnaire.

Les travaux sont peu nombreux. Nous ne parlerons que de ceux qui ont traité de la formation des bras.

D'après les tables de développement établies par LEMAIRE (1970), 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. Enfin, les ébauches des ventouses des bras apparaissent. C'est ensuite le tour des chromatophores. FIORINI (1963), indique que les iridophores sont de formation plus tardive.

GUERIN (1908), a suivi l'histogénèse normale d'un bras de *Sepia officinalis*. L'axe nerveux apparaît précocement, très tôt on y distingue une zone corticale (corps cellulaires) et une zone médullaire (fibres). Un mésoderme indifférencié comble les espaces entre le tissu nerveux et l'ectoderme. Celui-ci s'invagine du côté interne du bras. Les cellules du mésoderme prolifèrent. Des amas cellulaires forment les ébauches des ventouses. Les bords de l'invagination ectodermique se développent. Ils sont à l'origine des expansions lamellaires marginales des bras. Les bourgeons acétabulaires grossissent et se remplissent de tissu serré à cellules à gros noyaux allongés. Il y a une scission des cellules mésodermiques en deux zones concentriques de tissu lâche qui seront la zone dermique et la zone musculaire. La séparation est marquée par le resserrement des éléments conjonctifs (fibrocytes) qui produiront le collagène de la gaine conjonctive périphérique de la musculature brachiale intrinsèque. Dans le mésoderme, les futurs chromatophores commencent à se différencier. Il n'y a pas de distinction possible entre les cellules mésodermiques qui vont donner le tissu conjonctif et celles qui donneront le tissu musculaire.

Dans la zone dermique, les fibroblastes s'arrangent à peu près parallèlement à l'épiderme.

Dans la zone musculaire, des myoblastes conservent une orientation quelconque, alors que d'autres rayonnent du centre à la périphérie. Ces éléments musculaires apparaissent à peu près en même temps de

chaque côté de la gaine conjonctive, les fibres musculaires longitudinales à l'intérieur et dans le voisinage, les fibres de la musculature extrinsèque, d'abord contre la gaine puis vers la périphérie. Les deux groupes de fibres musculaires longitudinales apparaissent en même temps.

A ce stade, les musculatures acétabulo-brachiale et acétabulaire n'existent pas encore.

La musculature longitudinale s'accroît en épaisseur. Ce n'est que lorsqu'elle occupe chez l'embryon l'emplacement qu'elle doit occuper chez l'adulte, que les musculatures transversale et oblique se développent. La musculature transversale s'intercale entre les paquets de fibres longitudinales qu'elle sépare régulièrement.

A tous les stades, l'ectoderme contient des cellules muqueuses.

Ces faits correspondent à ce qui se passe dans la morphogénèse expérimentale. Nous avons retrouvé la même chronologie. De tels parallèles, entre embryogénèse et morphogénèse expérimentale, ont été soulignés dans d'autres groupes. (*Polymastia mamillaris* - BOURY-ESNAULT, 1976 ; *Arion rufus* - CHETAIL, 1963, pattes d'Urodèles - FABER, 1971).

La morphogénèse des ventouses de *Sepia* a lieu en relation temporelle avec l'irrigation du blastème. Elles apparaissent d'abord sur le moignon, puis elles s'individualisent en direction centrifuge. Elles sont innervées seulement lorsque les chambres aspirante et adhésive, d'une part et le pédoncule, d'autre part, sont formés.

MAY (1933) a observé ces faits sur *Octopus vulgaris*. Les ventouses terminales, encore d'aspect blastémateux, ne sont pas encore innervées, alors que celles de la base le sont déjà, aussi bien dans l'infundibulum que dans l'acétabulum. Les ventouses, une fois formées, agissent donc comme "centre d'attraction" pour les fibres qui doivent les innover.

Remarquons que l'innervation des chromatophores est également postérieure à leur formation et qu'il en est ainsi pour les iridophores qui sont eux-mêmes plus tardifs.

## FACTEURS INTERVENANT DANS LES PROCESSUS DE REGENERATION

Ils sont difficiles à mettre en évidence du fait de la synergie très probable existant entre eux. Chaque variation, dans certaines limites, de l'un entraîne la variation des autres pour maintenir un équilibre compatible avec la vie de l'espèce envisagée. *Sepia officinalis*, animal poïkilotherme, est très dépendant des conditions du milieu extérieur.

Parmi les facteurs externes, la lumière et la salinité ne semblent pas influencer sur la régénération. Par contre, sa vitesse est liée à la température. *Sepia officinalis* peut vivre de 7 à 30°C (RICHARD, 1971). La cicatrisation, phénomène vital comme nous l'avons vu, se fait en 5 jours environ pour des températures moyennes (14 à 19°C). Elle est considérablement retardée (2 semaines) si la température est de 10°C seulement (Fig. 58, stade 1). Dans des limites convenables, l'animal peut s'adapter en fonction de la température ; les contractions musculaires, les migrations cellulaires ont lieu. Aux basses températures, le métabolisme et les réponses physiologiques diminuent. Certains animaux (adultes surtout) ont seulement cicatrisé en hiver (Fig. 51). Ceux qui ont survécu ont commencé à régénérer quand la température de l'eau est remontée. Les effets d'écart de température sont beaucoup plus perceptibles en ce qui concerne la régénération proprement dite. Le processus est déclenché avec d'autant plus de retard que la température est basse. La phase de "prérégénération", dédifférenciation et activation, est la plus sensible à la température. Celle-ci exerce ensuite son action sur la croissance. Le régénérat met plus ou moins de temps pour atteindre un stade donné en fonction de ce paramètre. Les observations de RICHARD (1966 et 1971) corroborent les nôtres. Il a mis en évidence chez *Sepia*, une variation du rythme de croissance en fonction de la température. Il existe un ralentissement hivernal suivi d'une accélération estivale.

Il en serait de même chez les Gastéropodes, CHEVALIER et al. (1974), ont montré cette action de la température sur le Nudibranche *Aeolidiella alderi*.

Chez les Lamellibranches, FENG (1965) a montré que des huîtres (*Crassostrea virginica*) maintenues à 5-10°C ont un rythme cardiaque très lent et qu'il existe une diminution du nombre d'amœbocytes circulants.

Nous pouvons rapprocher ces faits du retard de la cicatrisation dans nos expériences à 10°C, où d'autre part, la synthèse de collagène n'a pas lieu (Fig. 103).

Le deuxième facteur que nous avons envisagé est l'*apport alimentaire*. Nous avons montré que le jeûne retardait la cicatrisation et la régénération. Dans nos expériences, la sous-alimentation a commencé au jour zéro. Ses effets sont sans doute assez immédiats, car nous avons enregistré des écarts entre les deux lots dès la cicatrisation, écarts qui se sont confirmés pendant la régénération.

Des expériences de jeûne ont déjà été faites sur *Sepia officinalis* par RICHARD (1971) et BOLETZKY (1974). Ils ont montré que l'apport nutritif conditionnait la croissance de l'animal et qu'elle n'était possible que si la Seiche disposait d'une quantité de nourriture suffisante à son métabolisme. La sous-nutrition ralentit la croissance et conduit à un resserrement des lamelles du sépion.

En comparant les "os" des animaux en expérience avec ceux des Seiches capturées en mer, BOLETZKY a conclu que les animaux qui survivent dans le milieu naturel se tiennent à un niveau de nutrition très élevé.

Ces deux facteurs, température et nutrition, agissant sur la croissance, se répercutent sur le phénomène de régénération.

Un autre facteur externe, que nous avons signalé, et dont l'action est différente, est le *niveau de l'amputation*. Plus la section est pratiquée proche de la base du bras, plus la régénération est lente, mais les événements morphologiques et histologiques sont les mêmes. Nous pensons que cela tient à l'étendue des dommages causés par l'amputation, en particulier, au nombre de fibres nerveuses atteintes et à la plus grande surface de la plaie lorsque l'on remonte le long du bras pour le couper.

La régénération dépend aussi de l'*âge* de l'individu. Un animal régénère d'autant moins vite qu'il est plus âgé. La partie régénérée du bras est aussi plus petite chez une Seiche âgée que chez une jeune. RICHARD (1971) a démontré que la croissance relative de *Sepia*, décroît avec l'âge quelque soit la température et que la rapidité de cette diminution est d'autant plus accusée que la température est plus élevée.

Cet auteur a déterminé 2 phases dans le rythme de croissance, une phase initiale (0 à 100 jours - c'est le cas de nos "juvéniles" -) où l'accroissement relatif est constant, puis une 2ème phase où l'on assiste à une diminution progressive de la croissance.

#### APPROCHE DU PROBLEME DE REGULATION DE LA REGENERATION

Nous n'avons eu qu'un aperçu minime des systèmes de régulation. L'observation des progrès de la vascularisation et de l'innervation du régénérat, nous a montré que ces deux phénomènes étaient en rapport au moins temporel avec la mise en place du blastème, d'une part, et, avec sa croissance et sa différenciation, d'autre part.

Le système sanguin et le système nerveux sont les voies possibles de l'arrivée de "messagers" inducteurs et/ou répresseurs contrôlant la régénération.

Le système nerveux peut être impliqué seul ou en relation avec le système sanguin (qui est clos chez *Sepia officinalis*). Il est possible que les neurosécrétions soient acheminées vers les cellules "cibles" par les axones eux-mêmes (LAUBIER-BONICHON, 1973) ou par des systèmes neurosécrétoires de vaisseaux sanguins, tel celui de la veine cave décrit par ALEXANDROWICZ chez *Eledone* en 1964 et chez *Sepia* et *Octopus* en 1965. BERRY et al. (1970), ont avancé l'hypothèse que les produits sécrétés par les terminaisons nerveuses de ce système chez *Eledone*, pourraient être libérées dans le flot sanguin à la suite d'un "stress".

Nous avons commencé une étude de la composition du sang de *Sepia officinalis*, quantitative par dosages et qualitative par chromatographies et électrophorèses. Le dépouillement des électrophorégrammes sur gel à gradient de polyacrylamide, nous a permis d'entrevoir des différences entre sérums d'animaux normaux et en cours de régénération (chapitre 3-IV). Ces variations de la composition en protéines sériques peuvent être dues à la présence de molécules régulatrices et/ou à la présence de déchets issus de la dégénérescence des tissus qui seraient transportés, pour une part, dans une autre partie de l'organisme pour y être métabolisés. (C'est le cas de protéines musculaires au moment de la métamorphose de certains insectes - LOCKSHIN, 1975).

En ce qui concerne l'intervention du système sanguin chez les Céphalopodes au cours de la régénération, nous ne pouvons pas comparer avec les autres Mollusques dont la circulation est lacunaire. Les Amphibiens donnent un meilleur "modèle". Des travaux récents ont permis de montrer le rôle possible du système sanguin dans la régénération de membres d'Urodèles. SMITH et al., (1975) sur *Triturus cristatus* et *Ambystoma mexicanum* et REVARDEL et al., (1975) sur *Salamandra salamandra* ont montré que la dédifférenciation et la mise en place du blastème seraient en rapport avec la vascularisation. Cette importance du système sanguin a déjà été soulignée dans les cas d'hypertrophie compensatrice d'organes comme le foie (SIMNETT et al., 1973). SMITH et al., (1975) ont montré également qu'en dénervant un membre d'amphibien avant la vascularisation du blastème, celui-ci n'était pas irrigué pendant les 2 semaines suivantes alors que la même opération faite pendant ou après la vascularisation du blastème ne paraît pas avoir de grands effets.

Des expériences de dénervation sélective faites par REVARDEL et al. (1975), sans toucher les vaisseaux sanguins, ont montré que l'énervation ralentit la mise en place du blastème et que celui-ci ne peut pas grandir, mais il n'y a pas de dédifférenciation ni de régression du membre alors qu'un arrêt prolongé de l'irrigation empêche les cellules dédifférenciées de former un blastème.

Ce n'est donc pas le système nerveux qui intervient dans le maintien des structures et la formation du blastème, mais le système sanguin. Le système nerveux serait responsable de la croissance du blastème (activation des mitoses - DONALDSON et al., 1975 - sur *Triturus viridens*).

C'est également le cas chez les Annélides. Nous en citerons pour exemple *Nereis diversicolor* dont BOILLY et al., (1970) ont étudié la régénération caudale en l'absence de chaîne nerveuse. Elle est possible, mais aboutit à la mise en place d'un régénérat hypomorphe.

Chez les Annélides, le rôle hormonal du système nerveux est connu. DURCHON et al. (1962) et ULIVE (1974) sur *Nereis* et FITZHARRIS (1976) sur *Sabella*, l'ont mis en évidence.

Ce dernier auteur a montré l'action directe, neurotrophique, du nerf chez *Sabella*. Il a perturbé réversiblement l'arrangement des microtubules des neurones par action de la colchicine. Cette molécule n'arrête pas les neurosécrétions, mais elles ne peuvent plus être transportées jusqu'au blastème. La régénération est perturbée et elle est plus lente.

D'autres auteurs ont étudié l'influence des neuromédiateurs sur la régénération de Cnidaires : *Clava squamata* (LENICQUE 1974), *Metridium senile* (LENICQUE et al., 1977), de Turbellariés : *Dugesia tigrina* (LENICQUE, 1973, 1974 a, 1974 b, - LENICQUE et al., 1976), d'Annélides : *Eisenia foetida* (CHAPRON - 1972-1973) et d'Amphibiens : *Triturus cristatus* (CHAPRON 1973), *Notophthalmus viridens* (SICARD et al., 1974).

Il en ressort que les amines biogènes ont un rôle promoteur important sur la différenciation. La présence soit d'un noyau indol (sérotonine), soit d'un noyau phénol (dopamine - noradrenaline) dans la molécule active est requise selon les phyla.

Cette régulation fait aussi entrer en jeu les "messagers seconds" - nucléotides cycliques cAMP et cGMP - (FRIEDMAN, 1976 - LENICQUE, 1976).

A côté de ces régulations d'origine "éloignée", d'autres facteurs inducteurs ont été mis en évidence au niveau même de l'amputation. Il s'agit des contacts intertissulaires. Nous avons vu que chez *Sepia*, l'épiderme reste morphologiquement indépendant des autres tissus. Il ne dégénère pas et recouvre la plaie en s'étalant. Puis, il est "activé" et se divise. Mais pendant plusieurs jours, les cellules de l'épiderme sont en contact avec les tissus sous-jacents. La membrane basale n'est pas reformée immédiatement. Il peut y avoir des échanges entre les feuillettes. CHAPRON (1974) a montré l'existence d'une glycoprotéine sécrétée par l'épithélium cicatriciel fermant la plaie d'une patte amputée de *Triturus cristatus*,

La régulation est "proximo-distale". Des gradients peuvent exister dans les deux sens. Mais le développement du régénérat se fait en même temps sur toute une section transverse du bras. Il faut donc également envisager la possibilité d'une régulation "radiaire", (FRANCH et al., 1976).

Au cours de la morphogénèse normale ou expérimentale, l'organisation du bras de *Sepia officinalis* est concentrique pour les principaux systèmes et au moment où les ventouses se forment, les ébauches apparaissent sur la face interne et sur elle seule.



*En résumé* : La régénération des bras de *Sepia officinalis* (Céphalopode Décapode) est possible.

Elle se fait par épimorphose pour l'épiderme et par morphallaxie pour les autres tissus.

Morphologiquement, 6 stades ont été déterminés : la cicatrisation, l'apparition du bourgeon (demi-sphère), la croissance (cône), l'apparition des ventouses, celle des chromatophores (morphogénèse), et la mobilité (connections nerveuses). La régénération est totale.

Histologiquement et cytologiquement, 3 phases ont été mises en évidence : la cicatrisation (apport de matériel cellulaire et synthèse de collagène) et la dédifférenciation, la formation du blastème et sa croissance, la différenciation et la morphogénèse.

Les 2 dernières phases sont en rapport, au moins temporel, avec l'apparition des systèmes sanguin et nerveux dans le régénérat. Ce fait a été interprété en terme de régulation.

Une variation des protéines sériques a été notée au cours de la régénération.

La température et l'apport alimentaire influencent la vitesse de régénération. Ces facteurs ont été remis dans le contexte de la croissance relative de *Sepia*.

La croissance du régénérat est d'abord rapide, puis s'infléchit.

On note une polarité centrifuge dans la différenciation et la morphogénèse.

Il a été possible de faire un parallèle entre morphogénèse normale et expérimentale.

Par certains aspects de la régénération de leurs bras, les Céphalopodes se rapprochent plus des Batraciens que des autres Mollusques.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABOLINŠ-KROGIS A. - 1976 - Ultrastructural study of the shell-repair membrane in the snail *Helix pomatia* L. Cell Tiss. Res. 172 : 455-476.
- ADAM W. - 1937 - Notes sur les Céphalopodes : VII - Sur un cas de régénération chez *Sepioteuthis lessoniana* Lesson, 1830. Bull. Mus. r. Hist. nat. Belg. 13 (45) : 1-4.
- ALDRICH F.A. & ALDRICH M.M. - 1968 - On the regeneration of the tentacular arm of the giant squid *Architeuthis dux* Steenstrup (Decapoda, Architeuthidae) Can. J. Zool. 46 (5) : 845-847.
- ALEXANDROWICZ J.S. - 1928 - Sur l'innervation des vaisseaux sanguins des Céphalopodes. C.r. Soc. Biol. (Pologne) 99 : 1015-1017.
- ALEXANDROWICZ J.S. - 1964 - The neurosecretory system of the vena cava in Cephalopoda : I - *Eledone cirrosa*. J. mar. biol. Ass. U.K. 44 : 111-132.
- ALEXANDROWICZ J.S. - 1965 - The neurosecretory system of the vena cava in Cephalopoda : II - *Sepia officinalis* and *Octopus vulgaris*. J. mar. biol. Ass. U.K. 45 : 209-228.
- ARNOLD J. - 1967 - Organellogenesis of the Cephalopod iridophore : cytomembranes in development. J. Ultrastruct. Res. 20 : 410-421.
- BAIRATI A. - 1972 - Collagen : an analysis of phylogenetic aspects. Boll. Zool. 39 : 205-248.
- BAGINSKI S. - 1964 - Morphologie de la névroglie du cerveau d'*Eledone moschata*. Vie et Milieu 15 : 645-659.
- BAGINSKI S. - 1965 - Studies on the phagocytic system in Cephalopoda of the genus *Eledone*. Folia Morph. 24 (4) : 387-392.
- BARBER V.C. & GRAZIADEI P. - 1965 - The fine structure of Cephalopod blood vessels. I : Some smaller peripheral nerves. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 66 : 765-781.
- BARBER V.C. & GRAZIADEI P. - 1967 a - The fine structure of Cephalopod blood vessels. II : The vessels of the nervous system. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 77 : 147-161.
- BARBER V.C. & GRAZIADEI P. - 1967 b - The fine structure of Cephalopod blood vessels. III : Vessel innervation. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 77 : 162-174.
- BASSOT J.M. & GABE M. - 1966 - Caractères généraux des centres nerveux du *Nautilé*. C.r. hebd. Sean. Acad. Sc. Paris (D) 263 : 1248-1251.

- BENSALEM M. - 1970 - Etude histologique et histochimique de la régénération après ablation partielle du pied de *Nassa reticulata* L.- Bull. Soc. Hist. nat. Afr. N. 61 (314) : 107-120.
- BERRY C.F. & COTTRELL G.A. - 1970 - Neurosecretion in the vena cava of Cephalopod *Eledone cirrosa*. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 104 (1) : 107-115.
- BIDDER A.M. - 1976 - New names for old : the Cephalopod "mid-gut gland". J. Zool. 180 : 441-443.
- BOGORAZE D. & CAZAL P. - 1944 - Recherches histologiques sur le système nerveux du Poulpe. Les neurones, le tissu interstitiel et les éléments neurocrines. Archs. Zool. exp. gen. 83 : 413-444.
- BOILLY B. - 1968 - Etude ultrastructurale de l'évolution des tissus impliqués dans la régénération céphalique et caudale de *Syllis amica* Q. (Annélide Polychète). I: Dédifférenciation. J. Microsc. 7 (6) : 865-876.
- BOILLY B. - 1968 - Etude ultrastructurale de l'évolution des tissus impliqués dans la régénération céphalique et caudale de *Syllis amica* Q. (Annélide Polychète). II : Activation et différenciation. J. Microsc. 7 (6) : 877-894.
- BOILLY B. & BOILY-MARER Y. - 1972 - Rôle des contacts tissulaires dans le déclenchement de la morphogénèse régénératrice chez la *Nereis*. Bull. Soc. zool. Fr. 97 : 295-310.
- BOILLY B. & COMBAZ A. - 1970 Influence de la chaîne nerveuse sur la régénération caudale de *Nereis diversicolor*. C.r. hebd. Séan. Acad. Sc. Paris (D) 271 : 92-95.
- BOLETZKY S.v. - 1974 a - Elevage des Céphalopodes en aquarium. Vie et Milieu XXIV (2A) : 309-340.
- BOLETZKY S.v. - 1974 b - Effets de la sous-nutrition prolongée sur le développement de la coquille de *Sepia officinalis* L. (Mollusca, Cephalopoda). Bull. Soc. zool. Fr. 99 (4) : 667-673.
- BOLETZKY S.v. - 1975 - The reproductive cycle of Sepiolidae (Mollusca, Cephalopoda) Pubbl. Staz. zool. Napoli 39 : 84-95.
- BOUCAUD-CAMOU E. - 1973 - Etude de l'appareil digestif de *Sepia officinalis* L. (Mollusque, Céphalopode). Essai d'analyse expérimentale des phénomènes digestifs. Thèse - Université de Caen.
- BOURY-ESNAULT N. - 1976 - Morphogénèse expérimentale des papilles inhalantes de l'éponge *Polymastia mamillaris* (Müller). Archs. Zool. exp. gén. 117 (2) : 181-196.
- BOYCOTT B.B. - 1961 - The functional organization of the brain of the cuttlefish *Sepia officinalis*. Proc. R. Soc. (B) 153 : 503-534.

- BROCK J. - 1886 - Indische Cephalopoden, Zool. Jb. 2 : 591-624.
- CALLAN H.G. - 1940 - The absence of a sex hormone controlling regeneration of the hectocotylus in *Octopus vulgaris* Lam. Pubbl. Staz. zool. Napoli 18 : 15-19.
- CAZAL P. & BOGORAZE D. - 1943 - Recherches sur les corps blancs du Poulpe (*Octopus vulgaris* Lam.). Leur fonction globuligène et néphrocytaire. Annls. Inst. océanog. Monaco : 842 : 1-12.
- CAZAL P. & BOGORAZE D. - 1944 - La glande épistellaire du Poulpe, organe neurocrine. Archs. Zool. exp. gén. 84 : 10-12.
- CHAPRON C. - 1973 - Etude comparée de la nature et du mode d'action des substances neurotrophiques intervenant dans la régénération des Oligochètes et des Amphibiens. C.r. hebd, Séan. Acad. Sc. Paris (D), 276 : 1463-1466.
- 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 (1) : 133-145.
- CHAPRON C. & CHAPRON J. - 1972 - Influence des amines biogènes et de leurs inhibiteurs sur la régénération. Etude chez l'Annélide *Eisenia foetida*. C.r. hebd. Séan. Acad. Sc. Paris (D), 274 : 412-414.
- CHERON J. - 1866 - Recherches pour servir à l'histoire du système nerveux des Céphalopodes dibranchiaux. Annls. Sci. nat. 5 (5) : 1-122.
- CHETAIL M. - 1963 - Etude de la régénération du tentacule oculaire chez un ariionidae (*Arion rufus*) et un limacidae (*Agriolimax agrestis*). Archs. Anat. micros. Morph. exp. 52 : 129-203.
- CHEVALIER F., MOCQUARD J.P. & TARDY J. - 1974 - Croissance et précocité d'*Aeolidiella alderi* (Cocks) (Mollusque nudibranche) : Effets du groupement et de la température. Bull. Soc. zool. Fr. 99 (4) : 601-620.
- CHIAJE S. delle - 1825 - Memoria sulla storia e noto mia degli animali senza vertebre del reguo di Napoli. Volume IV memoria II su Cefalopodi : 38-116.
- CHOE S. - 1966 a - On the growth feeding rates and the efficiency of food conversion for cuttlefishes and squids. Korean J. Zool. 9 (2) : 72-80.
- CHOE S. - 1966 b - On the eggs, rearing, habits of the fry and growth of some Cephalopoda. Bull. Mar. Sci. 16 (2) : 330-348.
- CHOE S. & OSHIMA Y. - 1963 - Rearing of squids (*Sepioteuthis lessoniana*, *Euprymna berryi*) and cuttlefishes (*Sepia esculenta*, *Sepia subaculeata*, *Sepiella maindroni*). Nature 197 (4864) : 307.

- CLONEY R.A. & FLOREY E. - 1968 - Ultrastructure of Cephalopod chromatophore organs. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 89 : 250-280.
- COULON J. & THOUVENY Y. - 1974 - Etude ultrastructurale de la dédifférenciation cellulaire dans la régénération antérieure de l'Annélie *Owenia fusiformis* (delle Chiaje). Annls. Embryol. & Morphogen. 7 (1) : 61-79.
- CUENOT L. - 1891 - Etude sur le sang et les glandes lymphatiques. Archs. Zool. exp. gén. 9 (2) : 19-28.
- CUVIER J. - 1817 - Mémoire pour servir à l'histoire et à l'anatomie des Mollusques. Deterville, Paris p. 1-54.
- DENTON E.J. & GILPIN-BROWN J.B. - 1961 a - The buoyancy of the cuttlefish, *Sepia officinalis* L. J. mar. biol. Ass. U.K. 41 : 319-342.
- DENTON E.J. & GILPIN-BROWN J.B. - 1961 b - The effect of light on the buoyancy of the cuttlefish. J. mar. biol. Ass. U.K. 41 : 343-350.
- DENTON E.J. & GILPIN-BROWN J.B. - 1961 c - The distribution of gas and liquid within the cuttlebone. J. mar. biol. Ass. U.K. 41 : 365-381.
- DENTON E.J., GILPIN-BROWN J.B. & HOWARTH J.V. - 1961 - The osmotic mechanism of the cuttlebone. J. mar. biol. Ass. U.K. 41 : 351-364.
- DILLY P.N., GRAY E.G. & YOUNG J.Z. - 1963 - Electron microscopy of optic nerves and optic lobes of *Octopus* and *Eledone*. Proc. R. Soc. (B) 158 : 446-456.
- DONALDSON D.J. & 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 (1) : 9-23.
- DREW G.M. & MORGAN W. - 1910 - The origin and formation of fibrous tissue produced as a reaction to injury in *Pecten maximus*, as a type of the Lamelibranchiata. Q. Jl micros. Sci. 55 : 595-610.
- DURCHON M. & MARCEL R. - 1962 - Influence du cerveau sur la régénération postérieure chez *Nereis diversicolor*. C.r. Séan. Soc. Biol. 156 : 661-663.
- EASTOE J.E. - 1967 - In : *Treatise on Collagene*. Ed. Ramachandran, Academic Press, London and New York, vol. 1.
- FABER J. - 1971 - Vertebrate limb ontogeny and limb regeneration : morphogenetic parallels. Adv. in morphogen. 9 : 127-147.
- FABER J. & DE BOTH N.J. - 1970 - The role of innervation in the manifestation of the digits in transplanted regeneration blastemas of the axoloth (*Ambystoma mexicanum*). Archs. biol. (Liège) 81 : 215-227.

- FENG S.Y. - 1965 - Heart rate and leucocyte circulation in *Crassostrea virginica*.  
J. Inverteb. Pathol. 8 : 505-511.
- FIORINI P. - 1963 - Zur embryonalen und post embryonalen Entwicklung der Epidermis bei Zehnarmigen Tintenfischen. Verh. naturf. Ges. (Basel) 74 : 149-160.
- FIORINI P. - 1965 - Die embryonale Musterentwicklung bei einigen mediterranen Tintenfischarten. Vie et Milieu 16 (2A) : 655-756.
- FIORINI P. - 1970 - Die embryonale Genese der Chromatophoren bei *Octopus vulgaris* Lam. Acta anat. 75 : 199-224.
- FITZHARRIS Th.P. - 1976 - Regeneration in Sabellid annelids. Amer. Zool. 16 : 593-616.
- FONTES M. - 1973 - Etude des processus moléculaires intervenant dans la différenciation cellulaire, Thèse doct. spécialité Univ. Aix-Marseille II.
- FOX H. & VEVERS G. - 1960 - *The nature of animal colours*. Sidgwick & Jackson Ltd. London.
- FLOREY E. - 1966 - Neurons control and spontaneous activity of the chromatophores of a cephalopod, *Loligo opalescens*. Comp. Biochem. Physiol. 18 : 305-324.
- FRENCH V., BRYANT P.J. & BRYANT S.V. - 1976 - Pattern regulation in epimorphic fields. Science 193 : 969-981.
- FRIEDMAN D.L. - 1976 - Role of cyclic nucleotides in cell growth and differentiation. Physiol. Rev. 56 (4) : 652-708.
- FROSCH D. - 1973 - Projection of chromatophore nerves on the body surface of *Octopus vulgaris*. Mar. Biol. 19 (2) : 153-155.
- GIROD P. - 1883 - Recherches sur la peau des Céphalopodes. Archs. Zool. exp. gén. 2 (1) : 225-266.
- GONZALEZ-SANTANDER & GARCIA-BLANCO - 1972 - Ultrastructure of the obliquely striated or pseudostriated muscle fibres of the Cephalopods : *Sepia*, *Octopus* and *Eledone*. J. submicrosc-Cytol. 4 (3) : 233-245.
- GRAY E.G. - 1969 - Electron microscopy of the gliovascular organization of the brain of *Octopus*. Phil. Trans. R. Soc. (B) 255 : 13-32.
- HANKO B. - 1913 - Über einen gespaltenen Arm von *Octopus vulgaris*. Wilhelm Roux Arch. EntwMech. Org. 37 : 217-222.
- HANSON J. & LOWY J. - 1959 - Structural features relating to the mechanism of tonic contraction in certain molluscan smooth muscles. J. Physiol. 149 : 31 p.

- HAVET J. - 1916 - Relations de la névroglie avec l'appareil vasculaire chez les Invertébrés. C.r. hebd. Séan. Acad. Sc. Paris (D) 162 : 568-571.
- HENN F.A. & HAMBERGER A. - 1971 - Glial cell function : uptake of transmitter substances. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 68 (11) : 2686-2690.
- HOYLE G. - 1964 - In : *Physiology of Mollusca*, Ed. K.M. Wilbur & C.M. Yonge, Academic Press, New York, vol. 1 chap. 10 : 313-351.
- ITEN L.E. & BRYANT S.V. - 1976 - Stages of Tail regeneration in the adult newt, *Notophthalmus viridens*. J. exp. Zool. 196 (3) : 283-292.
- JAKUBSKI A.W. - 1915 - Studien über das Gliagewebe der Mollusken. II, Teil : Cephalopoda. Z. wiss. Zool. Bd. 112 : 48-69.
- JOHANSEN K. & MARTIN A.W. - 1962 - Circulation in the Cephalopod *Octopus dofleini*. Comp. Biochem. Physiol. 5 : 161-176.
- JOUBIN L. - 1900 - Céphalopodes provenant des campagnes de la Princesse Alice 1891-1897. *Résultats des campagnes scientifiques du prince Albert 1er de Monaco*, facs. XVII.
- JOUBIN L. - 1924 - Contribution à l'étude des Céphalopodes de l'Atlantique nord. *Résultats des campagnes scientifiques du prince Albert 1er de Monaco*, facs. LXVII.
- JULLIEN A., JULLIEN A.P. & RIPPLINGER J. - 1951-2 - Etude histologique de tumeurs naturelles et d'inflammations expérimentales chez les Mollusques Céphalopodes. Annls. scient. Univ. Besançon, VI-VII, Zool. et Physiol. (1) 39 pp.
- JULLIEN A., JULLIEN A.P. & RIPPLINGER J. - 1952 - Sur les effets des injections intradermiques de dibenzanthracène chez le Poulpe. C.r. hebd. Séan. Acad. Sc. Paris (D), 234 : 881-883.
- JULLIEN A., JULLIEN A.P. & RIPPLINGER J. - 1953 - Sur quelques types de réactions inflammatoires et tumorales provoquées par l'indol et le dibenzanthracène chez la Seiche et le Poulpe. Annls. scient. Univ. Besançon, VIII, Zool. et Physiol. (1) 20 pp.
- JULLIEN A., CARDOT J., RIPPLINGER J. & CLAUDET D. - 1956 - Réactions inflammatoires provoquées expérimentalement dans le foie des Céphalopodes Décapodes. C.r. hebd. Séan. Acad. Sc. Paris (D) 4 pp.
- KAWAGUTI S. & IKEMOTO N. - 1957 - Electron microscopy of the smooth muscle of a cuttlefish, *Sepia esculenta*, Hoyle. Biol. J. Okayama Univ. 3 : 196-208.
- KAWAGUTI S. & OHGISHI S. - 1962 - Electron microscopic study on iridophores of a cuttlefish, *Sepia esculenta*. Biol. J. Okayama Univ. 8 : 115-129.
- KIMURA S., NAGAOKA Y. & KUBOTA M. - 1969 - Studies on Marine invertebrate collagens - I : Some collagens from Crustaceans and Molluscs (*Todarodes pacificus*, *Octopus vulgaris*). Bull. Jap. Soc. scient. Fish. 35 (8) : 743-748.

- KÖLLIKER A. - 1858 - Untersuchungen zur vergleichenden Geweblehre, angestellt in Nizza im Herbste 1856. Verh. Gesell. (Würzburg), 7 : 1-128. (in GUERIN 1908).
- LANGE M.M. - 1920 - On the regeneration and finer structure of the arms of the Cephalopods. J. exp. Zool. 31 (1) : 1-57.
- LANGER - 1850 - Über des kapillare Blutgefäss System der Cephalopoden. Sber. Akad. Wiss. Wien, 5 : 488.
- LAUBIER-BONICHON A. - 1973 - Arguments expérimentaux sur l'activité des cellules sécrétrices du lobe viscéral d'un Mollusque Céphalopode : *Octopus vulgaris*. C.r. hebd. Séan. Acad. Sc. Paris (D) : 1593-1596.
- LEMAIRE J. - 1970 - Table de développement embryonnaire de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). Bull. Soc. zool. Fr. 95 (4) : 773-782.
- LENDER Th. - 1974 - *La régénération animale*. Presses Universitaires de France.
- LENICQUE P.M. - 1973 - Morphogenetic actions of 5-hydroxytryptamine and some analogous substances on the regeneration of the planarian worm *Dugesia tigrina*. Acta zool., Stockh. 54 : 131-137.
- LENICQUE P.M. - 1974 - A mechanism of action of serotonin and noradrenaline on the regeneration of the planarian worm *Dugesia tigrina*. Acta zool. Stockh. 55 : 163-168.
- LENICQUE P.M. - 1974 - Protective effect of 5-hydroxytryptophan and  $\alpha$ -methyl DOPA against the inhibitive effect of lithium on the cicatrization and the regeneration of the planarian worm *Dugesia tigrina* and the hydroid *Clava squamata*. Acta zool., Stockh. 55 : 169-171.
- LENICQUE P.M. - 1976 - Contrôle de la régénération de petits morceaux de planaire *Dugesia tigrina* par les nucléotides cycliques AMP et GMP. C.r. hebd. Séan. Acad. Sc. Paris (D) : 283 : 1317-1319.
- LENICQUE P.M. & FERAL J.P. - 1976 - A mechanism of action of neurotransmitters on regeneration of the planarian worm *Dugesia tigrina*. Role of acetylcholine as a negative feed-back. Acta zool. Stockh. 57 (1) : 1-5.
- LENICQUE P.M. & FERAL J.P. - 1977 - Effects of biogenic amines on the regeneration of small pieces of the pedal disc of the sea anemone *Metridium senile* L. Comp. Biochem. Physiol. série C, (accepté en août 1976)
- LOCKSHIN R.A. - 1975 - Degeneration of the intersegmental muscles : Alterations in hemolymph during muscle degeneration. Devl. Biol. 42 : 28-39.
- LOWRY D.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. & RANDALL R.J. - 1951 - Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193 : 265-275.
- MANGOLD-WIRZ K. - 1963 - Biologie des Céphalopodes benthiques et nectoniques de la mer catalane. Vie et Milieu, Suppl. 13 : 1-285.

- MARTOJA R. & MAY R.M. - 1956 - Comparaison de l'innervation brachiale des Céphalopodes *Octopus vulgaris* et *Sepiola rondeleti*. Archs. Zool. exp. gén. 94 : 1-60.
- MAY R.M. - 1933 - La formation des terminaisons nerveuses dans les ventouses du bras régénéré du Céphalopode *Octopus vulgaris* Lam. Ann. Stn. oceanogr. Salammbô, 7 : 1-15.
- MISLIN H. - 1950 - Nachweis einer reflektorischen regulation des peripheren kreislaufs bei den Cephalopoden. Experientia, 6 (12) : 467-470.
- MIROW S. - 1972 a - Skin colour in the squids *Loligo pealii* and *Loligo opalescens* I. Chromatophores. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 125 : 143-175.
- MIROW S. - 1972 b - Skin colour in the squids *Loligo pealii* and *Loligo opalescens* II. Iridophores. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 125 : 176-190.
- NEILL S. ST.J. - 1971 - Notes on squid and cuttlefish keeping, handling and colour patterns. Pubbl. Staz. zool. Napoli, 39 (1) : 64-69.
- OLIVE P.J.W. - 1974 - Cellular aspects of regeneration hormone influence in *Nereis diversicolor*. J. Embryol. exp. Morph. 32 (1) : 111-131.
- PACKARD A. - 1972 - Cephalopods and Fish : the limits of convergence. Biol. Rev. 47 : 241-307.
- PARONA C. - 1900 - Sulla dicotomia della braccia nei Cefalopodi. Boll. Musei Lab. Zool. Anat. comp. R. Univ. Genova, 96 : 1-7.
- PAULEY G.B. & SPARK A.K. - 1967 - Observations on experimental wound repair in the adductor muscle and the Leydig cells of the oyster *Crassostrea gigas*. J. Invertebr. Pathol. 9 : 298-309.
- PELSENEER P. - 1897 - in R. BLANCHARD : Traité de Zoologie. Fasc. XVI, 146-174.
- PLENK H. - 1933 - Zum Bau der Cephalopodenmuskelfasern. Z. mikrosk. - Anat. Forsch. 33 : 605-624.
- PORTMANN Ad. - 1952 - Les bras dorsaux de *Tremoctopus violaceus* delle Chiaje. Revue suisse Zool. 59 (13) : 288-293.
- REINECKE M. - 1976 - The glial cells of the cerebral ganglia of *Helix pomatia* L. (Gasteropoda, Pulmonata) : II - Uptake of ferritine and <sup>3</sup>H glutamate. Cell. Tiss. Res. 169 : 361-382
- REISNER A.H., NEMES P. & BUCHOLTZ C. - 1975 - The use of coomassie brilliant blue G 250 perchloric acid solution for staining of electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. Analyt. biochem. 64 : 509-516.
- REVARDEL J.L. & 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. hebd. Séan. Acad. Sc. Paris (D) 280 : 1409-11.

- REYNOLDS E.S. - 1963 - The use of lead citrate at high pH as an electron - opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17 : 208-213.
- RICHARD A. - 1966 - La température, facteur externe essentiel de croissance pour le Céphalopode *Sepia officinalis* L. C.r. hebd. Séan. Acad. Sc. Paris (D) 263 : 1138-1141.
- RICHARD A. - 1971 - Contribution à l'étude expérimentale de la croissance et de la maturation sexuelle de *Sepia officinalis* L. Thèse n° 243 univ. Lille.
- RIFKIN E. & CHENG T.C. - 1968 - The origin, structure and histochemical characterization of encapsulating cysts in the oyster *Crassostrea virginica* parasitized by the cestode *Tylocephalum* sp. J. Invertebr. Pathol. 10 : 54-64.
- RIFKIN E., CHENG T.C. & ROHL H.R. - 1969 - An electron-microscope study of the constituents of encapsulating cyst in the american oyster *Crassostrea virginica*, formed in responses to *Tylocephalum* metacestods. J. Invertebr. Pathol. 14 : 211-226.
- RIGGENBACH E. - 1901 - Beobachtung über Selbstverstümmelung. Zool. Anz. 24 : 587-593
- ROSS R. & BENDITT E.G. - 1961 - Wound healing and collagen formation : I - Sequential changes in components of guinea pig skin wounds observed in the electron microscope. J. Biophys. Cytol. 11 : 677-700.
- ROSSI F. & GRAZIADEI - 1958 - Nouvelles contributions à la connaissance du système nerveux du tentacule des Céphalopodes : IV - Le patrimoine nerveux de la ventouse d'*Octopus vulgaris*. Acta Anat. 34 Suppl. 32 : 1-79.
- SANDERS G. & YOUNG J.Z. - 1974 - Reappearance of specific colour patterns after nerve regeneration in *Octopus*. Proc. R. Soc. London. B. 186 : 1-11.
- SANGIOVANNI G. - 1819 - Descrizione d'un particolare sistema di organi cromophoro espansivo dermoideo a dei fenomeni ch'esso produce, scoperto nei Mollusci Cefalopodi. Giorn. Enciclopedico di Napoli 13 (9).
- SANGIOVANNI G. - 1829 - Description d'un système particulier d'organes chromophores chez plusieurs Mollusques Céphalopodes. Annls. Sci. nat. 16 : 308-315.
- SCHÄFER W. - 1937 - Bau, Entwicklung und Farbenentstehung bei den Flitterzellen von *Sepia officinalis*. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 27 : 222-245.
- SHELLING P. & FIORINI P. - 1971 - Zur Entwicklung der chromatophoren bei *Loligo vulgaris* (Lam). Verh. naturf. Ges. (Basel) 81 : 55-68.
- SCHNEIDER J.G. - 1784 - Die Cephalopoden des Aristoteles in : *Samlung vermischter Abhandlungen zur Aufklärung der Zoologie und der Handlungsgeschichte*. pp. 7-134, Berlin (In GUERIN 1908).

- SCHON F. & KELLY J.S. - 1974 - Autoradiographic localization of  $^3\text{H}$ -GABA and  $^3\text{H}$ -glutamate over satellite glial cells. Brain res. 66 : 275-288.
- SERENI E., YOUNG J.Z. - 1932 - Nervous degeneration and regeneration in Cephalopods. Pubbl. Staz. zool. Napoli, 12 : 173-208.
- SHAPIRO A.L., VINUELA E. & MAIZEL J.W. - 1967 - Biochem. Biophys. Res. Comm. 28 : 815-820.
- SICARD R.E. & DI NICOLA E.F. - 1974 - Retardation of progressive forelimb regeneration by treatment with neuropharmacological agents. Oncology (Basel) 30 (5) : 442-447.
- SIEBOLD C.T. de & STANNIUS H. - 1849 - Nouveau manuel d'anatomie comparée, 1 : 356-405. (Paris, Roret) (cité par GUERIN 1908).
- SIMNETT J.D. & FISHER J.M. - 1973 - Natn. Cancer Inst. Monogr. 38 : 29-36 (cité par SMITH A.R. et al., 1975).
- SMINIA T., PIETERSMA K. & SCHEERBOOM J.E.M. - 1973 - Histological and ultrastructural observations on wound healing in the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis*. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 141 : 561-573.
- SMOTH A.R. & WOLPERT L. - 1975 - Nerves and angiogenesis in amphibian limb regeneration. Nature, 257 : 224-225.
- SMITH L.S. - 1962 - The role of venous peristalsis in the arm circulation of *Octopus dofleini*. Comp. Biochem. Physiol. 7 (4) : 269-275.
- SMITH L.S. - 1963 - Circulatory anatomy of the *Octopus* arm. J. Morph. 113 (2) : 261-266.
- SPALLANZANI abbé - 1768 - *An assay on animal reproduction*. Traduit de l'italien par M. Maty Londres, 1769.
- SPRENKEL (H.V. v.d.) - 1929 - Nerve ending in the muscles of the arm of *Sepia officinalis*. Proc. Sect. Sci. K. ned. Akad. wet. (C) 32 : 151-155.
- STEENSTRUP J.J. - 1856 - Hectocotyldannelsen hos Octopodolægterne *Argonauta* og *Tremoctopus* Blasksprutterne i Almindelighed. K. danske Vidensk. Selsk. Skr. 5.R., 4 : 211.
- THOUVENY Y. - 1967 - Les système histogéniques et la dédifférenciation cellulaire dans la morphologie des Annelides Polychètes. Archs. Zool. exp. gén. 108 (3) : 347-520.
- THOUVENY Y., COULON J. & FONTES M. - 1972 - Etude biochimique et cytologique de la dédifférenciation cellulaire dans la région antérieure de l'Annelide *Owenia fusiformis*. Bull. Soc. zool. Fr. 97 (3) : 311-326.

- TRIPP M.R. - 1970 - Defense mechanisms of Mollusks, J. reticuloendothel. Soc.  
7 : 173-182.
- TRIPP M.R., BISIGNANI L.A. & KENNY M.F. - 1966 - Oyster amoebocytes in vitro,  
J. Invertebr. Pathol., 8 : 137-140.
- VAN PRAET M. & DOUMENC D. - 1975 - Morphologie et morphogénèse expérimentale du  
tentacule chez *Actinia equina* L. J. Microscopie Biol. Cell. 23  
(1) : 29-38.
- VERRILL A.E. - 1881 - Regeneration of lost parts in the squid *Loligo pealei*.  
Am. J. Sci. (3<sup>rd</sup> Ser.) 21 : 333-334.  
Extrait de Trans. Conn. Acad. Arts Sci. 5 : 318.
- VERRILL A.E. - 1882 - Report on the Cephalopods of the northeastern coast of  
America. U.S. Comm. Fish and Fisheries, 7, appendix A, II (cité  
par W. ADAM, 1937).
- WEBER W. - 1968 - Multiple Innervation der Chromatophorenmuskelzellen von *Loligo*  
*vulgaris*. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 92 : 367-376.
- WEBER W. - 1970 - Zur Ultrastruktur der Chromatophorenmuskelzellen von *Loligo*  
*vulgaris*. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 108 : 446-456.
- WEBER W. - 1973 - Peculiarities of innervation in chromatophore muscle cells of  
*Loligo vulgaris*. Mar. Biol. 19 : 224-226.
- WILBUR K.M. - 1964 - in *Physiology of Mollusca*, ed. K.M. WILBUR, C.M. YONGE.  
Academic press New York. Vol. 1, chap. 8 : 243-282.
- YOUNG. J.Z. - 1971 - *The anatomy of the nervous system of Octopus vulgaris*.  
Clarendon Press. Oxford.
- CHALAZONITIS N., CHAGNEUX H. & RICHE D. - 1973 - Transport macromoléculaire glio-  
neuronique par vésiculation à double membrane. C.r. hebd. Séan.  
Acad. Sc. Paris (D), 277 : 1779-1781.